

**Molekulargenetische Charakterisierung von
Plakophilin-2 (PKP2) Mutationen
und deren Einfluss in der Pathogenese der
Arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie
(ARVC)**

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:

Florian Kirchner

aus Berlin

Berlin, 2012

Aus dem Max-Delbrück-Centrum, Berlin

Angefertigt unter der Betreuung von Dr. Brenda Gerull

Januar 2007 bis November 2011

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

2.Gutachter: Prof. Dr. Constance Scharff, Freie Universität Berlin

Disputation am: 15.10.2012

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	7
2. Einleitung	9
2.1 Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC).....	9
2.1.1 Epidemiologie der Erkrankung.....	9
2.1.2 Pathologie und Histopathologie	9
2.1.3 Krankheitsverlauf und Diagnostik	10
2.1.4 Genetische Grundlagen der ARVC.....	13
2.1.4.1 Nicht-desmosomale ARVC-Krankheitsgene	14
2.1.4.2 Desmosomale ARVC-Krankheitsgene.....	15
2.2 Aufbau und Funktion der Desmosomen	16
2.2.1 Desmoglein und Desmocollin	19
2.2.2 Desmoplakin.....	20
2.2.3 Armadillo-Proteine	20
2.2.3.1 Plakoglobin.....	21
2.2.3.2 Plakophilin	22
2.2.4 Plakophilin-2.....	23
2.3 Proteindegradation	26
2.4 Ziel der Arbeit	27
3. Ergebnisse	28
3.1 Charakterisierung von krankheitsverursachenden Mutationen im Plakophilin-2 (PKP2)	28
3.1.1 Phänotypische und genotypische Charakterisierung einer Familie mit häufig auftretenden Herzrhythmusstörungen	28
3.1.2 Heterogene Expressionsprofile endomyokardialer ARVC-diagnostizierter Gewebeproben	28
3.1.3 <i>In vitro</i> Charakterisierung von pathogenen PKP2 Mutationen	34
3.1.3.1 Mutationen im PKP2 sind auf mRNA Ebene stabil exprimiert.....	34
3.1.3.2 Instabilität des mutierten PKP2 Proteins und Dissoziation von den Zell-Zellgrenzen ...	34
3.1.3.3 Weitere pathogene PKP2 Mutationen führen zu Proteininstabilität, Degradation und zytoplasmatischer Lokalisation.....	36
3.1.3.4 Gestörte Interaktion von mutierten PKP2 Proteinen mit dem desmosomalen Bindungspartner Desmoplakin.....	37
3.1.3.5 Bakterielle Expressions- und Strukturanalysen von mutierten PKP2 Armadillo-Domänen bestätigen Proteininstabilität und Degradation	39
3.1.3.6 Proteolytische Degradation der mutierten PKP2 Proteine durch Calpain Proteasen	44
3.1.3.7 Einfluss mutierter PKP2 Proteine auf zelluläre Apoptose und ER-Stress	48
3.1.4 Etablierung von transgenen Mauslinien.....	49
3.1.4.1 Generierung transgener Mäuse.....	49
3.1.4.2 Induktion transgener Expression in PKP2-WT und PKP2-C796R Mauslinien	50
3.1.4.2.1 Stabile RNA Level in transgenen PKP2-C796R Linien	50
3.1.4.2.2 Reduzierte transgene Proteinexpression in TgPKP2-C796R Tieren	51
3.1.4.2.3 Unveränderte Herzmorphologie und Herzfunktion in TgPKP2-C796R Linien.....	55

3.2 <i>In vitro</i> Charakterisierung des Verlustes von PKP2 in Kardiomyozyten.....	55
3.2.1 Gestörte desmosomale Integration von DSP durch Auflösung des DSP-PKP2-PKC Protein Komplexes	57
3.2.2 Hyper-Phosphorylierung von PKC ϵ Substraten und Aktivierung des Wnt unabhängigen β -Catenin Signalweges.....	60
3.2.2.1 Hyper-Phosphorylierung von Connexin 43	61
3.2.2.2 Hyper-Phosphorylierung von AKT und erhöhte Expression von LEF/TCF Zielgenen...	63
3.2.3 Minderung der zellulären Integrität	66
4. Diskussion	68
4.1 Verwendung endokardialer Biopsien in der ARVC Diagnostik	69
4.2 Proteininstabilität von PKP2 Mutationen.....	70
4.3 Identifikation von pathogenen PKP2 Mutationen.....	71
4.4 Degradation der mutierter PKP2 Proteine	72
4.5 Genetischer Mechanismus der ARVC-verursachenden PKP2 Mutationen	73
4.6 Vergleich von PKP2 zu anderen desmosomalen Proteinen	75
4.7 Auswirkungen des Verlustes von PKP2	76
4.8 Protein Kinase C ϵ und die Hyper-Phosphorylierung spezifischer Substrate.....	78
4.9 Regulation des β -catenin Signalweges.....	79
4.10 Auswirkungen des Verlustes von PKP2 auf die zelluläre Integrität	81
4.11 Limitationen verwendeter Modelle	83
4.12 Ausblick	84
5. Material und Methoden	87
5.1 Materialien.....	87
5.1.1 Materialien und Geräte	87
5.1.2 Chemikalien und Größenstandards	89
5.1.3 Enzyme.....	91
5.1.4 Puffer und Lösungen	92
5.1.5 Nukleinsäuren.....	94
5.1.5.1 Plasmide.....	94
5.1.5.2 Kurz interferierende RNA (siRNA)	94
5.1.5.3 Oligonukleotide (Primer)	94
5.1.6 Kits	96
5.1.7 Antikörper	97
5.1.8 Bakterienstämme.....	98
5.1.9 Zellkultur	98
5.1.9.1 Eukaryotische Zellen	98
5.1.9.2 Nährmedien und Zusätze	99
5.1.10 Probandenproben	100
5.1.11 Computersoftware	100

5.2 Methoden	101
5.2.1 Mikrobiologische Techniken	101
5.2.1.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen	101
5.2.1.2 Transformation von Bakterien durch Elektroporation.....	101
5.2.2 Molekularbiologische Techniken.....	101
5.2.2.1 DNA.....	101
5.2.2.1.1 Isolation von Plasmid-DNA	101
5.2.2.1.2 Isolierung genomischer DNA aus murinen Ohrbiopsien	102
5.2.2.2 PCR	102
5.2.2.2.1 Mutagenese PCR	102
5.2.2.2.2 Genotypisierung der transgenen PKP2 Mäuse.....	103
5.2.2.3 DNA-Aufreinigung aus PCR-Ansätzen	103
5.2.2.4 DNA-Restriktion mit Endonukleasen.....	103
5.2.2.5 DNA-Gelelektrophorese.....	103
5.2.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	104
5.2.2.7 Phosphatasebehandlung von 5`überhängenden Enden.....	104
5.2.2.8 Ligation	104
5.2.2.9 Klonierung des Vektors pTRE-2pur-HA PKP2.....	104
5.2.2.10 DNA-Sequenzierung.....	104
5.2.2.11 Bestimmung von DNA-Konzentrationen	105
5.2.3 RNA.....	105
5.2.3.1 Isolierung und Reinigung totaler RNA-Fractionen	105
5.2.3.2 cDNA Synthese	106
5.2.3.3 rtPCR.....	106
5.2.3.4 Real-Time PCR.....	107
5.2.4 Proteine	109
5.2.4.1 Erstellen von Paraffinschnitten	109
5.2.4.2 Erstellen von Kryoschnitten	109
5.2.4.3 Masson-Trichrom Färbung	110
5.2.4.4 Immunfluoreszenz Analyse.....	110
5.2.4.5 Präparation von Gesamtproteinextrakt	111
5.2.4.6 Triton-Löslichkeits-Assay	111
5.2.4.7 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry	111
5.2.4.8 Immunopräzipitation	111
5.2.4.9 Co-Immunopräzipitation.....	112
5.2.4.10 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	113
5.2.4.11 Western Blot	114
5.2.4.12 Pulse-Chase Assay	114
5.2.4.13 Expression rekombinanter Proteine in E.coli	115
5.2.4.14 Aufreinigung von His7-rekombinanten Proteinen aus E.coli	115
5.2.4.15 Massenspektrometrische Analyse	115
5.2.4.16 Proteinkristallographie und Strukturanalyse	116

5.2.5 Zellkultur	116
5.2.5.1 Zellkultivierung.....	116
5.2.5.2 Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten.....	117
5.2.5.3 Isolation adulter Mauskardiomyozyten.....	118
5.2.5.4 Tet-On System	118
5.2.5.5 Transfektion.....	119
5.2.5.5.1 Transiente Plasmid-DNA Transfektion durch Polyethylenimin (PEI).....	119
5.2.5.5.2 Transfektion von kurz-interferierender RNA (siRNA)	120
5.2.5.6 Dispase Assay	120
5.2.5.7 Migration Assay	120
5.2.5.8 TUNEL-Assay.....	121
5.2.6 Tierversuche.....	121
5.2.6.1 Generierung transgenen Mäuse	121
5.2.6.2 Induktion der Zielgen-Expression	122
5.2.6.3 Explantation des Herzen aus der Maus	122
5.2.6.4 Echokardiographie.....	123
5.2.7 Statistik.....	123
6. Literaturverzeichnis	124
7. Anhang.....	137
8. Abkürzungsverzeichnis	149
9. Publikationsliste und Kongressbeiträge.....	153
10. Danksagung.....	154
11. Erklärung.....	155

1. Zusammenfassung

Die Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) ist eine autosomal dominant vererbte Herzmuskelerkrankung, die zu lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen, plötzlichem Herztod und Herzinsuffizienz führt. Pathologisches Substrat ist der progressive Ersatz des vor allem rechtsventrikulären Myokards durch Fett- und Bindegewebe. Genetische Ursache der Erkrankung sind heterozygote Mutationen in Genen, die für desmosomale Proteine kodieren. Kardiale Desmosomen gewährleisten die mechanische Integrität von Kardiomyozyten und nehmen an wichtigen zellulären Signaltransduktionswegen teil. Das häufigste Krankheitsgen, mit 45 % aller ARVC-assoziierten Mutationen, ist Plakophilin-2 (PKP2). Die Mehrzahl der pathogenen Mutationen im Plakophilin-2 führen zu Trunkierungen des Proteins. PKP2 gehört zur Familie der Armadillo-Proteine und fungiert in kardialen Desmosomen als Verbindungsprotein zwischen den desmosomalen Cadherinen (DSG2, DSC2) und Desmoplakin (DSP). Ziel dieser Arbeit ist sowohl die Auswirkungen ARVC-assoziiierter PKP2 Mutationen auf die Proteinstruktur, Stabilität und Integrität kardialer Desmosomen sowie auf zelluläre Signalwege zu untersuchen, als auch deren Einflüsse in der Pathogenese der ARVC weiter zu analysieren. Für die Überexpression rekombinant mutierter PKP2 Proteine sowie für den "knockdown" von PKP2 wurden *in vitro* Modellsysteme wie epitheliale Zelllinien und neonatale Kardiomyozyten verwendet. Diese Analysen wurden durch Proteinstrukturdaten ergänzt. Weiterhin wurden *in vivo* Expressionsanalysen desmosomaler Proteine in kardialem Patientengewebe durchgeführt sowie ein transgenes Mausmodell generiert und initial charakterisiert. Obwohl es in kardialem Patientengewebe keinen eindeutigen Hinweis für eine reduzierte PKP2 Expression gab, konnten *in vitro* Expressionsanalysen eindrucksvoll zeigen, dass alle untersuchten krankheitsbedingten Mutationen, unabhängig vom Mutationstyp, zur Instabilität der PKP2 Proteine führten, die vermittelt durch Calpain Proteasen, weiter degradiert wurden. Rekombinante bakterielle Expression, Kristallisierung und Strukturanalysen verschiedener mutierter PKP2 Armadillodomänen bestätigten die Instabilität und führten zur identischen Degradation in gleiche kurze Proteinfragmente, die erstmals kristallisiert ein strukturelles Modell für die Armadillodomänen des PKP2 darstellen. Zusätzlich konnte mithilfe der kardial-spezifischen Überexpression der PKP2 Mutation p.C796R im transgenen Mausmodell die *in vitro* beobachtete Instabilität und Degradation von PKP2 *in vivo* verifiziert werden. Um die Auswirkungen eines Verlustes der PKP2 Expression in primären Kardiomyozyten weiter zu analysieren, wurde PKP2 mittels siRNA ausgeschaltet. Dies resultierte in einer Auflösung des desmosomalen PKP2-DSP-Protein Kinase C-Komplexes. Die neu identifizierte kardial spezifische Isoform PKC ϵ hyper-phosphoryliert in Abwesenheit von PKP2 die spezifischen Zielproteine Connexin 43 und die Proteinkinase AKT/PKB. Der Verlust von PKP2 führte neben der Modulation der Gap Junctions und des β -catenin Signalweges auch zu einer Reduktion der zellulären Integrität in Folge mechanischer Belastung.

Zusammenfassend führen krankheitsbedingte Mutationen im PKP2 *in vitro* und *in vivo* zum Funktionsverlust durch intrinsische Instabilität und Calpain Proteasen vermittelte Degradation. Der Verlust des mutierten PKP2 Proteins resultiert in einer Destabilisierung der zellulären Integrität und führt zur Modulation intrazellulärer Signalwege, welche eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der ARVC spielen könnten.

Summary

Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) is an autosomal dominant cardiac muscle disorder clinically characterized by life threatening arrhythmias, sudden cardiac death and heart failure. The pathology of the disease is distinguished by degeneration of cardiac myocytes with replacement by fibrofatty and scar tissue mainly of the right ventricle. Genetically, mutations in genes encoding desmosomal proteins have been found to cause the disease. Cardiac desmosomes are known to provide mechanical integrity of adjacent cardiomyocytes and also play an important role in cellular signal transduction. The most common disease gene is plakophilin-2 (PKP2). Mutations in PKP2 have been found in about 45 % of ARVC cases. Most of the mutations lead to premature stop codons predicting truncated proteins. PKP2 belongs to the subfamily of armadillo-related proteins and maintains the link between the desmosomal cadherins (DSC2, DSG2) and desmoplakin (DSP). The objective of this thesis is to determine the effects of ARVC related PKP2 mutations on protein structure, stability and intercellular junction pathology as well as cellular signal transduction and their consequences in the pathogenesis of ARVC.

Therefore *in vitro* cell culture systems such as epithelial cell lines and neonatal rat cardiomyocytes have been used to over-express certain PKP2 mutations and knockdown PKP2 via siRNA. This was complemented by structural analyses of mutant PKP2 proteins. Furthermore *in vivo* expression analyses of desmosomal proteins in cardiac tissue of patients have been performed as well as a transgenic mouse model was generated and initially characterized.

Although in cardiac tissue of patients the reduction of PKP2 expression was not consistent, all *in vitro* expression studies of different mutant PKP2 proteins consistently revealed their instability following proteolytic degradation by calpain proteases. Bacterial expression, crystallization and structural modeling of mutated proteins impacting different Arm domains and helices of PKP2 confirmed their instability and degradation, resulting in the same remaining protein fragment which was crystallized and used to model the entire Arm domain of PKP2. The analysis of a transgenic mouse model overexpressing the p.C796R mutation in the heart verified the instability and degradation of the mutant PKP2 protein *in vivo*.

In order to analyze the consequences due to loss of PKP2, neonatal rat cardiomyocytes were treated with siRNA which resulted in disintegration of the desmosomal complex consisting of PKP2, DSP and protein kinase C. Interestingly, in absence of PKP2 the newly identified cardiac specific isoform PKC ϵ hyper-phosphorylated specific targets such as connexin 43 and AKT/PKB. In addition, loss of PKP2 resulted not only in gap junction remodelling and influencing the beta-catenin and AKT signalling pathway, but also in a decreased cellular integrity after mechanical stress.

In summary, disease causing PKP2 mutations suggest loss of function effects by intrinsic instability and calpain proteases mediated degradation in *in vitro* and *in vivo* model systems. Loss of PKP2 results in destabilization of cellular integrity and modulates intracellular signaling pathways; both might play a significant role in the pathogenesis of ARVC.

2. Einleitung

2.1 Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC)

Die Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) ist eine autosomal dominant vererbte Herzmuskelerkrankung mit variabler Penetranz und klinischer Manifestation. Die ARVC gilt als eine der Hauptursachen für den plötzlichen Herztod und ventrikulärer Herzrhythmusstörungen bei jungen scheinbar gesunden Individuen und Sportlern [Wichter *et al.*, 2005]. Die Erstbeschreibung der ARVC erfolgte bereits durch Dalla Volta *et al.* im Jahre 1961 und wurde im Jahr 1978 durch die Arbeitsgruppe um Guy H. Fontaine erstmals klinisch detailliert charakterisiert. Seit 1995 ordnet man die Erkrankung gemäß der WHO den primären Kardiomyopathien zu [Peifer *et al.*, 1994]. Die ARVC ist pathohistologisch durch einen progressiven Verlust des Myokards mit gleichzeitigem Ersatz von Fett- und Bindegewebe gekennzeichnet, der in erster Linie im rechten Ventrikel (RV) auftritt, jedoch auch den linken Ventrikel betreffen kann.

2.1.1 Epidemiologie der Erkrankung

Die ARVC ist eine familiäre Erkrankung. Erste klinische Zeichen treten häufig im Jugendlichen- oder jungen Erwachsenenalter (16. bis 35. Lebensjahr) auf [Nava *et al.*, 2000]. Der plötzliche Herztod eines Familienmitglieds ist nicht selten die erste Manifestation. Die Prävalenz liegt bei ungefähr 1:5000 in der Allgemeinbevölkerung, in bestimmten Regionen Norditaliens und der griechischen Insel Naxos sogar bis 1:1000 [Coonar *et al.*, 1998; Herren *et al.*, 2009; Smith 2011]. Die ARVC spielt mit bis zu 22% in einigen Regionen Italiens und ansonsten im Durchschnitt mit 11% eine wichtige Rolle beim plötzlichen Herztod von Athleten, aber auch bei Nicht-Sportlern <35. Lebensjahr [Carrado *et al.*, 1998; Carrado *et al.*, 2000]. Eine Manifestation der ARVC über dem 60. Lebensjahr ist eher selten, jedoch nicht ausgeschlossen. Die Erkrankung manifestiert sich meist in Form von Kammertachykardien rechtsventrikulären Ursprungs mit linksschenkelblockartiger Konfiguration [Marcus *et al.*, 1995; Nava *et al.*, 2000].

2.1.2 Pathologie und Histopathologie

Makroskopisch zeigt sich ein dilatierter rechter Ventrikel (RV) mit ausgeprägter ($\geq 50\%$) Degeneration des Myokards mit einem progressivem Ersatz von Fett- und Bindegewebe, der subepikardial beginnt, sich mit der Zeit transmural ausdehnen kann und von wenigen, z.T. atrophierten myokardialen Fasern durchzogen wird. An ausgedünnten Stellen des RV kann es zur Ausbildung von Aneurysmata kommen, die typischerweise im Dysplasiedreieck (subtrikuspidal, apikal oder rechtsventrikulärer Ausflusstrakt) entstehen (Abbildung 1) [Burke *et al.*, 1998; Basso *et al.*, 2009; Herren *et al.*, 2009]. Dieser fibro-adipöse Umbau interferiert mit der regulären Reizleitung im RV und führt im Oberflächen-EKG zu Veränderungen wie der pathognomonischen Epsilon-Welle, Rechtsschenkelblock und Spätpotentialen.

Drei verschiedene Mechanismen werden für die Verfettung und Fibrose diskutiert: (1.) Apoptose von Myozyten, (2.) Inflammation im Rahmen eines Autoimmunprozesses oder einer viralen Myokarditis, (3.) Transdifferenzierung von Myozyten in Adipozyten und Fibroblasten durch die Suppression des Wnt/ β -Catenin Signalweges und Beteiligung kardialer Stammzellen [Bowles *et al.*, 2002; Lombardi *et al.*, 2010].

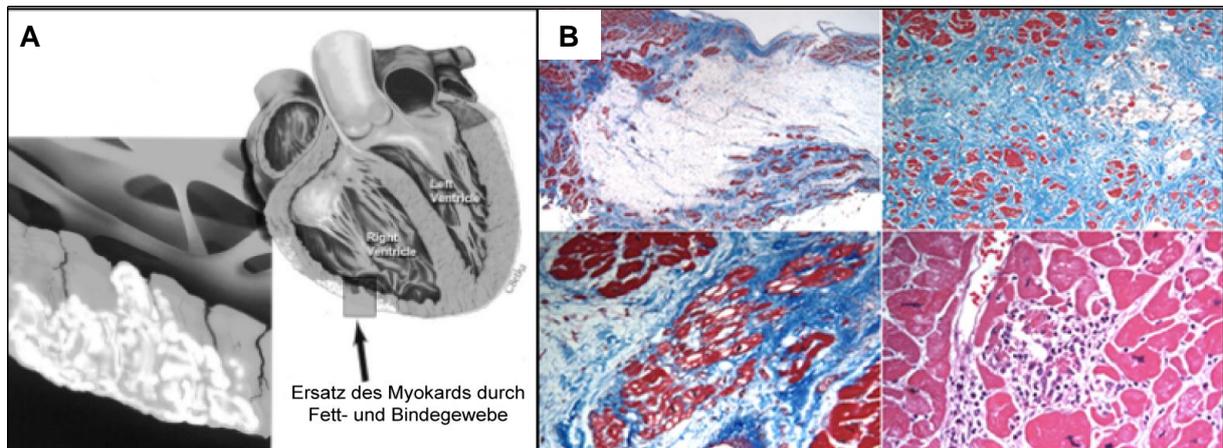


Abbildung 1: Histologische Diagnostik der ARVC. (A) Schematische Darstellung der Degradation des rechtsventrikulären Myokards mit progressivem Ersatz durch Fett- und Bindegewebe. (B) Histologische Befunde mit Atrophie des rechtsventrikulären Myokards. Inselförmiger Verbleib von einzelnen Herzmuskelfasern, umgeben von Fett- und Bindegewebe [Modifiziert nach <http://img.medscape.com>].

2.1.3 Krankheitsverlauf und Diagnostik

Ventrikuläre Herzrhythmusstörungen wie Extrasystolen, Kammertachykardien und Kammerflimmern sind klinisches Hauptmerkmal der Erkrankung. Es wird angenommen, dass diese als Folge der fortschreitenden Degradation der Myozyten des rechten Ventrikels und der progressiven Bindegewebs- und Fetteinlagerung entstehen. In späten Stadien kann es zu einer Herzinsuffizienz, vor allem des rechten Ventrikels kommen.

Die ARVC kann dabei in vier Krankheitsphasen unterteilt werden [Basso *et al.*, 2009].

1. Phase: Subklinische Phase, in der bereits diskrete strukturelle Abnormalitäten sichtbar sind, der Patient jedoch vollständig asymptomatisch ist. Dennoch kann es in dieser Phase ohne vorherige Symptome vor allem im jungem Alter zum plötzlichen Herztod als Erstmanifestation kommen [Carrado *et al.*, 2011]. 2. Phase: Auftreten von symptomatischen Arrhythmien aus dem RV, die zu Palpitationen, Synkopen und plötzlichem Herztod führen können. 3. Phase: Rechtsherzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Funktion. 4. Phase: Biventrikuläre Herzinsuffizienz in der Spätphase, die einer ausgeprägten dilatativen Kardiomyopathie ähnelt und ein Herzersatzverfahren notwendig macht. In dieser Phase werden auch endokardiale Thromben beobachtet, die zu pulmonalen und systemischen Embolien führen können [Wlodarska *et al.*, 2006]. Hierbei betrifft die häufigste Form in erster Linie den RV. Die 2. und 3. Phase betreffen entweder vor allem den linken Ventrikel oder beide Ventrikel. Die beiden letzteren Formen werden daher nicht selten als dilatative Kardiomyopathie verkannt, obwohl Arrhythmien klinisch überwiegen.

Ebenso trifft hier der Begriff ARVC nicht mehr zu und wird, wie kürzlich von der Heart Rhythm Society und der European Heart Rhythm Association akzeptiert, allgemeiner gefasst als Arrhythmogene Kardiomyopathie (ACM) bezeichnet [Jacoby *et al.*, 2012].

Aufgrund der diagnostischen Schwierigkeiten gibt es derzeit keinen Goldstandard für die Diagnose der ARVC. Daher wurden 2010 die "Task-Force"-Kriterien zur Diagnose der Erkrankung neu definiert und modifiziert. (Tabelle 1). Dabei werden Haupt- und Nebenkriterien definiert, die auf der Grundlage verschiedener diagnostischer Tests ermittelt werden. Die definitive Diagnose einer ARVC erfordert 2 Haupt-Kriterien bzw. 1 Haupt- und 2 Neben-Kriterien bzw. 4 Neben-Kriterien aus den 6 unterschiedlichen Kategorien. Eine „Borderline“-Diagnose kann gestellt werden, wenn 1 Haupt- und 1 Neben-Kriterium oder 3 Neben-Kriterien vorliegen. Liegen nur 1 Haupt- und 2 Neben-Kriterien vor, so ist prinzipiell eine ARVC möglich [Marcus *et al.*, 2010].

Mit dem heutigen Stand der Wissenschaft und Medizin ist noch keine optimale Strategie zur Prävention des plötzlichen Herztods etabliert, da nicht alle Risikofaktoren für ein solches Ereignis bekannt sind. Daher sind auch die Empfehlungen der europäischen und amerikanischen Leitlinien recht allgemein verfasst, und Entscheidungen bezüglich der Implantation eines ICD (implantierbarer Kardioverter-Defibrillator), medikamentöser Therapie oder Ablation von ventrikulären Arrhythmien werden vom behandelnden Arzt aufgrund des Gesamtbildes getroffen. Die Vermeidung größerer körperlicher Anstrengung zur Prävention der Krankheitsprogression bei allen Patienten mit ARVC wird empfohlen. Als Antiarrhythmika werden häufig Betablocker, Sotalol oder Amiodaron allein oder zusätzlich zum ICD eingesetzt. Im Gegensatz zum ICD haben sie keinen Einfluss auf die Mortalität der Erkrankung [Wichter *et al.*, 1992; Smith 2011]. Bei fortschreitender Herzinsuffizienz sollte eine medikamentöse Herzinsuffizienztherapie initiiert werden, jedoch ist in einigen Fällen ein Herzersatzverfahren unumgänglich.

Tabelle 1: Diagnose der ARVC: Task-Force-Kriterien

<u>I. Globale oder regionale Dysfunktion und strukturelle Veränderungen</u>	
Haupt	<p>TTE</p> <ul style="list-style-type: none"> • Regionale RV-Akinesie, -Dyskinesie oder Aneurysma • und eines der folgenden Kriterien (enddiastolisch) <ul style="list-style-type: none"> – PLAX-RVOT ≥ 32 mm ([PLAX/KOF] ≥ 19 mm/m²) – PSAX-RVOT ≥ 36 mm ([PSAX/KOF] ≥ 21 mm/m²) – oder RV-Flächenverkürzung $\leq 33\%$ <p>CMR</p> <ul style="list-style-type: none"> • Regionale RV-Akinesie, -Dyskinesie oder dyssynchrone RV-Kontraktion • und eines der folgenden Kriterien <ul style="list-style-type: none"> – RV-EDV/KOF ≥ 110 ml/m² (♂) oder ≥ 100 ml/m² (♀) – oder RVEF $\leq 40\%$ <p>RV-Angiographie</p> <ul style="list-style-type: none"> • Regionale RV-Akinesie, -Dyskinesie oder Aneurysma
Neben	<p>TTE</p> <ul style="list-style-type: none"> • Regionale RV-Akinesie oder –Dyskinesie • und eines der folgenden Kriterien (enddiastolisch) <ul style="list-style-type: none"> – PLAX-RVOT ≥ 29–31mm ([PLAX/KOF] ≥ 16–18 mm/m²) – PSAX-RVOT ≥ 32–35 mm ([PSAX/KOF] ≥ 18–20 mm/m²) – oder RV-Flächenverkürzung >33 bis $\leq 40\%$ <p>CMR</p> <ul style="list-style-type: none"> • Regionale RV-Akinesie, -Dyskinesie oder dyssynchrone RV-Kontraktion • und eines der folgenden Kriterien <ul style="list-style-type: none"> – RV-EDV/KOF ≥ 100–109 ml/m² (♂) oder ≥ 90–99 ml/m² (♀) – oder RVEF >40 bis $\leq 45\%$
<u>II. Histopathologie</u>	
Haupt	Morphometrisch $<60\%$ residuelle Myozyten (oder geschätzt $<50\%$), fibröse Umbildung des R V-Myokards d. freien Wand in ≥ 1 Probe (Verfettung kein Kriterium mehr!)
Neben	Morphometrisch 60–75% residuelle Myozyten (oder geschätzt 50–65%), fibröse Umbildung der RV-freien Wand
<u>III. Repolarisationsstörungen (ab 14. LJ)</u>	
Haupt	T-Inversionen V1–mindestens V3 (ohne kompletten RSB)
Neben	T-Inversionen V1–V2 (ohne kompletten RSB) oder V4, V5 oder V6 T-Inversionen V1–V4, falls kompletter RSB
<u>IV. Depolarisationsstörungen</u>	
Haupt	Epsilon-Welle (niedrig-amplitudiges Signal zwischen Ende QRS- und Beginn T-Welle) in V1–V3
Neben	Signal-gemittelt EKG mit Spätpotentialen, falls QRS im Oberflächen-EKG <110 ms
<u>V. Arrhythmien</u>	
Haupt	Nicht-anhaltende oder anhaltende Kammertachykardien mit LSB-Morphologie und superiorer Achse
Neben	Nicht-anhaltende oder anhaltende Kammertachykardien mit LSB-Morphologie und inferiorer Achse oder >500 VES/24 Stunden im Holter-EKG
<u>VI. Familienanamnese</u>	
Haupt	ARVC bei Verwandtem 1° (nach revidierten 2010-Task-Force-Kriterien) ARVC bei Verwandtem 1° pathologisch bestätigt (Autopsie, Herz-OP) Nachweis einer Mutation (beim Patienten), die mit einer ARVC assoziiert ist
Neben	ARVD/C bei Verwandtem 1°, bei dem die revidierten 2010-Task-Force-Kriterien aus praktischen oder sonstigen Gründen nicht angewandt werden können Plötzlicher Herztod eines Verwandten 1° (<35 .LJ) mit v.a. ARVC ARVC pathologisch oder nach revidierten 2010-Task-Force-Kriterien bei einem Verwandten 2° bestätigt
<p>CMR: kardiale Magnetresonanztomographie; KOF: Körperoberfläche; LSB: Linksschenkelblock; PLAX: parasternale Längsachse; PSAX: parasternale Kurzachse; RSB: Rechtsschenkelblock; RV: rechter Ventrikel; RVOT: rechtsventrikulärer Ausflusstrakt; TTE: transthorakale Echokardiographie.</p>	

[Modifiziert nach Saguner *et al.*, 2011]

2.1.4 Genetische Grundlagen der ARVC

Die ARVC ist eine genetische Erkrankung. Es konnten 12 verschiedene genetische Ursachen der ARVC (ARVC 1-12) identifiziert und Mutationen in 8 verschiedenen Genen beschrieben werden. In den meisten Familien folgt die ARVC einem autosomal dominanten Erbgang mit variabler Penetranz und unterschiedlicher Krankheitsmanifestation (Tabelle 2). Darüber hinaus wurden zwei genomische Loci mit autosomal rezessivem Erbgang identifiziert (Chromosomen 17q21 [Coonar *et al.*, 1998] und 6p24 [Norgett *et al.*, 2000]). Diese homozygoten Genmutationen führten in den Zellkontaktproteinen Desmoplakin (DSP) zum sog. Carvajal Syndrom [Carvajal-Huerta *et al.*, 1998] und im Plakoglobin (JUP) zur Naxos-Erkrankung [Protonotarios *et al.*, 2006]. Bei beiden Erkrankungen sind neben ARVC auch palmoplantare Hyperkeratosen und krauses Haar bei Betroffenen beschrieben worden [Antoniades *et al.*, 2006; Tsatsopoulou *et al.*, 2006].

Für die autosomal-dominanten Formen konnten als Krankheitsgene die desmosomalen Zellkontaktproteine Desmoplakin, Plakophilin-2, Desmoglein-2, Desmocollin-2, Plakoglobin identifiziert werden [Rampazzo *et al.*, 2002; Gerull *et al.*, 2004; Pilichou *et al.*, 2006; Syrris *et al.*, 2007, Asimaki *et al.*, 2007]. Darüber hinaus sind Mutationen in den nicht desmosomalen Genen RyR2, TFG- β 3 und TMEM43 bekannt (Tiso *et al.*, 2001; Beffagna *et al.*, 2004; Merner *et al.*, 2008).

Tabelle 2: ARVC Subtypen, Genloci und Kandidatengene

ARVC Subtyp	Genlocus	Kodiertes Protein
ARVC 1	12q23-q24	TGF β -3
ARVC 2	1q42-q43	RyR2
ARVC 3	14q12-q22	-
ARVC 4	2q32	Titin
ARVC 5	3p23	Transmembran Protein 43
ARVC 6	10p12-p14	-
ARVC 7	10q22	-
ARVC 8	6p24	Desmoplakin (DSP)
ARVC 9	12p11	Plakophilin-2 (PKP2)
ARVC 10	18q12	Desmoglein-2 (DSG2)
ARVC 11	18q12.1	Desmocollin-2 (DSC2)
ARVC 12	17q21	Plakoglobin (JUP)

Neuere Daten postulieren, dass die ARVC keine rein monogene Erkrankung sei, sondern in einigen Fällen könnten mehrere Gene (polygen) oder beide Allele eines Gens (compound Heterozygotie) von einer Mutation betroffen sein [Xu *et al.* 2010]. Außerdem kann derzeit nur bei ungefähr der Hälfte der Patienten mit ARVC eine pathogene Mutation nachgewiesen werden, insbesondere da wahrscheinlich noch nicht alle beteiligten Gene und Mutationen identifiziert wurden. [Corrado *et al.*, 2010].

Ein negativer Gentest schließt somit eine ARVC nicht grundlegend aus. Ferner manifestiert sich nicht bei allen Verwandten mit der jeweiligen pathogenen Mutation eine ARVC (variable Penetranz) [Awad *et al.*, 2008]. Die Ursachen hierfür sind noch nicht vollständig erforscht, jedoch scheinen Umweltfaktoren wie körperliche Belastung neben genetischen Kofaktoren eine Rolle zu spielen.

2.1.4.1 Nicht-desmosomale ARVC-Krankheitsgene

Neben Mutationen in desmosomalen Krankheitsgenen wurden drei nicht-desmosomale ARVC Krankheitsgene identifiziert. So wurden Mutationen in den untranslatierten Regionen (UTR-Regionen) des transforming growth factor-beta3-Gens (TGF β 3) als Ursache von ARVC postuliert (ARVC 1). Das TGF β 3-Gen gehört zur Familie der Wachstumsfaktoren („transforming growth factor family“) und kodiert für regulierende Zykline, die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Homöostase von Geweben einnehmen [Sporn *et al.*, 1992]. Darüber hinaus stimulieren TGF β -Proteine die Proliferation von mesenchymalen Zellen sowie die Expression von extrazellulären Matrixkomponenten, welche in den entsprechenden Geweben Fibrose induzieren können [Leask *et al.*, 2004]. Die Evidenz, ob die identifizierten Mutationen im TGF β 3 wirklich Ursache der ARVC sind, steht allerdings noch aus.

Als weiteres Krankheitsgen konnte in vier Familien unterschiedliche Mutationen (R176Q, L433P, N2386I und T2504M) im kardialen Ryanodinrezeptor-Gen (RyR2) nachgewiesen werden (ARVC 2) [Tiso *et al.*, 2001]. Der Ryanodinrezeptor ist für die Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum verantwortlich und spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulation der intrazellulären Kalziumhomöostase, die einen entscheidenden Einfluss auf die Erregung und Kontraktion der Herzmuskelzelle ausübt. Funktionsstörungen können zu Herzrhythmusstörungen und zum Zelluntergang führen. Die identifizierten Mutationen im RyR2-Gen sind in zwei hochkonservierten Regionen der zytoplasmatischen Domänen lokalisiert, welche homolog zu Regionen des RyR1-Gens sind. Es ist bekannt, dass Mutationen im RyR1-Gen zu einer erhöhten Kalziumfreisetzung aus dem SR führen [Yamamoto *et al.*, 2000]. Mutationen im Ryanodinrezeptor sind darüber hinaus als Ursache der Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT) identifiziert worden, welche einen sehr ähnlichen Phänotyp wie die ARVC aufweist. Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass die vermeintlich identifizierten Mutationen im RyR2 Gen eher mit CPVT assoziiert sind [Priori *et al.*, 2001; Thiene *et al.*, 1988].

Eine spezifische Mutation (S358L) im TMEM43 Gen konnte als Ursache einer besonderen Form der ARVC, die spezifisch in Neufundland vorkommt, identifiziert werden. Die Mutation im TMEM43-Gen ist in einer hochkonservierten Transmembran-Domäne lokalisiert (ARVC 5) [Merner *et al.*, 2008]. Derzeit ist über die Funktion des TMEM43-Gens noch wenig bekannt. Dennoch vermutet man eine Interaktion zwischen TMEM43 und PPAR γ (adipogener Transkriptionsfaktor), welche für den fibrös-fettigen Ersatz des Myokardiums verantwortlich sein könnte [Lemay *et al.*, 2006]. In weiteren Mutationsscreenings wurden vermeintlich ARVC assoziierte Mutationen im Titin und Desmin Gen identifiziert. Eine Validierung dieser Ergebnisse steht jedoch noch aus [Taylor *et al.*, 2011; Otten *et al.*, 2011; Hedberg *et al.*, 2012].

2.1.4.2 Desmosomale ARVC-Krankheitsgene

Die Mehrheit der identifizierten Genmutationen, die zu einer ARVC führen, betreffen desmosomale Proteine. Die meisten Genmutationen werden autosomal dominant mit variabler Penetranz vererbt, wobei Plakophilin-2, Desmocollin-2, Desmoplakin, Desmoglein-2 und Plakoglobin in abnehmender Reihenfolge am häufigsten betroffen sind. In einer Untersuchung an 80 nicht verwandten ARVC-Probanden wurden in 40% der Fälle Mutationen in desmosomalen Genen nachgewiesen [Pilichou *et al.*, 2006]. Die Desmosomen sind besonders für die Stabilität und Integrität der Zellen verantwortlich. Mutationsbedingte Defekte der interzellulären Verbindungen scheinen einen maßgeblichen Einfluss auf die Pathogenese der ARVC auszuüben. Als eines der ARVC assoziierten Krankheitsgene konnte das Plakoglobin-Gen mit vereinzelt Mutationen identifiziert werden. Unter anderem wurde eine Insertionsmutation bei einer Familie mit autosomal dominantem Erbgang identifiziert, die anders als bei der Naxos-Krankheit keine dermatologischen Manifestationen auswies. (ARVD12) [Asimaki *et al.*, 2007]. Als weiteres desmosomales Krankheitsgen der ARVC konnte das Desmoplakin-Gen identifiziert werden, bei dem u.a. eine heterozygote Insertionsmutation (2034insA) beschrieben wurde, die durch eine Leserasterverschiebung zu einem vorzeitigen Stoppkodon führt und bei den Betroffenen eine vorwiegend linksventrikuläre Kardiomyopathie verursacht (ARVC 8) [Rampazzo *et al.*, 2002; Norman *et al.*, 2005]. In den desmosomalen Cadherinen Desmoglein-2 (DSG2) und Desmocollin-2 (DSC2) wurden ebenfalls krankheitsbedingte Mutationen gefunden. Im DSG2 wurde durch ein Mutationsscreening von 54 nicht verwandten ARVC-Patienten neun heterozygote Mutationen (5 Missense-, 2 Insertions-, bzw. Deletions-, 1 Nonsense- und 1 Splice-site-Mutationen) und in einer weiteren Studie 8 zusätzliche Mutationen im Desmoglein-2-Gen nachgewiesen (ARVD10) [Pilichou *et al.*, 2006; Syrris *et al.*, 2007]. Als ARVC assoziierte Mutationen im DSC2 konnten durch Untersuchungen an 88 nicht verwandten ARVC-Patienten eine Mutation im Intron 5 (c.631-2A→G) detektiert werden, welche zu einer kryptischen Spleiß- Akzeptorstelle und zu einem vorzeitigen Stoppkodon führt (ARVC 11). Durch quantitative Analysen konnte eine deutlich reduzierte kardiale DSC2-Expression festgestellt werden. Knockdown-Experimente im Zebrafisch unterstrichen die essentielle Bedeutung von DSC2 in der Herzentwicklung [Heuser *et al.*, 2006]. Parallel konnten unabhängig zwei weitere Mutationen im DSC2 Gen beschrieben werden [Syrris *et al.*, 2006]. Das am häufigsten identifizierte ARVC-Krankheitsgen PKP2 wurde von Dr. Brenda Gerull und Kollegen durch molekulargenetische Untersuchungen im Plakophilin-2 Gen (PKP2) an 120 Patienten mit ARVC ohne Verwandtschaftsbeziehungen analysiert (ARVC9). Bei 32 der 120 Probanden wurden 25 unterschiedliche heterozygote Mutationen gefunden (12 Insertions-/Deletionsmutationen, 6 „Nonsense“-Mutationen, 4 „Missense“-Mutationen und 3 „Splice-site“-Mutationen) [Gerull *et al.*, 2004]. Weitere ARVC-assoziierte Punkt- bzw. Rastermutationen im PKP2 Gen konnten in den letzten Jahren nachgewiesen werden [Syrris *et al.*, 2006; van Tintelen *et al.*, 2006]. Zusammenfassend konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass ca. 50% aller Patienten mit ARVC eine oder mehrere Mutationen in den fünf desmosomalen Proteinen tragen. Somit wird die ARVC als Erkrankung der kardialen Desmosomen angesehen.

2.2 Aufbau und Funktion der Desmosomen

Desmosomen sind zelluläre Adhäsionskomplexe, die jeweils zwischen einzelnen Epithelzellen, Kardiomyozyten, Meningothelzellen sowie in dendritischen Retikulumzellen der Lymphknotenfollikel lokalisiert sind und für den Zusammenhalt der Zellen verantwortlich sind. Des Weiteren verankern sie Bündel der Intermediärfilamente der Typen Keratin, Desmin und Vimentin [Kartenbeck *et al.*, 1983; Kartenbeck *et al.*, 1984; Franke *et al.*, 1987; Kuruc *et al.*, 1988; van der Loop *et al.*, 1995]. Da sie besonders in mechanisch beanspruchten Geweben, wie dem Herz und der Haut vorhanden sind, wird ihnen eine primär stabilisierende Funktion zugeschrieben [McGrath *et al.*, 1999; Chidgey *et al.*, 2002; Garrod *et al.*, 2002]. Die Desmosomen sorgen für die Aufrechterhaltung der zellulären Integrität und regulieren die Anpassung an biomechanische Einflüsse. Des Weiteren konnten den einzelnen desmosomalen Proteinen eine Reihe von Aufgaben in verschiedenen Signaltransduktionsvorgängen nachgewiesen werden, wie u.a. an dem Wnt-Signalweg, RhoA-Signalweg und der Gap Junction Regulation [Garcia-Gras *et al.*, 2006; Godsel *et al.*, 2010; Oxford *et al.*, 2007]. Die permanent unter Belastung stehenden Zellverbindungen des Myokards sind die sog. Glanzstreifen. Diese Glanzstreifen bilden die Zellgrenzen der Kardiomyozyten, die durch einen etwa 20 nm großen Spalt voneinander getrennt sind. Diese Zellverbindungen setzen sich aus den Desmosomen, den Adherens Junctions und den Gap Junctions zusammen. Diese Ansammlung an adhäsiven Zellverbindungen im Herzen wird unter dem Begriff *area composita* zusammengefasst. Die *area composita* wird als eine Region in den Glanzstreifen des Herzmuskels bezeichnet, die Desmosomen, Adherens Junctions und Gap Junctions vereint [Grossmann *et al.*, 2004; Borrmann *et al.*, 2006; Franke *et al.*, 2007]. Durch immunhistologische und immunelektronenmikroskopische Untersuchungen konnte eine Co-Lokalisation von Proteinen der Desmosomen (Desmoplakin, Desmoglein-2, Plakophilin-2) mit Proteinen der Adherens Junctions (N-Cadherin, α -Catenin, β -Catenin) nachgewiesen werden. Die Zusammensetzung von Desmosomen unterscheidet sich in den verschiedenen Zelltypen durch zelltypspezifische Isoformen. Desmosomen sind am besten im Epithel der Haut untersucht. In den verschiedenen Schichten des Epithels kommen verschiedene Isoformen desmosomaler Proteine vor [McGrath *et al.*, 1999]. Der Grundaufbau eines Desmosoms ist jedoch stets identisch und wird aus Proteinen dreier unterschiedlicher Familien gebildet (Abbildung 2). Zu diesen Familien gehören die desmosomalen Cadherine, Desmoglein 1-4 [Schafer *et al.*, 1994] und Desmocollin 1-3 [Kawamura *et al.*, 1994], die Armadillo-Familie mit Plakoglobin [Franke *et al.*, 1989] und den Plakophilinen [Mertens *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1999] sowie die Plakine mit Desmoplakin, Plectin, Envoplakin und Periplakin [Leung *et al.*, 2002].

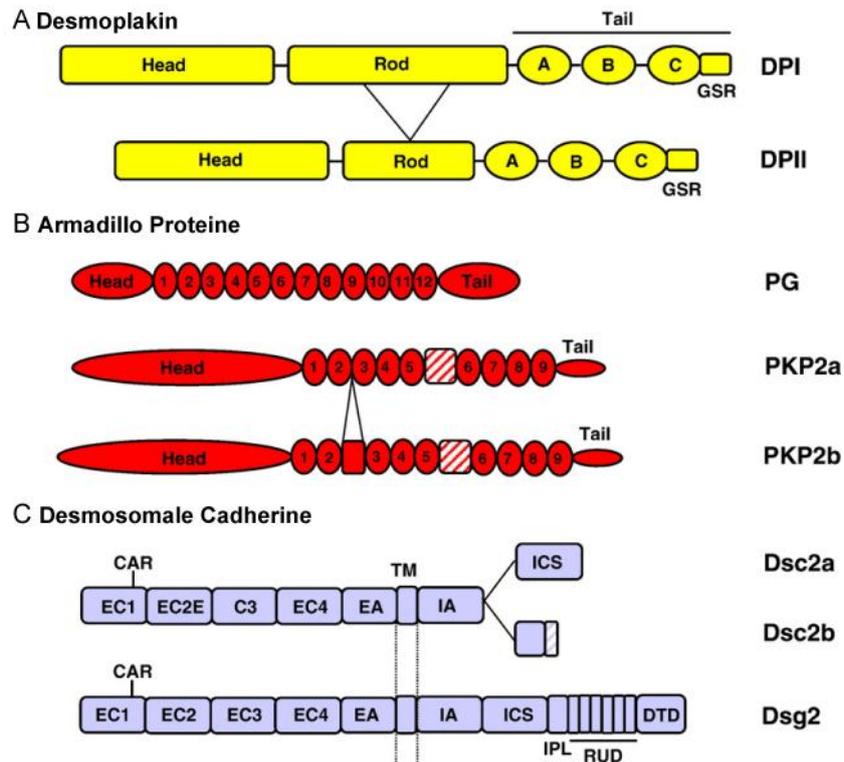


Abbildung 2: Struktur desmosomaler Proteine. (A) Desmoplakin: Dargestellt sind die beiden Desmoplakin Isoformen. A, B, C kennzeichnen Plakin Wiederholungsdomänen. GSR, Glycin-Serin-Arginin reiche Domäne. (B) Armadillo Proteine: Plakoglobin (PG) enthält 12 Armadillo Wiederholungsdomänen. Die beiden Plakophilin Isoformen weisen 9 Armadillo Wiederholungsdomänen auf und besitzen zwischen der 5 und 6 Armadillo Wiederholungsdomäne ein Insert (gestrichelte Box), welches eine Beugung in der Proteinstruktur erzeugt. Die PKP2b Isoform unterscheidet sich von der PKP2a Isoform durch ein 44 Aminosäure großes Insert zwischen Armadillo Wiederholungsdomäne 2 und 3. (C) Desmosomale Cadherine: Die Cadherine werden mit einem N-terminalen Signal und Propeptid synthetisiert, welche bei der Reifung des Proteins abgespalten werden. Die Zelladhäsion Erkennungsstelle (CAR) vermittelt die adhäsive Funktion der desmosomalen Cadherine. Desmocollin a (DSC2a) und Desmoglein 2 weisen an in der zytoplasmatischen Region eine interzelluläre Cadherin-ähnliche Sequenz auf (ICS). EC1-4, Extrazelluläre Cadherin Wiederholungen; EA, extrazellulärer Ankerdomäne; TM, Transmembrandomäne; IA, intrazellulärer Anker; ICS, interzelluläre Cadherin-ähnliche Sequenz, IPL, intrazellulär Prolin-reicher Linker; RUD, Wiederholungsdomäne; DTD, Desmoglein terminale Domäne. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu [Modifiziert nach Garrod *et al.*, 2008].

Die Ultrastruktur der Desmosomen zeigt eine scheibenförmiges Aussehen, die einen Durchmesser von 0,1 - 0,5 µm besitzt. Im Bereich eines Desmosoms beträgt der Abstand der Plasmamembranen zweier Zellen etwa 24 nm. Die Desmosomen bestehen räumlich aus der Desmoglea, einer Art Mittellinie sowie einem inneren und äußeren Plaque [Cowin *et al.*, 1985]. Die Desmoglea ist ein zur Plasmamembran extrazellulärer Bereich, der den interzellulären Raum eines Desmosoms darstellt, in welchen die extrazellulären Domänen der Transmembran Glykoproteine Desmoglein (DSG 1-4) und Desmocollin (DSC1-3) hineinragen und vorwiegend homophile (DSG-DSG bzw. DSC-DSC) *trans*- und *cis*-Dimere bilden, welche somit die direkte Verbindung mit der Nachbarzelle vermitteln. Diese extrazellulären Domänen sind kalziumabhängig miteinander verbunden [Holthöfer *et al.*, 2007; Garrod *et al.*, 2008]. Im stabilen Zellverband können die desmosomalen Cadherinbindungen von einem kalziumabhängigen in einen kalziumunabhängigen Zustand wechseln.

Dieser sog. Hyperadhäsion-Zustand stellt eine sehr robuste Zell-Zellverbindung dar. Zellkulturexperimente in Epithelzellen konnten zeigen, dass verwundetes Gewebe von diesem kalziumunabhängigen Hyperadhäsion-Zustand wieder in den kalziumabhängigen Zustand wechselt. Es wird postuliert, dass dieser Prozess durch spezifische Phosphorylierungen der Cadherine durch die Protein Kinase $C\alpha$ vermittelt wird und einen Regulationsmechanismus der Wundheilung darstellt [Garrod *et al.*, 2008]. Im intrazellulären Bereich eines Desmosoms gibt es auf beiden Seiten der Plasmamembranen symmetrische, dichte Plaques, die in innere und äußere Plaques unterschieden werden. Zum äußeren Plaque (ODP) gehören der C-Terminus der desmosomalen Cadherine, die Armadillo-Proteine, Plakoglobin und Plakophilin 1-3, und der N-Terminus von Desmoplakin. Der innere intrazelluläre Plaque (IDP) wird durch einen 10 bis 20 nm breiten elektronenlichten Bereich vom äußeren desmosomalen Plaque getrennt und durch die Interaktion des C-Terminus von Desmoplakin mit den Intermediärfilamenten gebildet (Abbildung 3) [Holthöfer *et al.*, 2007].

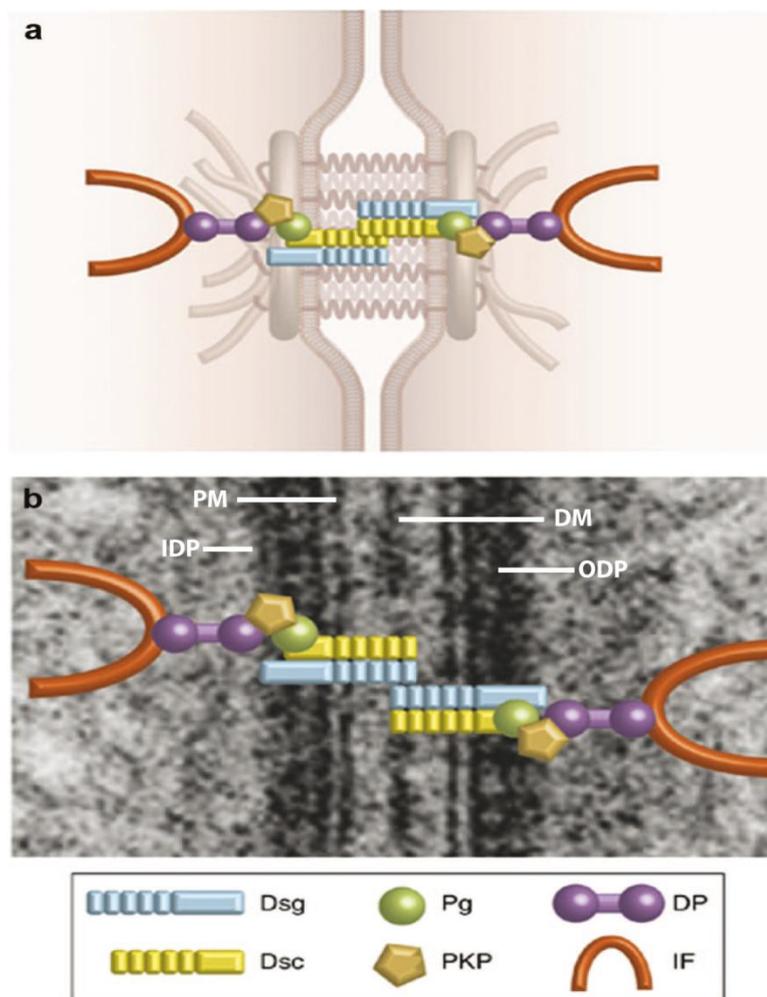


Abbildung 3: Struktureller Aufbau des Desmosoms. Die Interaktion zwischen den desmosomalen Komponenten an der interzellulären Zellgrenze sind schematisch in a) dargestellt und überlagert mit der elektronenmikroskopischen Aufnahme in b). Desmosomale Transmembran Cadherine, Desmoglein (Dsg) und Desmocollin (Dsc), binden an die Armadillo Protein Familie Plakoglobin (Pg) und Plakophilin (PKP), welche wiederum mit dem Plakin Familien Mitglied Desmoplakin (DP) interagiert. Das zytoskelettale Intermediärfilamente (IF) mit dem Desmosom. DM, Desmoglae Mittellinie; IDP, intrazelluläres Plaque; ODP, äußeres Plaque; PM, Plasmamembran [Modifiziert nach Green *et al.*, 2007].

Die Neubildung eines Desmosoms konnte erstmals detailliert durch Zeitrafferanalysen von Fluoreszenz-markierten DSP Proteinen in Epithelzellen gezeigt werden. Bei der Formation neuer Zell-Zellkontakte konnten drei sich überlagernde Phasen identifiziert werden. In der Initialphase wurde ein punktuell Erscheinen von DSP an den neugebildeten Zellgrenzen innerhalb der ersten 3 Minuten detektiert. In der sich anschließenden Phase wurden innerhalb von 15 Minuten Vereinigungen von DSP mit PKP2 im Zytoplasma detektiert. Die abschließende dritte Phase beschreibt die Verankerung von DSP aus dem Zytoplasma an die Zellmembran. Die an DSP gebundenen Intermediärfilamente werden durch die Integration von DSP in das Desmosom an den Zellgrenzen fixiert und führen zu einer Stabilisierung und Festigung der zellulären Integrität [Godsel *et al.*, 2005]. Weiterführend konnte gezeigt werden, dass für den Einbau von DSP in das Desmosom eine spezifische Phosphorylierung an Position S2849 von DSP im Zytoplasma essenziell ist. In Epithelzellen konnte die Protein Kinase C α (PKC α) als verantwortliche PKC Isoform für diese Phosphorylierung identifiziert werden. PKC α gehört zur Familie der Serin/Threonin spezifischen Protein Kinase, die sich in drei Klassen unterteilen lassen: konventionelle PKC (cPKC), neue PKC (nPKC) und atypische PKC (aPKC). PKC α zählt zu den cPKC, die durch den Second messenger Diacylglycerol (DAG) und Kalzium aktiviert werden [Nishizuka *et al.*, 1992]. Jedes Mitglied der PKC Familie hat ein spezifisches Expressionsprofil, welches in unterschiedlichem Maße zelluläre Prozesse wie Zelladhäsion, zelluläre Transformation und Regulation des Zellzykluses beeinflussen. In Kardiomyozyten nimmt PKC α eine regulatorische Funktion bei der Kalziumhomöostase und in der kardialen Kontraktilität ein [Molnar *et al.*, 2009]. Die Phosphorylierung von DSP konnte jedoch nur in Anwesenheit von PKP2 vermittelt werden und führte zur Identifikation des zytoplasmatischen Komplexes aus DSP-PKP2-PKC α , indem PKP2 als Linkerprotein zwischen DSP und PKC α fungiert [Bass-Zubek *et al.*, 2007]. Die Auflösung des DSP-PKP2-PKC α Komplexes durch den Verlust sowohl von PKP2 als auch PKC α führte in epithelialen Zellen zu einer Akkumulation von DSP im Zytoplasma und resultierte in einem Verlust der zellulären Integrität. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass PKC α spezifische Substrate wie α -Adducin und MARCKS stärker in phosphorylierter Form vorlagen. Beide Substrate haben einen regulatorischen Einfluss auf die Organisation der Aktinfilamente. Diese Hyper-Phosphorylierung von PKC α Substraten aufgrund einer gestörten PKP2 Expression vermittelt einen möglichen Einfluss des PKC Signalweges auf die Homöostase und Integrität der Zelle.

2.2.1 Desmoglein und Desmocollin

Die desmosomalen Cadherine Desmoglein (MW ~160 kDa) und Desmocollin (MW ~115 kDa) weisen eine 30%ige Homologie zueinander und mit den klassischen Cadherinen auf. Die N-terminalen, jeweils 110 Aminosäuren umfassenden extrazellulären Domänen, werden als EC1-EC4 benannt. Die extrazelluläre Ankerdomäne (EA) wird durch die 5. extrazelluläre Domäne (EC5) gebildet. Zwischen den einzelnen extrazellulären Domänen befinden sich die Bindungsabschnitte für die Kalziumionen, die für die Konformationsbildung verantwortlich sind. Beide Proteine besitzen mit der 24 Aminosäuren umfassenden Membrandomäne (TM) einen einzigen Membrandurchgang. Mit der Ankerdomäne (IA) beginnt der intrazelluläre Anteil der desmosomalen Cadherine.

Auf das intrazelluläre Cadherin-typische Segment (ICS), welches zu vielen Cadherinen eine hohe Sequenzhomologie aufweist und an der das Armadillo-Wiederholungsprotein JUP bindet, folgt der Prolin-reiche Linker (L) und die repeated unit domain (RUD). Diese sich wiederholenden RUD-Sequenzmotive sind für den wesentlich längeren intrazellulären Abschnitt der Desmogleine, im Vergleich zu den Desmocollinen verantwortlich. Am C-Terminus des Desmogleins befindet sich noch die Desmoglein spezifische terminale Domäne (T) [Holthöfer *et al.*, 2007].

Das desmosomale Cadherin Desmocollin kommt in zwei alternativen Spleißvarianten vor (a und b). Bei der Spleißvariante „b“ fehlt die C-Domäne, bzw. die Catenin-Bindungsstelle (ICS), während die „a“-Form kurz nach der C-Domäne endet. Diese zwei Varianten kommen durch unterschiedliches Spleißen des letzten Exons zustande [Holthöfer *et al.*, 2007]. Während Desmoglein 2 und Desmocollin 2a und 2b in allen Zelltypen mit desmosomalen Zellkontakten exprimiert werden, ist die Synthese der anderen Isoformen weitestgehend auf mehrschichtige Epithelien beschränkt [Koch *et al.*, 1992; Schafer *et al.*, 1994; Nuber *et al.*, 1995]. Neben der wichtigen stabilisierenden Funktion der desmosomalen Cadherine für die Zellen, übt vor allem DSG einen weiteren wichtigen Einfluss in der sehr frühen embryonalen Entwicklung aus. Homozygote DSG2 KO-Mäuse starben zu einem Zeitpunkt, in dem im Trophoblast noch keine desmosomalen Strukturen nachweisbar sind [Eshkind *et al.*, 2002].

2.2.2 Desmoplakin

Desmoplakin tritt in zwei Isoformen (Desmoplakin I und II) auf, welche durch differentielles Spleißen entstehen [Green *et al.*, 1988; Virata *et al.*, 1992]. Desmoplakin I (MW 250 kDa) wird in allen Desmosomen-bildenden Geweben exprimiert, wohingegen Desmoplakin II (MW 215 kDa) eine eingeschränkte Verbreitung aufweist [Franke *et al.*, 1992; Cowin *et al.*, 1985; Angst *et al.*, 1990]. Desmoplakin I liegt als Homodimer vor und besteht aus drei Domänen, einer zentralen α -Helix und globulären Domänen an dessen N- und C-Termini [O'Keefe *et al.*, 1989]. Die N-terminalen Domänen binden an die Cadherine und Armadillo-Proteine, während die C-terminalen Domänen mit den gewebespezifischen Intermediärfilamenten (IF) des Zytoskeletts interagieren [Stappenbeck *et al.*, 1993; Kowalczyk *et al.*, 1997; Kowalczyk *et al.*, 1999; Hofmann *et al.*, 2010]. Das für Kardiomyozyten charakteristische IF ist das Desmin. Die essentielle Bedeutung von DSP in der frühen Herz- und Hautentwicklung konnte durch die Letalität von DSP KO Mäusen im frühen Embryonalstadium (E6.5) verdeutlicht werden.

2.2.3 Armadillo-Proteine

Die molekulare Interaktion zwischen DSP und den desmosomalen Cadherinen wird über die Mitglieder der Armadillo-Proteinfamilie Plakoglobin und Plakophilin 1-3 vermittelt, die als sog. Linkerproteine fungieren. Diese sind charakterisiert durch eine zentrale Domäne, die zusammengesetzt ist aus einer variablen Anzahl von Armadillo (Arm) Wiederholungsdomänen.

Diese Wiederholungen, die je 42 Aminosäuren beinhalten, wurden erstmals im *Drosophila melanogaster*-Segmentpolaritätsgen *armadillo* nachgewiesen, welches in die *wingless* Signalkette involviert ist [Peifer *et al.*, 1990]. Zur Familie der Armadillo-Proteine zählen neben Plakoglobin und den Plakophilinen weitere Proteine wie β -Catenin und die p120catenin [Franke *et al.*, 1989; Reynolds *et al.*, 1992]. Die Proteine der Familie der Armadillo-Proteine weisen eine sehr hohe Homologie zu einander auf und unterscheiden sich von anderen Armadillo-Domänen tragenden Proteinen in ihrer multiplen Funktionalität. Charakteristisch ist die Lokalisation der Armadillo-Proteine an der Zellmembran, wo Sie als adhäsive und stabilisierende Moleküle fungieren. Darüber hinaus ist auch eine Lokalisation im Zellkern beschrieben und könnte daher einen Einfluss auf Tumorprogression, Kernimport und Signaltransduktion ausüben [Mertens *et al.*, 1996; Behrens *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997; Simcha *et al.*, 1998]. Die genauere Funktion im Nukleus ist für eine Reihe von Armadillo-Proteinen jedoch noch unklar. Besonders ausführlich ist die nukleäre Funktion für β -Catenin beschrieben, welches als Schaltstelle im kanonischen Wnt-Signalweg fungiert und an die Transkriptionsfaktoren LEF(lymphoid enhancer factor-1)/ TCF (T-cell factor) bindet [Behrens *et al.*, 1996; Hecht *et al.*, 1999; Eastman *et al.*, 1999]. Der Wnt-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle als Wachstums- und Differenzierungsfaktor in der Spezifizierung der Zellen während der embryonalen Entwicklung. Wenn das abgesonderte *wingless*-Glycoprotein (Wnt) an einen Zelloberflächenrezeptor *frizzled/frizzled-2*-Typ bindet [Bhanot *et al.*, 1996; Kennerdell *et al.*, 1998], aktiviert es das zytoplasmatische Protein *dishevelled* (Dvl) [Yanagawa *et al.*, 1995], welches wiederum zu einer Inaktivierung der Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK3 β) führt. Die Inaktivierung der GSK3 β verhindert folglich die spezifische Phosphorylierung von β -Catenin und bewirkt so eine Translokation in den Kern. Neuere Studien belegen ebenfalls eine Beteiligung von Plakoglobin in den Wnt-Signalweg und die Interaktion mit dem LEF/TCF Transkriptionsfaktorkomplex [Zhurinsky *et al.*, 2000; Solanes *et al.*, 2004; Garcia-Gras *et al.*, 2006]. Neben dem Wnt-abhängigen β -catenin Signalweg existiert ein Wnt-unabhängiger Signalweg, bei dem durch Interaktion der aktivierten Protein Kinase B/AKT mit GSK3 β ebenfalls eine Stabilisation von β -catenin ermöglicht wird und β -catenin in den Kern lokalisiert ohne den Einfluss des Wnt-Proteins [Haq *et al.*, 2003].

2.2.3.1 Plakoglobin

Plakoglobin (MW 83 kDa), auch bekannt unter der Bezeichnung γ -Catenin, besteht aus 12/13 Armadillo Wiederholungsdomänen, welche durch saure terminale N- und C-Domänen begrenzt werden. Plakoglobin ist das einzige Protein, das sowohl in den Desmosomen als auch in den Adherens Junctions vorkommt [Chitaev *et al.*, 1996; Wahl *et al.*, 1996; Witcher *et al.* 1996]. Der kardial spezifische Verlust von DSP in *Desmoplakin-Knockout*-Mäusen konnte zeigen, dass β -Catenin und Plakoglobin eine kompetitive Wirkung auf den Wnt-Signalweg haben, die durch ihre unterschiedlichen Bindungsstellen im LEF/TCF-Transkriptionsfaktor begründet sein könnten und zur Reduktion der LEF/TCF-vermittelte Gentranskription von CyclinD1 und c-Myc führt. Diese Suppression des Wnt-Signalweges zeigte des Weiteren eine Erhöhung der Adipogene Adiponectin und C/EBP- γ sowie der Fibrose gene Col1a2, Col1a1 und Col3a1 [Garcia-Gras *et al.*, 2006].

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Wnt-Signalweg als ein Regulator von Myogenese zu Fibrose und Adipogenese fungiert und als Schutz vor Apoptose dient. Ein Ungleichgewicht in der exogenen Plakoglobin- und β -Catenin Konzentration führt zu einer starken Suppression des Signalwegs. Dies steigert wiederum die Adipogenese und Apoptose. Die genauen Gründe für die Translokation von Plakoglobin in den Zellkern sowie die Herkunft der Adipozyten sind bisher unklar. Es wurde jedoch postuliert, dass aufgrund der Suppression des Wnt-Signalweges die kardialen Vorläuferzellen des rechten Ventrikels direkt zu Adipozyten differenzieren könnten [Lombardi *et al.*, 2009]. Eine Verifizierung dieser Hypothese als zugrundeliegender molekularer Mechanismus steht noch aus, sowie die generelle Übertragung auf andere Krankheitsgene der ARVC.

2.2.3.2 Plakophiline

Im Gegensatz zu Plakoglobin wurden die Interaktionen der Plakophiline mit desmosomalen Cadherinen und Desmoplakin ausschließlich über den N-Terminus der Plakophiline beschrieben, wobei die spezifische Funktion der konservierten N-terminalen Kopf-Domäne unbekannt ist [Mertens *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 1999; Kowalczyk *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2002]. Die Plakophiline besitzen neun Armadillo-Motive, die von einem langen N-Terminus und einem kurzen C-Terminus begrenzt werden. Die dreidimensionale Struktur der Armadillo-Wiederholungsdomänen (mehrere Armadillo-Motive) ist aus der kristallinen Struktur des Plakophilin-1 bekannt und bildet aus neun Armadillo-Motiven eine Superhelix mit mehreren α -Helices. Die dabei entstehende zylindrische Struktur bildet eine positiv geladene Furche, an welche, ähnlich zu β -Catenin, saure Reste der Interaktionspartner binden können [Huber *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 2005]. Zur Unterfamilie der Plakophiline gehören drei Mitglieder, die Plakophiline 1-3 (PKP 1-3), welche ausschließlich in Zellverbindungen des desmosomalen Typus vorkommen [Hatzfeld *et al.*, 1994; Mertens *et al.*, 1996; Bonne *et al.*, 1999]. Das Armadillo-Protein p0071, auch Plakophilin-4 genannt, hat jedoch eine nähere Verwandtschaft zu einer anderen Armadillo-Unterfamilie, zu der auch p120catenin, ARVCF und Neurojungin gehören, welche vorwiegend in Adhärenz-Verbindungen zu finden sind [Hatzfeld *et al.*, 2003; Shibamoto *et al.*, 1995; Pfaffenholz *et al.*, 1997; Anastasiadis *et al.*, 2000]. Die Plakophiline 1-3 sind juxtamembrane Bestandteile der desmosomalen Plaques, in denen sie eng mit anderen Armadillo-Proteinen, wie Plakoglobin sowie den desmosomalen Cadherinen und Desmoplakin, assoziiert sind. Die drei Plakophilin-Isoformen sind unterschiedlich exprimiert. Plakophilin-1 ist suprabasal, hauptsächlich in Desmosomen der Stachel- und Körnerzellschicht, aber auch schwach in der Basalzellschicht der mehrschichtigen Epidermis sowie in anderen mehrschichtigen und komplexen Epithelien exprimiert [Schmidt *et al.*, 1997]. Plakophilin-2 ist das meist verbreitete Plakophilin. Es ist in Desmosomen aller proliferierenden Epithelien, vorwiegend in der Basalschicht, aber auch in Desmosomen von Tumoren, Kardiomyozyten und Purkinje-Zellen des Herzens sowie in Lymphknotenfollikeln und der Leber zu finden [Mertens *et al.*, 1999]. Plakophilin-3 zeigt mit der Anwesenheit in den meisten ein- und mehrschichtigen Epithelien ein intermediäres Expressionsmuster. In Desmosomen der Epidermis ist es in allen Schichten gleich stark vertreten [Schmidt *et al.*, 1999].

2.2.4 Plakophilin-2

Das Gen *PKP2* codiert das Protein Plakophilin-2 und befindet sich auf Chromosom 12p11 [Bonné *et al.*, 2000]. Es sind zwei PKP2-Isoformen bekannt, die durch alternatives Spleißen entstehen. Die beiden Transkripte unterscheiden sich durch eine Exoninsertion von 132 bp (44 Aminosäuren) zwischen dem zweiten und dritten Armadillo-Motiv. Die kürzere humane Plakophilin-2 Variante (Plakophilin 2a) besteht aus 837 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 92 kDa, die längere Form (Plakophilin 2b) hat mit 881 Aminosäuren ein Molekulargewicht von 97 kDa. Beide Isoformen können in den Desmosomen nachgewiesen werden, wobei PKP2b gegenüber PKP2a schwächer exprimiert wird. Die intrazelluläre Lokalisierung und zelltypspezifische Verteilung der Isoformen ist identisch. Neben der Lokalisation in den Desmosomen wurde PKP2 in früheren Studien auch im Zellkern nachgewiesen [Mertens *et al.*, 1996; Wolf *et al.*, 2010]. PKP2 wurde zudem in Assoziation mit dem RNA-Polymerase III-Komplex beschrieben und als Substrat der Tyrosinkinase Tak-1 identifiziert [Mertens *et al.*, 2001; Müller *et al.*, 2003]. Jedoch ist die Rolle von PKP2 in der Signaltransduktion weiterhin ungeklärt [Chen *et al.*, 2002]. In den Desmosomen fungiert PKP2 als Linkerprotein zwischen den desmosomalen Cadherinen und Desmoplakin und trägt damit wesentlich zur zellulären Stabilität bei. Darüber hinaus ist PKP2 als Regulator an mehreren zellulären Prozessen der Formation von Zell-Zellkontakten beteiligt. PKP2 dient als Linkerprotein für die Interaktion von PKC und DSP, welche essentiell für die PKC α vermittelte Phosphorylierung von DSP und den damit verbundenen Einbau von DSP in das Desmosom [Godsel *et al.*, 2005; Bass-Zubeck *et al.*, 2008]. Des Weiteren konnten neuere Publikationen zeigen, dass PKP2 in den RhoA Signalweg involviert ist. RhoA gehört zur Familie der Rho-GTPasen und ist verantwortlich für die Formierung und Kontraktion von Stressfasern sowie für die Ausbildung von fokalen Adhäsionskontakten [Yonemura *et al.*, 1995; Noren *et al.*, 2000; Perez-Moreno *et al.*, 2006; Pokutta *et al.*, 2000]. PKP2 dient als struktureller Linker zwischen den Zell-Zellkontakten und reguliert sowohl das Aktin-Remodelling als auch die IF des Zytoskeletts. PKP2 nimmt somit eine entscheidende Rolle bei der Koordination der Neuformation von Zell-Zellkontakten ein [Godsel *et al.*, 2010]. Zur Steigerung der zellulären Integrität werden die einzelnen desmosomalen Komplexe zusätzlich in vertikaler Orientierung über die Interaktion von PKP2 und JUP vernetzt. Diese kompakte Formation ist besonders in mechanisch stark beanspruchtem Gewebe wie den Kardiomyozyten essentiell. Kardiomyozyten zeichnen sich durch die charakteristische Zusammensetzung von Desmosomen, Adherens Junction und Gap Junction in Form der Glanzstreifen aus. Die mechanische Belastung wird durch die Desmosomen und Adherens Junction vermittelt, wohingegen Gap Junctions die Übertragung von Ionen und kleinen Molekülen zwischen den Zellen ermöglichen.

Gap Junctions sind Ansammlungen von Zell-Zell-Kanälen, die den Austausch von Ionen und bis zu 1 kDa großen Molekülen zwischen benachbarten Zellen ermöglichen. Dieser Stoffaustausch ist notwendig, um die Homöostase der Zelle zu erhalten, die Reizweiterleitung zu ermöglichen und Proliferations- und Differenzierungsprozesse zu regulieren [Krutovskikh *et al.*, 1997]. Die Gap Junction-Kanäle sind aus je zwei Connexonen aufgebaut, die sich jeweils von benachbarten Zellen aneinanderlagern.

Connexone bestehen aus sechs Proteinbausteinen, den Connexinen (Cx), die intrazellulär zu Halbkanälen zusammengebaut und anschließend in die Zellmembran transportiert werden, wo die extrazellulären Schleifen der Connexinmoleküle mit denen der Nachbarzell-Halbkanäle interagieren [Goodenough *et al.*, 1996]. In Säugetieren sind Connexine in nahezu allen Geweben nachweisbar, ihre Verteilung ist gewebespezifisch. Connexin43 (Cx43; 43 kDa) ist das am häufigsten vorkommende Connexin und findet sich in kardialen Geweben vorrangig in den Ventrikeln. Modulationen der Genexpression, alternatives Spleißen und post-translationale Modifizierung der Cx-Untereinheiten können die Anzahl und Aktivität der Gap Junctions in der Zellmembran beeinflussen. Connexine besitzen im Gegensatz zu anderen integralen Membranproteinen eine sehr kurze Halbwertszeit von 2 - 5 h [Laird *et al.*, 1995]. Als posttranslationale Modifikation von Cx43 konnten zahlreiche Phosphorylierungsstellen identifiziert werden. Es gibt Anzeichen dafür, dass diese post-translationale Phosphorylierung für die Aggregation der Connexine zu einem Proteinkanal, die Kanalpermeabilität und die Stabilität von Cx43 von Bedeutung ist [Musil *et al.*, 1991]. Mehrere Serin- und Threoninreste des Cx43 werden von Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC) oder den klassischen mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) phosphoryliert [Lampe *et al.*, 2000]. Diese Phosphorylierungen modulieren die Permeabilität der Gap Junctions, den intrazellulären Transport im Rahmen der Proteinreifung sowie den Abbau der Proteine und den Einbau in die Plasmamembran [Kumar *et al.*, 1996; George *et al.*, 1999; Fischer *et al.*, 2005]. Die Behandlung von Zellen mit Tumorpromotoren (Phorbol ester, DDT), Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF) oder Vitamin K₃ (Menadion), sowie die Überexpression von Onkogenen (ras, raf, src) führt unter Beteiligung von Cx43-Phosphorylierung zu einer Inhibition der Zell-Zell-Kommunikation [Hu *et al.*, 1995; Trosko und Ruch, 1998; Klotz *et al.*, 2002]. In den Glanzstreifen der Kardiomyozyten interagiert das Gap Junction Protein Cx43 direkt mit dem PKP2 der Desmosomen. Untersuchungen demonstrierten, dass der Verlust von PKP2 zu einer Veränderung der Menge an Gap Junction Plaques führt und eine gleichzeitige Abnahme des Natriumstroms zwischen den Zellen zur Folge hat [Oxford *et al.*, 2007; Fidler *et al.*, 2008]. Ebenfalls konnte in heterozygoten Plakoglobin-Mäusen eine Verringerung der Cx43 Expression und eine Reduktion der Reizweiterleitung demonstriert werden. Diese Veränderungen der elektrischen Kommunikation und die verringerte Leitungsgeschwindigkeit, hervorgerufen durch den Verlust desmosomaler Komponenten, führte in der Folge zu verzögerten Aktionspotentialen, die im kardialen Gewebeverband Arrhythmien induzieren könnten [Kaplan *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2009; Fabritz *et al.*, 2011]. Aktuelle Studien konnten weiterführend neben der Interaktion von PKP2 mit der α -Untereinheit des Natriumkanals Na_v1.5 ebenfalls eine Interaktion dem zytoskelettalen Adapterprotein AnkyrinG (AnkG) identifizieren, welche eine wichtige Komponente des spannungsabhängigen Natriumkanalkomplexes (VGSC) darstellt [Sato *et al.*, 2011]. Dieses Zusammenspiel von Desmosomen, Gap Junctions und den Natriumkanälen deutet auf einen funktionellen Komplex hin, der durch Veränderungen einer Komponente Auswirkungen auf die Funktion und Integrität der anderen haben könnte und so die elektrische Kommunikation zwischen den Kardiomyozyten beeinflusst. Zusammenfassend konnte durch diese Studien gezeigt werden, dass die mechanische Stabilität notwendig ist für die Formation der Gap Junctions. Die Synchronisation von mechanischer und elektrischer Aktivität ist essentiell, um eine funktionsfähige Einheit und ein kontraktiles Organ ausbilden zu können [Noorman *et al.*, 2009].

Um die Auswirkungen des Fehlens von PKP2 auf die Zusammensetzung der Glanzstreifen zu untersuchen, wurden Plakophilin 2-Knockout-Mäuse generiert [Grossmann *et al.*, 2004]. Der Verlust von PKP2 führte zur embryonalen Letalität (E10.5-E11) aufgrund von perikardialen Einblutungen, hervorgerufen durch Defekte der Zelladhäsion in den kardialen Glanzstreifen. Das PKP2 KO-Modell konnte des Weiteren zeigen, dass DSP nicht weiter an der Zellmembran assoziiert ist, sondern in Form von Aggregaten im Zytoplasma vorliegt. Die anderen Arm Proteine (β -Catenin, p120, Plakoglobin) zeigten jedoch keine Expressionsveränderungen. Der Verlust von PKP2 hatte in anderen Geweben, wie z.B. der Haut, keinen nachweisbaren Einfluss auf die desmosomale Struktur. Eine mögliche Erklärung wäre, dass PKP2 die einzige PKP Isoform in kardialen Zellen darstellt und somit der Verlust von PKP2 in Kardiomyozyten nicht wie in anderen Geweben durch die weiteren Plakophiline (PKP1 und PKP3) kompensiert werden kann. Ähnlich begründet dürften die Auswirkungen von pathogenen Mutationen im PKP2 in der Pathogenese der ARVC sein. Die ARVC-assoziierten PKP2 Mutationen bewirken eine Destabilisierung der zellulären Integrität, die aufgrund des Fehlens anderer Plakophiline in Kardiomyozyten nicht kompensiert werden kann. Die identifizierten ARVC-assoziierten Mutationen im PKP2 erstrecken sich über das gesamte Gen, wobei eine Vielzahl der Mutationen in Armadillo Domänen lokalisiert sind. 90 % aller identifizierten PKP2 Mutationen führen zu einem vorzeitigen Stoppkodon und somit zu trunkierten Proteinen (Abbildung 4). Eine Charakterisierung der pathogenen PKP2 Mutationen und deren Einfluss auf den molekularen Mechanismus der ARVC ist bisher ungeklärt. Erste *in vitro* Expressionsstudien von ARVC-assoziierten N-terminalen PKP2 Mutationen demonstrierten eine Delokalisation von der Zellmembran und eine geringere Expressivität der mutierten Proteine, welche auf eine Beteiligung eines Degradationsprozesses hindeuten könnten [Joshi-Mukherjee *et al.*, 2008; Hall *et al.*, 2009].

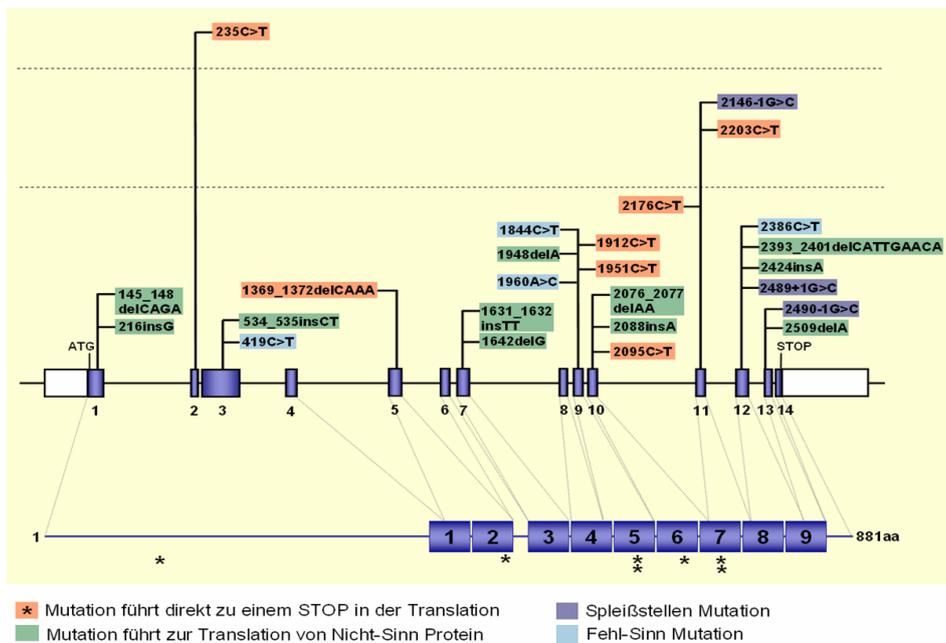


Abbildung 4: Verteilung ARVC assoziierter Mutationen im Plakophilin-2. Dargestellt sind 25 identifizierte Plakophilin-2 Mutationen in ARVC Patienten. Diese Mutationen verteilen sich über die 14 Exons des Plakophilin-2 Gen. Die grauen Striche übertragen die jeweilige Mutation auf die Position in der Plakophilin-2 Proteinstruktur/Armadillo Domäne [Modifiziert von Gerull *et al.*, 2004].

2.3 Proteindegradation

Physiologische zelluläre Prozesse hängen entscheidend von der zeitgerechten Synthese und Degradation von Proteinen ab. Es gibt zwei Hauptabbauege für Proteine in der Zelle, den lysosomalen und den nicht-lysosomalen ATP-abhängigen Abbauege über das Ubiquitin-Proteasom-System. Aufgrund von Genmutationen aber auch unter Stressbedingungen kommt es zu einer Ansammlung fehlgefalteter Proteine, die entweder unspezifisch in den Lysosomen abgebaut werden oder im Zytoplasma dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) zugeführt werden [Glickman *et al.*, 2002]. Zellproteine, die zum spezifischen Abbau bestimmt sind, werden mit dem Protein Ubiquitin markiert. Ubiquitin ist ein relativ kleines, aus 76 Aminosäuren, bestehendes Protein. Diese Markierung geschieht durch drei Gruppen von Enzymen, die hierarchisch geordnet sind. Ein E1 Enzym sorgt durch Kopplung von Ubiquitin an ATP für die Aktivierung von Ubiquitin. Mehrere verschiedene E2 Enzyme leiten Ubiquitin von dem E1 Enzym zu dem Substrat, das an eines von unterschiedlichen E3 Proteinen (Ubiquitin-Protein-Ligasen) gebunden ist, weiter. Das Vorhandensein von verschiedenen E2 und E3 Enzymen scheint die spezifische Erkennung von Proteinen, die zum Abbau bestimmt sind, zu ermöglichen. An das erste proteingebundene Ubiquitin werden in der Regel weitere Ubiquitineinheiten angefügt, so dass eine Polyubiquitinkette entsteht. Das so markierte Protein kann nun durch das 26S Proteasom erkannt und unter Verbrauch von ATP abgebaut werden. Das 26S Proteasom ist ein proteolytisch wirkender Proteinkomplex, der aus den Komponenten 20S und 19S zusammengesetzt ist. Zusätzlich zum lysosomalen Abbauprozess und dem UPS spielen eine Reihe von Proteasen eine entscheidende Rolle bei der spezifischen Degradation von Proteinen. Viele dieser Degradationen haben einen regulierenden Einfluss auf bestimmte zelluläre Prozesse, andere degradieren spezifisch mutierte Proteine im Zytoplasma. Einen wichtigen Einfluss auf die Regulation von Zellmembranproteinen und die kardiale Homöostase haben die Calpain Proteasen [Singh *et al.*, 2004]. Calpaine sind eine Familie von Ca^{2+} -abhängigen Cysteinproteasen, die in vielen intrazellulären Prozessen, wie z.B. die Umsetzung von Zytoskelettproteinen und der Regulation von Kinaseaktivitäten und Transkriptionsfaktoren involviert sind [Goll *et al.*, 2003]. Ihre am häufigsten genannten Mitglieder sind die mikro (μ)- und milli (m)-Calpaine, die nach ihrer jeweiligen zur Aktivierung benötigten Ca^{2+} -Konzentrationen benannt worden sind [Cong *et al.*, 1989]. Die Expression der einzelnen Calpaine sind je nach Gewebetyp und Organismus sehr unterschiedlich [Thompson *et al.*, 2000]. Substrate der Calpaine sind u.a. Zytoskelettproteine wie Spectrin, Talin, α -Actinin, eine Reihe von Membranproteinen einschließlich Rezeptoren von Wachstumsfaktoren (z.B. der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF)), Adhäsionsmoleküle wie Integrin und Cadherin und auch Ionenporter [Goll *et al.*, 2003]. Über den spezifischen Degradationsprozess der membranständigen Desmosomen und der einzelnen desmosomalen Proteine ist bisher wenig bekannt.

2.4 Ziel der Arbeit

Die Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) ist eine seltene Herzmuskelerkrankung, die sich durch charakteristische pathologische Veränderungen, wie den fortschreitenden Ersatz von Herzmuskelgewebe durch Fett- und Bindegewebe, auszeichnet. Die genetische Ursache dieser autosomal dominant vererbten Erkrankung konnte in den letzten Jahren identifiziert werden. Dabei stellte sich heraus, dass heterozygote Mutationen u.a. in allen 5 Genen gefunden wurden, die für kardiale desmosomale Proteine kodieren. Aus diesem Grund steht die Pathologie kardialer Desmosomen durch mutierte Komponente im Mittelpunkt der Forschung zu den Krankheitsmechanismen der ARVC. In ungefähr 45 % der Patienten wurden ARVC-assoziierte Mutationen im Plakophilin-2 (PKP2) Gen identifiziert. Interessanterweise führen 90 % der identifizierten Mutationen zu Trunkierungen des PKP2 Proteins und 10 % zu Punktmutationen, die in der Regel einen signifikanten Aminosäureaustausch zur Folge haben.

Ziel der Arbeit ist die Identifizierung von zugrundeliegenden genetischen, molekularen und zellulären Mechanismen, die ausgehend vom mutierten desmosomalen PKP2-Gen zum charakteristischen klinischen Bild der Erkrankung führen. Aufgrund der gegebenen Komplexität der Erkrankung wird sich vorwiegend auf das Zellkulturmodell beschränkt und dabei ausgehend vom potentiellen genetischen Mechanismus der PKP2 Mutationen, sowohl das Modell eines „dominant negativen“ Mechanismus als auch das Modell des "Funktionsverlust" betrachtet. Folgende Ziele werden im Einzelnen verfolgt:

1. Unter der Hypothese eines "dominant negativen" Mechanismus sollen die Auswirkungen von pathogenen PKP2 Mutationen (mit Fokus auf die p.C796R Mutation) auf die Proteinstruktur und Funktion im desmosomalen Komplex, sowie deren Beeinflussung auf zelluläre Prozesse und molekulare Signalwege untersucht werden. Ziel war es, ausgehend von humanem Patientengewebe, über das Zellkulturmodell bis zum transgenen Mausmodell die Pathogenese von PKP2-Mutationen *in vivo* und *in vitro* zu charakterisieren.

2. Komplementär zum vorangegangenen Ziel und unter der Hypothese, dass das Fehlen einer Kopie des PKP2 Gens (Haploinsuffizienz) zur Erkrankung führen könnte, sollen im zellulären Kardiomyozytenmodell die Auswirkungen des Verlusts von PKP2 via siRNA knockdown auf die desmosomale Struktur, die biomechanische Funktion und die Signaltransduktion *in vitro* charakterisiert werden. Molekulare und funktionelle Analysen von Signaltransduktionswegen und die Applikation von mechanischer Belastung auf die PKP2-defizienten Zellen sollen neue Einblicke in die zugrundeliegenden Mechanismen der Krankheitsentstehung ermöglichen.

3. Ergebnisse

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung von Plakophilin-2 Mutationen und deren Einfluss auf den genetischen sowie molekularen Krankheitsmechanismus der ARVC. Unter der Hypothese eines dominant negativen genetischen Mechanismus wurde im ersten Teil die funktionelle und strukturelle Charakterisierung von pathogenen PKP2 Mutationen *in vitro* und *in vivo* analysiert. Hierfür wurden humane Patientenproben untersucht und Expressionsstudien im Zellkulturmodell sowie in transgenen Mäusen durchgeführt.

Parallel dazu wurden im zweiten Teil die zellbiologischen Auswirkungen des kompletten Verlustes von PKP2 in Kardiomyozyten analysiert. Das verwendete Modell basiert auf der Suppression von PKP2 mittels kurz-interferierender RNAs (siRNA) in kardialen Zellen. PKP2 defiziente Zellen wurden sowohl auf biologische Veränderungen in zellulären Prozessen als auch auf ihre biomechanischen Eigenschaften hin untersucht.

3.1 Charakterisierung von krankheitsverursachenden Mutationen im Plakophilin-2 (PKP2)

3.1.1 Phänotypische und genotypische Charakterisierung einer Familie mit häufig auftretenden Herzrhythmusstörungen

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine Familie mit häufig auftretenden Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien) klinisch und genetisch untersucht (Abbildung 5A). Im Ergebnis klinischer Untersuchungen wurde die 20 Jahre alte Index-Patientin (IV-1) mit Arrhythmogener rechtsventrikulärer Kardiomyopathie (ARVC) auf der Grundlage von Task Force Kriterien (TFC) [Marcus *et al.*, 2010] diagnostiziert. Genomische DNA der Patientin wurde auf Mutationen in bekannten ARVC Krankheitsgenen (fünf desmosomale Gene, Desmin, TMEM43) sequenziert und eine heterozygote Punktmutation c.2386T>C (p.C796R) im Plakophilin 2 (PKP2) Gen identifiziert (Abbildung 5B) [Gerull *et al.*, 2004; den Haan *et al.*, 2009; van Tintelen *et al.*, 2010]. Die Genotypisierungen der mit ARVC diagnostizierten 47-jährigen Mutter (III-1) der Index-Patientin, sowie des 76 Jahre alten Großvaters (II-1) ergaben, dass beide ebenfalls die identifizierte Mutation im Plakophilin-2 tragen. Der Großvater (II-1) verstarb unerwartet nach gastrointestinalen Blutungen. Eine Cousine zweiten Grades (III-4) erlag einem plötzlichen Herztod im Alter von 32 Jahren in Folge körperlicher Anstrengung. Die Autopsie bestätigte ebenfalls eine ARVC.

3.1.2 Heterogene Expressionsprofile endomyokardialer ARVC-diagnostizierter Gewebeproben

Die post-mortem Analyse des Herzens des Großvaters (II-1) ergab aufgrund von histologischen Untersuchungen, dass der normal große rechte Ventrikel (RV) erhebliche Fibrose, starkes Narbengewebe, sowie Entzündungen aufwies ohne bemerkenswertes Auftreten von Fettgewebe. Als seltene Beobachtung wies das rechte Atrium (RA) massives Fettgewebe mit nur vereinzelt verbleibenden Arealen mit Kardiomyozyten auf, welche umgeben waren von fibrösen Bereichen und Narbengewebe (Abbildung 5C).

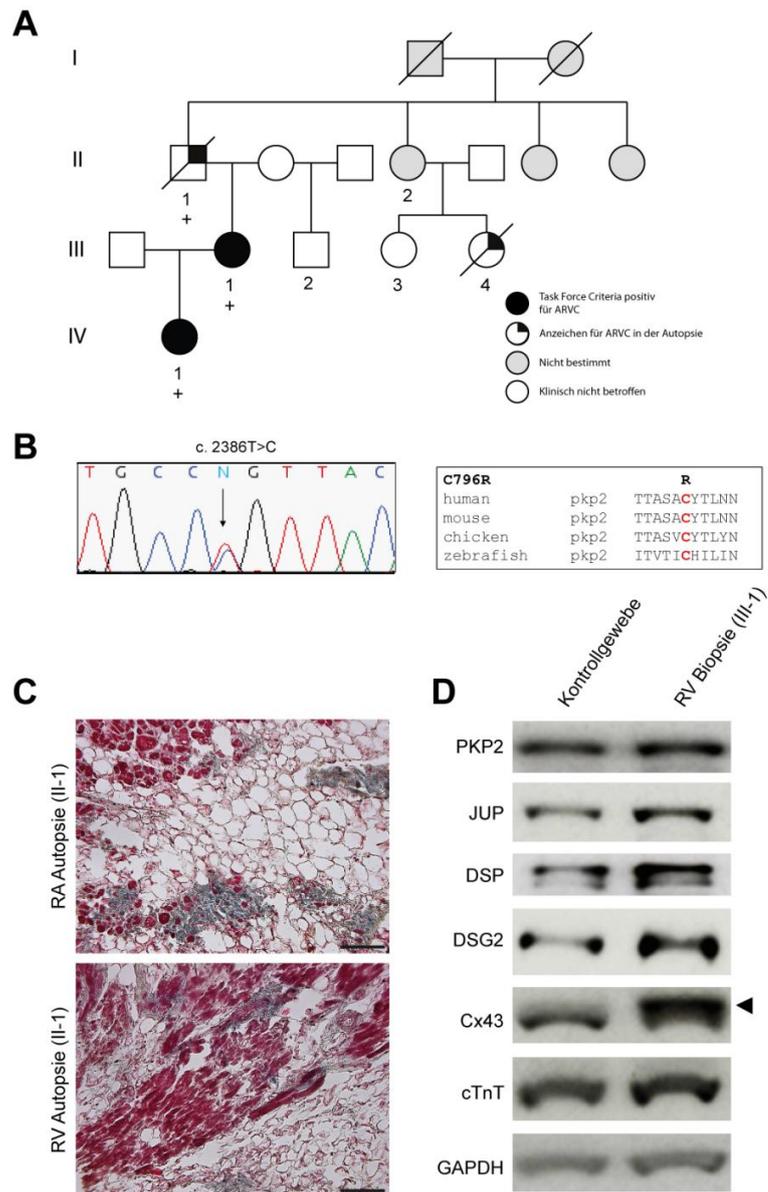


Abbildung 5: Vererbungsschema, kardiale Histologie und Western Blot Analyse der PKP2 Mutation p.C796R

(A) Der Stammbaum einer Familie mit diagnostizierten ARVC Familienmitgliedern zeigt den Erkrankungsstatus und die identifizierten heterozygoten Mutationsträger (+) an. Rechtecke geben das männliche Geschlecht an, Kreise das weibliche Geschlecht. Ein Schrägstrich kennzeichnet verstorbene Familienmitglieder. (B) Das Sequenz-Elektropherogramm zeigt die heterozygote Mutation an Nukleotidposition c.2386 in der analysierten Familie. Die betroffene Aminosäureposition ist evolutionär stark konserviert. (C) Histologische Masson's-Trichrom Färbung des rechten Atriums (RA) und des rechten Ventrikels (RV) einer Autopsie des Probanden II-1. Auffällig ist die massive interstinale Fibrose und das Auftreten von Fettgewebe im RA. Der RV ist in abgeschwächtem Maße ebenfalls betroffen. Vergrößerung x200. Maßstab, 100 µm. (D) Western Blot Analyse einer kardialen Biopsie des RV des Probanden III-1 im Vergleich zu RV Kontrollgewebe. Die Proben wurden auf desmosomale Proteine und Cx43 hin untersucht. Troponin T und GAPDH dienten als Ladekontrolle. Es konnten keine Expressionsunterschiede detektiert werden. Auffällig war jedoch die langsamer laufende Bande des Cx43 in der Probe des Probanden III-1, die auf eine vermehrte Phosphorylierung von Cx43 hindeutet.

Die Western Blot Analyse einer endomyokardialen Biopsie von Patient III-1 zeigte quantitativ gleiche Mengen an PKP2 Protein, im Vergleich zum Kontrollgewebe bei Verwendung eines C-terminalen Antikörpers gegen PKP2. Alle anderen desmosomalen Proteine wiesen ebenfalls keine Expressionsveränderungen im Vergleich zum Kontrollgewebe auf (Abbildung 5D).

Die Immunfluoreszenz Analyse bestätigte diese Beobachtungen und zeigte, dass die Signalstärke sowie die Lokalisation von PKP2 an den Glanzstreifen unverändert war (Abbildung 6A). Alle anderen desmosomalen Proteine, u.a. Plakoglobin (JUP) und Desmoplakin (DSP), zeigten auch in der Immunfluoreszenz keine signifikanten Unterschiede im Expressionsmuster, im Vergleich zum Kontrollgewebe (Abbildung 6B; Anhang Abbildung A1).

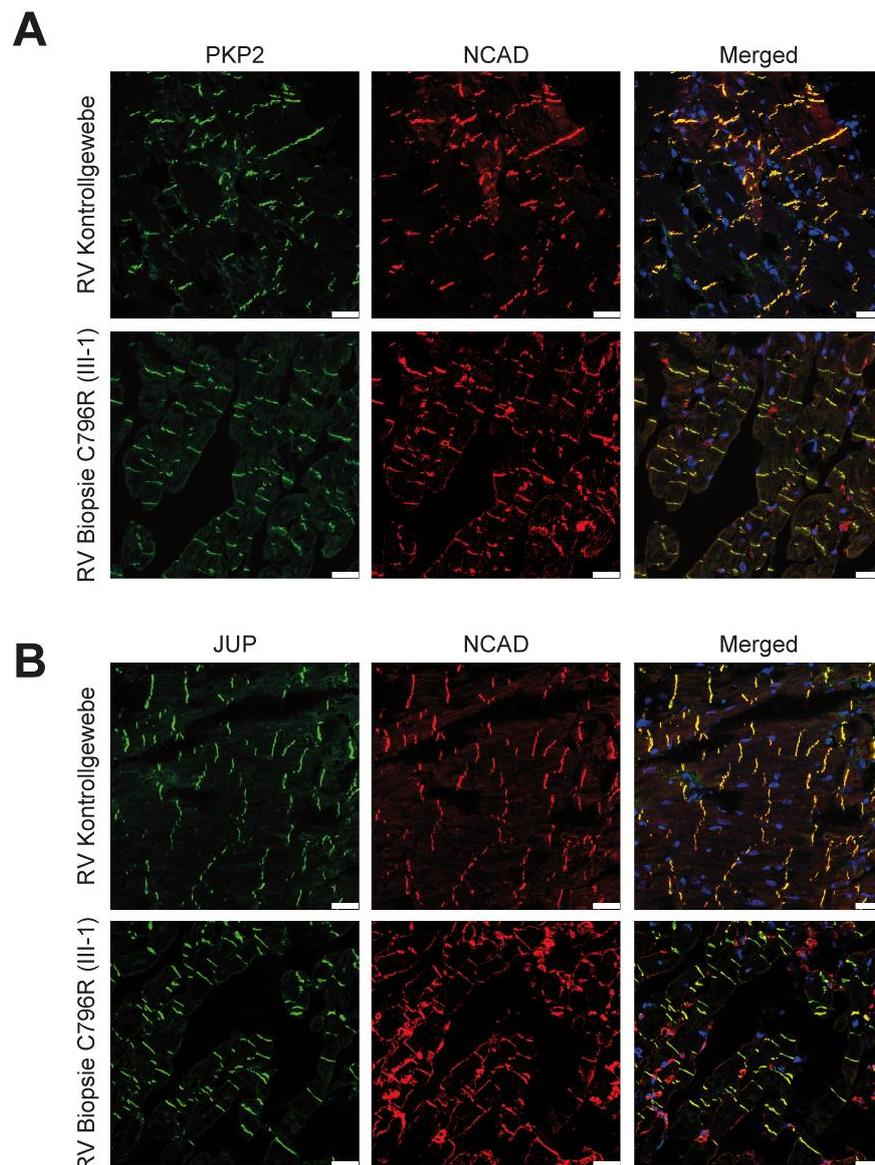


Abbildung 6: Konfokale Immunfluoreszenz-Färbungen einer kardialen Biopsie des Patienten III-1 mit heterozygoter p.C796R PKP2 Mutation

(A) Repräsentativer Gefrierschnitt einer endokardialen Biopsie des Probanden III-1 zeigt eine normale Expression von PKP2 an den Glanzstreifen der Kardiomyozyten, verglichen mit dem Kontrollgewebe. Das Adhäsionsprotein N-Cadherin diente als interne Qualitätskontrolle und konnte in beiden Proben zu gleichen Anteilen detektiert werden. (B) Das Expressionsmuster von JUP zeigte ebenfalls in der Biopsie von Person III-1 keine Veränderungen, verglichen mit dem RV Kontrollgewebe. Maßstab, 25 µm.

Für die Immunofluoreszenz Analyse des rechten Ventrikels (RV) des Patienten II-1 wurden Paraffin-eingebettete Autopsie Gewebeproben aus verschiedenen Arealen des RV verwendet, die zuvor histologisch charakterisiert wurden.

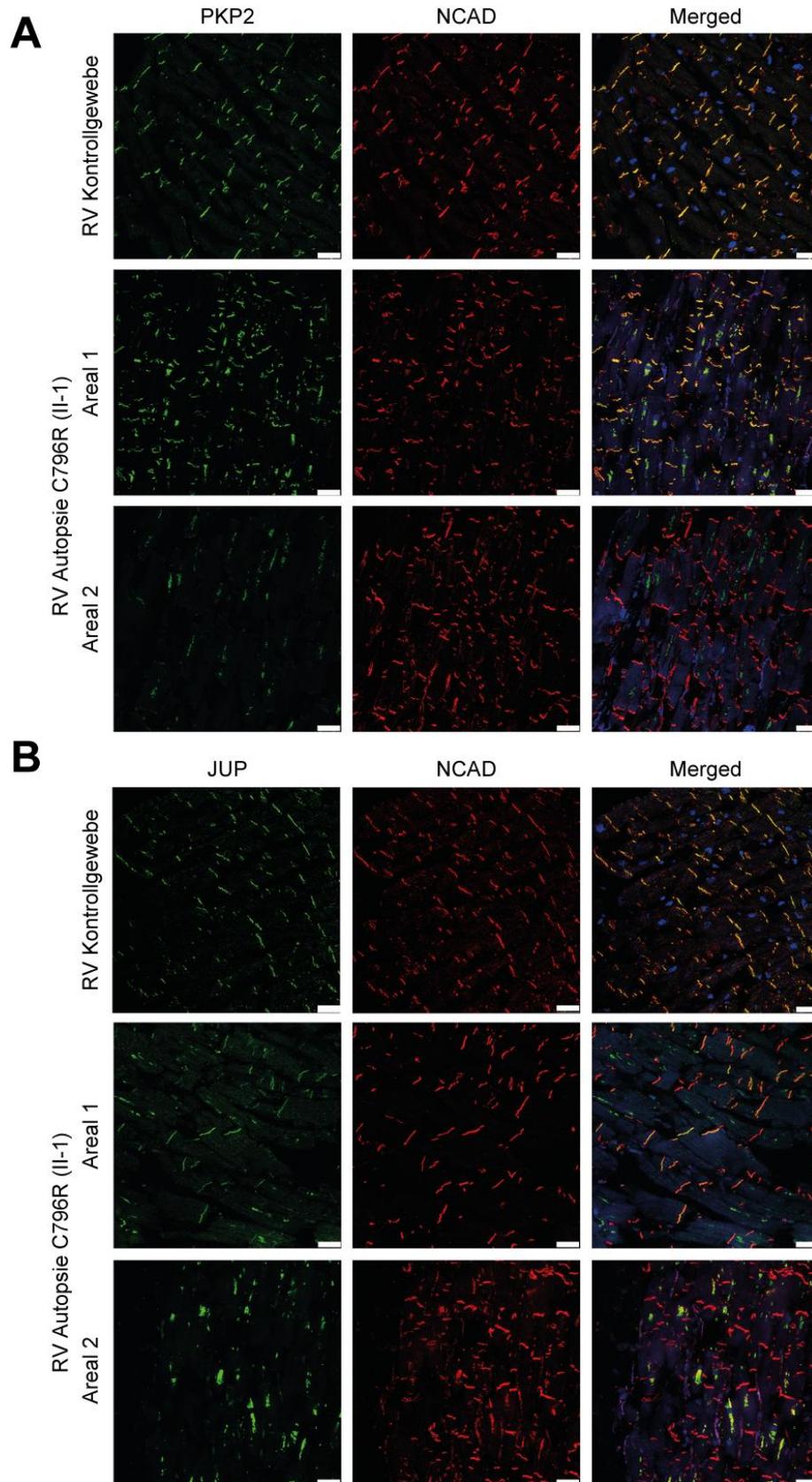


Abbildung 7: Konfokale Immunofluoreszenz-Färbungen einer kardialen Autopsie des Patienten II-1 mit heterozygoter p.C796R PKP2 Mutation.

Im Gegensatz zu der unveränderten Expression von PKP2, JUP und Desmoplakin (DSP) im histologisch nicht betroffenem Myokard (z.B. Areal 1) konnten reduzierte Signalstärken dieser desmosomalen Proteine in Bereichen detektiert werden, die an massive Fibrose angrenzten (Areal 2) (Abbildung 7A und 7B; Anhang Abbildung A2). Die unveränderte Expression des Adhäsionsproteins N-Cadherin diente als interne Qualitätskontrolle. Die desmosomalen Cadherine Desmocollin-2 (DSC2) (Anhang Abbildung A3) und Desmoglein-2 (DSG2) zeigten ebenfalls eine Signalverringering in bestimmten Bereichen des RV.

Zusätzlich zur Analyse der desmosomalen Proteine wurden Veränderungen in dem Gap Junction Protein Connexin 43 (Cx43) untersucht. Western Blot und Immunofluoreszenz Studien der endomyokardialen Biopsie (III-1) zeigten eine verstärkte Expression von phosphoryliertem Cx43, wobei die Signalstärken von totalem Cx43 keine Veränderungen aufwiesen (Abbildung 8A und 8B). Das Autopsie Gewebe (II-1) hingegen wies in allen Bereichen des RV eine geringere Expression von Cx43, im Vergleich zum Kontrollgewebe auf (Anhang Abbildung A4).

Abbildung 7: Konfokale Immunofluoreszenz-Färbungen von kardialen Autopsie von Patient II-1 mit heterozygoter p.C796R PKP2 Mutation

(A) Repräsentativer Paraffin-Schnitt einer Autopsie des RV des Probanden II-1 demonstriert einen deutlichen Verlust des PKP2 Signals an den Glanzstreifen im Areal 2, während N-Cadherin sowohl in der Probe von II-1 als auch im Kontrollgewebe normal exprimiert ist. Im Gegensatz dazu ist keine Veränderung der PKP2 Expression im Areal 1 des gleichen Ausschnitts nachzuweisen, verglichen mit dem RV Kontrollgewebe.

(B) Im Gewebe des Patienten II-1 ist das Expressionsmuster von JUP im Areal 2 im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert, wohingegen keine Veränderung des JUP Signals in Areal 1 des gleichen Schnittes detektiert werden kann. Die Expression von N-Cadherin ist in allen Proben nicht betroffen. Maßstab, 25 µm.

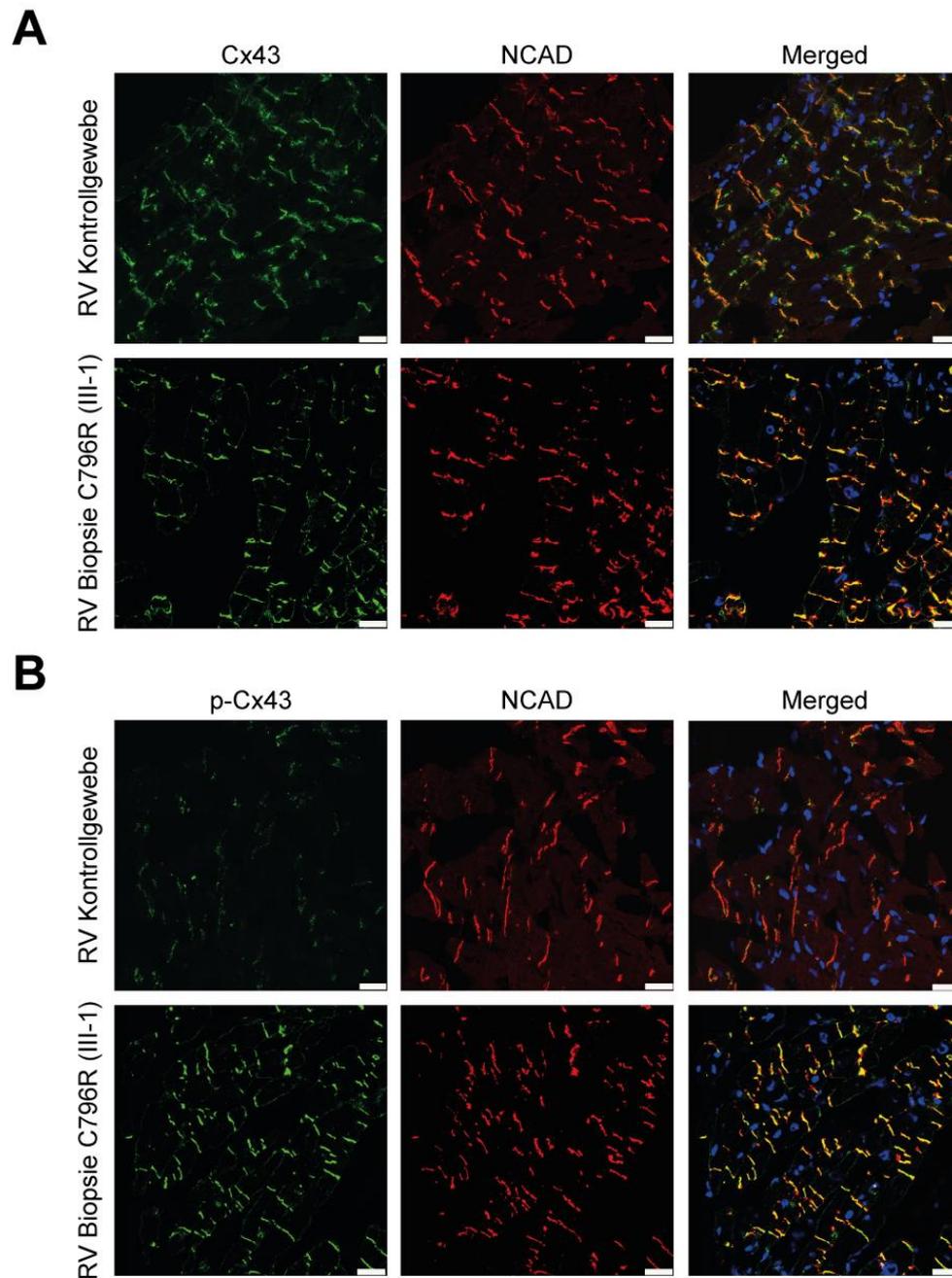


Abbildung 8: Konfokale Immunfluoreszenz-Färbungen von Gap Junction Proteinen im Patienten III-1

(A) Die Analyse des gesamten Gap Junction Proteins Cx43 ergab keinen Unterschied zwischen beiden Proben, wohingegen die phosphorylierte Form an Position Serin 368 im Cx43 (B) ein deutlich verstärktes Signal in der Biopsie des Patienten III-1, im Vergleich zum Kontrollgewebe aufzeigte. NCAD diente als interne Qualitätskontrolle. Maßstab, 25 μm .

3.1.3 *In vitro* Charakterisierung von pathogenen PKP2 Mutationen

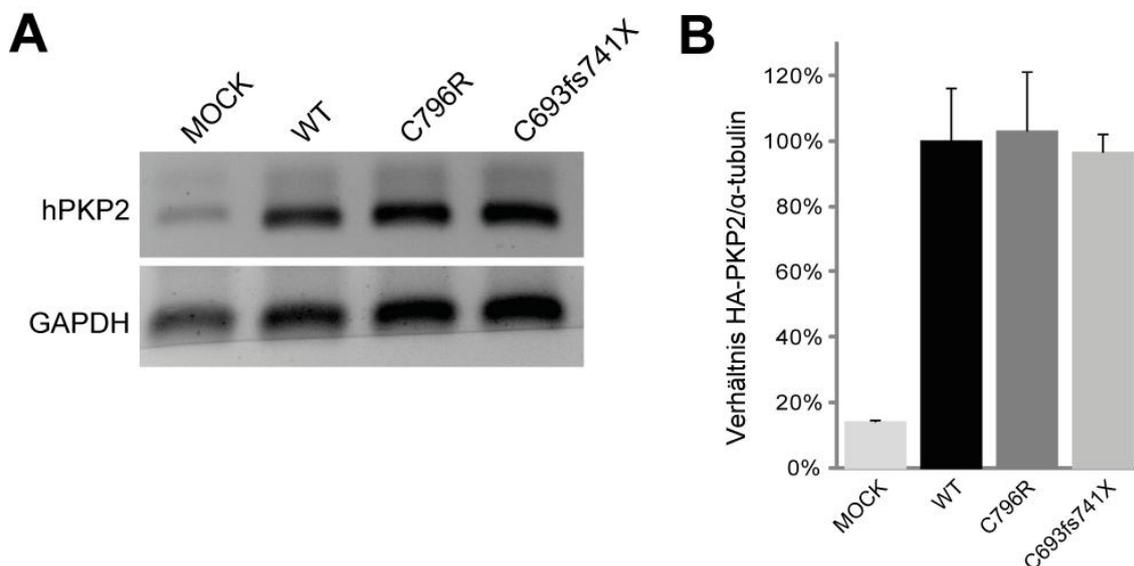
Für die Charakterisierung von Plakophilin-2 Mutationen auf RNA und Protein Ebene wurden kardiale HL-1 Zellen [Claycomb *et al.*, 1998; White *et al.*, 2004] bzw. epitheliale HeLaM2 Zellen [Gossen *et al.*, 1998] mit Konstrukten, die für das HA-markierte PKP2 Wildtyp (HA-PKP2-WT) bzw. das mutierte PKP2 (z.B. HA-PKP2-C796R) Protein kodierten transient transfiziert. Die Expression der Konstrukte in den Zellen basierte auf dem Doxycyclin induzierbaren Tet-On System. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand die zuvor in humanem Gewebe analysierte p.C796R Mutation. Andere Plakophilin-2 Varianten dienten als Kontrollen für Experimente oder zur Bestätigung von Ergebnissen.

3.1.3.1 Mutationen im PKP2 sind auf mRNA Ebene stabil exprimiert

Die Analyse der mRNA Transkription zeigte, dass sowohl die mRNA der untersuchten Punktmutation (p.C796R) als auch die einer Frameshift-Mutation (p.C693fsX741) stabil transkribiert wird (Abbildung 9A und 9B). Der Einfluss des Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) Mechanismus konnte somit ausgeschlossen werden.

Abbildung 9: RNA Stabilität verschiedener PKP2 Mutationen

(A) RT-PCR zur Analyse der RNA Stabilität von transfizierten Mutationen im PKP2 in HeLaM2 Zellen. Im Gegensatz zu MOCK-transfizierten HeLaM2 wurden sowohl der PKP2-WT als auch die beiden Mutationen auf RNA Ebene identisch stabil transkribiert. Die RNA Level von GAPDH dienten als Ladekontrolle. (B) Quantitative densitometrische Bestimmung werden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. $n=3$.



3.1.3.2 Instabilität des mutierten PKP2 Proteins und Dissoziation von den Zell-Zellgrenzen

Die weiterführende Western Blot Analyse der PKP2 Mutation (HA-PKP2-C796R) konnte eine signifikante Reduktion des Protein Expressionsniveaus (30.5 ± 2.4 % des HA-PKP2 WT; $p < 0.001$), im Vergleich zum PKP2-WT Protein zeigen (Abbildung 10B und 10C). Des Weiteren demonstrierten Immunofluoreszenz Analysen des mutierten PKP2 ein diffuses Expressionsmuster im Zytoplasma mit einer Akkumulation um den Zellkern, wohingegen das PKP2-WT Protein die erwartete exklusive Lokalisation an der Zellmembran aufwies (Abbildung 10D).

Das mutierte PKP2 Protein hatte jedoch keinen Einfluss auf die Ausbildung von Zell-Zellkontakten sowie auf die Expression anderer endogener Adhäsions- und desmosomaler Proteine, wie N-Cadherin bzw. JUP (Abbildung 10E).

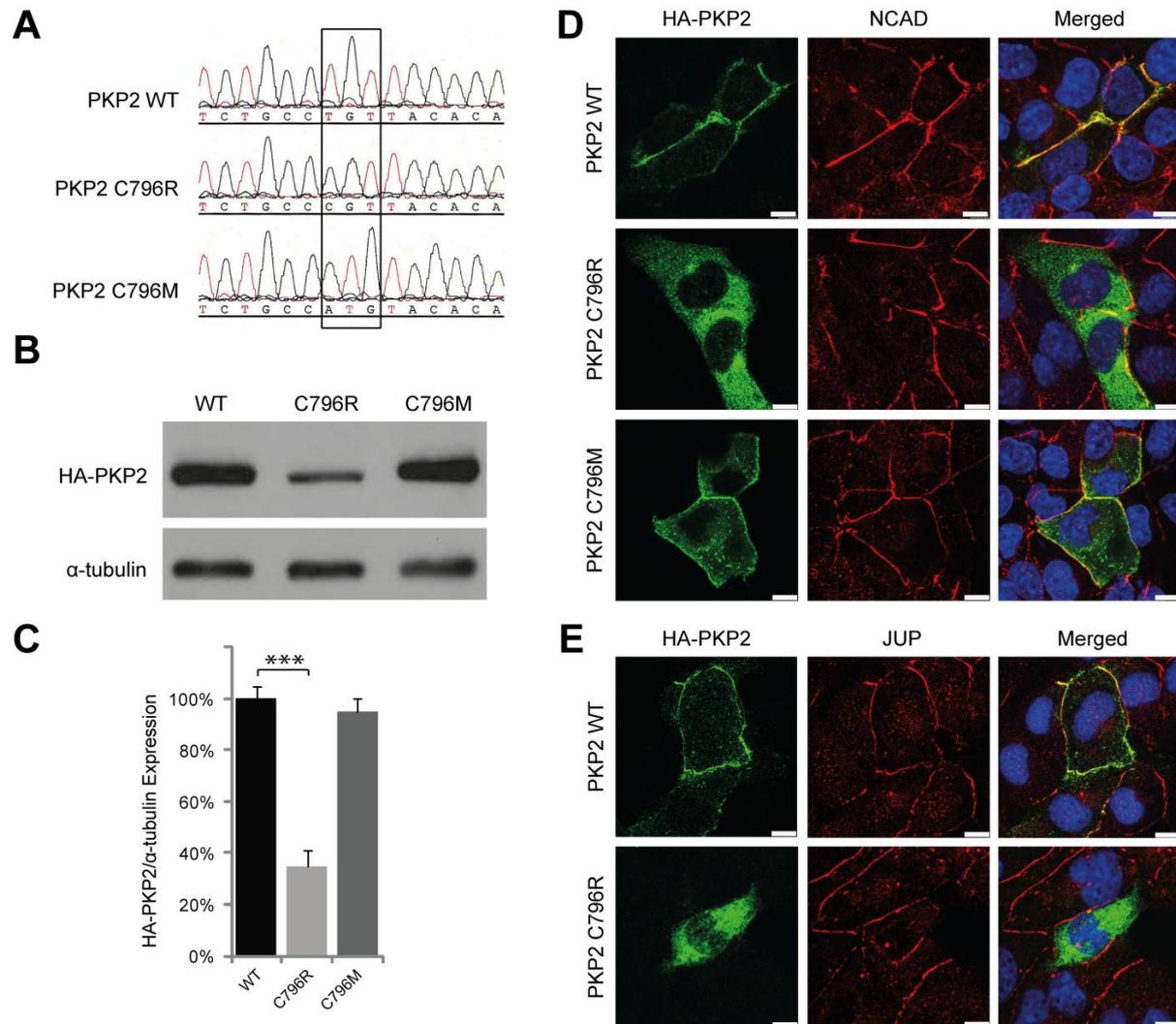


Abbildung 10: *In vitro* Expressionsstudie des transgenen HA-PKP2-C796R Mutation in HL-1 Zellen

(A) Das Sequenz-Elektropherogramm zeigt das WT Allel (oben) und das mutierte Allel (Mitte), bei dem das T zu einem C an Position c.2386 ausgetauscht ist und dies zu einer Proteinänderung p.C796R führt. Das untere Elektropherogramm demonstriert den Codon Austausch von TGT zu ATG an Position c.2386-2388, resultierend in einem Aminosäureaustausch von Cystein zu Methionin an Position 796. (B) Western Blot Analyse der exprimierten WT und mutierten HA-PKP2 Proteine. α-Tubulin dient der Ladekontrolle. Die Proteinexpression der HA-PKP2-C796R Mutation ist signifikant geringer, verglichen mit der Expression des WT und der C796M Mutation. (C) Quantitative densitometrische Bestimmung werden als Mittelwerte ± SEM dargestellt. ***p < 0.001. n=4. (D) Konfokale Immunofluoreszenz Analyse der Expression von PKP2 WT, C796R und C796M in HL-1 Zellen, die entweder zusammen mit N-Cadherin oder JUP gefärbt sind. Der PKP2 WT sowie das PKP2 C796M Protein lokalisieren an Zellmembran, wohingegen die C796R Mutation diffus im Zytoplasma mislokalisiert. Sowohl N-Cadherin als auch JUP unterliegen keinen Veränderungen. n=3. Maßstab, 7,5 μm.

Die *in silico* Analyse der PKP2 Mutation p.C796R ergab eine postulierte Beeinflussung der Proteinstabilität durch den Aminosäure Austausch von einem Cystein (C) zu einem Arginin (R) in Position 796 des PKP2 Proteins. Dagegen würde ein schwefeltragendes Methionin (M) in derselben Position keinen Zerfall des Proteins bewirken. (Abbildung 10A; Anhang Tabelle A1). Die Überprüfung der *in silico* Daten *in vitro* ergab, dass die Methionin-Mutante (HA-PKP2-C796M) im Gegensatz zur Arginin-Mutante eine normale Lokalisation an der Zellmembran aufwies und gleiche Mengen an stabilem Protein im Vergleich zum PKP2 WT Protein zeigte (Abbildung 10B und 10D). Der spezifische Einbau der Aminosäure Arginin in Position 796, anstelle des Cysteins, könnte aufgrund des Fehlens der Schwefelgruppe bzw. einer neuartigen Interaktion des basischen Restes des R mit anderen Aminosäure Restgruppen für die Instabilität des mutierten Proteins verantwortlich sein.

3.1.3.3 Weitere pathogene PKP2 Mutationen führen zu Proteininstabilität, Degradation und zytoplasmatischer Lokalisation

Um festzustellen, ob auch andere Mutationen in den Armadillo-Wiederholungsdomänen des PKP2 ähnliche Effekte auf die Proteinstabilität und die sub-zelluläre Lokalisation zeigen, wie die untersuchte PKP2 p.C796R Mutation, wurden weitere pathogene Punktmutationen, Deletionsmutationen sowie zwei unklassifizierte Varianten in epithelialen HeLaM2 Zellen exprimiert und analysiert. Dieser Expressionsstudie ging eine *in silico* Analyse der möglichen Auswirkungen auf die Proteinstabilität und Funktion voraus, die mit Hilfe von Algorithmen wie PolyPhen-2 und SIFT [Adzhubei *et al.*, 2010; Ng *et al.*, 2003] durchgeführt wurden. Andere Parameter wie phylogenetische Konservierung und die Häufigkeit dieser Varianten in Kontrollpopulationen wurden bestimmt. Die *in silico* Analyse ergab, dass die PKP2 Varianten: p.C796R, p.S615F, p.C693fsX741 und p.K654Q als sehr wahrscheinlich krankheitsverursachend klassifiziert wurden, wohingegen die Varianten p.V587I und p.I531S als Varianten unbekannter Signifikanz (VUS), wahrscheinlich nicht krankheitsverursachend eingestuft wurden (Anhang Tabelle A1). Die *in vitro* Expressionsstudie in HeLaM2 Zellen bestätigte die Daten der *in silico* Analyse. Als pathogen klassifizierten Varianten wiesen, im Vergleich zum HA-PKP2-WT Protein ($100 \pm 4,1$ %), eine signifikant geringere Proteinexpression der mutierten HA-PKP2 Proteine auf (C796R: 14.5 ± 3.0 %, C693fsX741: 14.8 ± 2.3 %, S615F: 18.4 ± 1.1 %, K654Q: 13.6 ± 2.7 %) und zeigten eine zytoplasmatische Lokalisation. Im Gegensatz dazu wiesen beide VUS eine stabile Proteinexpression auf (I531S: 74.5 ± 13.9 %, V587I: 103.4 ± 3.2 %) und lokalisierten an der Zellmembran (Abbildung 11A-C).

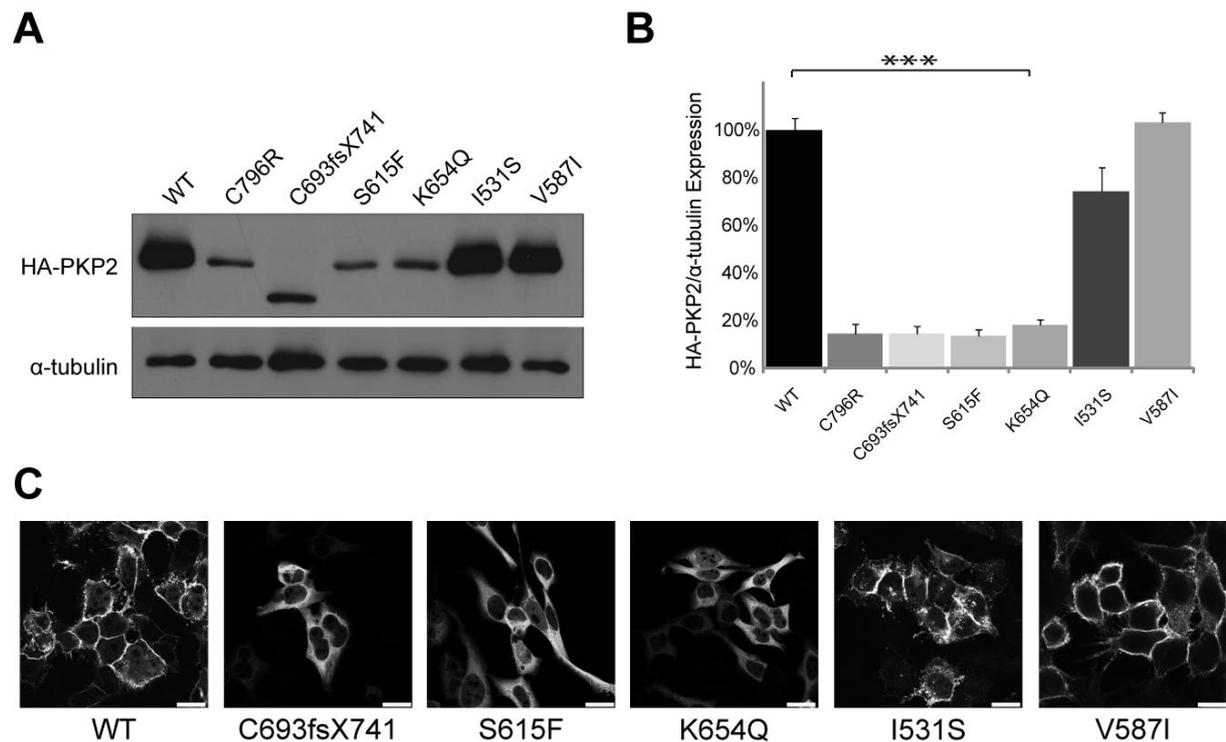


Abbildung 11: *In vitro* Proteinexpression Analyse von verschiedenen PKP2 Mutationen in HeLaM2 Zellen

(A) Western Blot Analyse von PKP2 WT und verschiedenen mutierten PKP2 Proteinen. Die Expressionslevel der mutierten Proteine: C796R, C693fsX741, S615F und K654Q sind alle signifikant reduziert, wohingegen die Polymorphismen, I531S und V587I, vergleichbare Proteinlevel aufweisen wie das WT Protein. (B) Die Proteinquantität wird mittels quantitativer densitometrischer Bestimmung der HA-PKP2/ α -Tubulin Verhältnisses als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *** $p < 0.001$. $n = 3$. (C) Repräsentative Immunofluoreszenz Aufnahmen demonstrieren eine Lokalisation der WT und I531S sowie V587I HA-PKP2 Proteine an der Zellmembran, während die mutierten HA-PKP2 Proteine alle ein zytoplasmatisches Expressionsmuster aufweisen. Maßstab, 10 μ m.

3.1.3.4 Gestörte Interaktion von mutierten PKP2 Proteinen mit dem desmosomalen Bindungspartner Desmoplakin

Frühere Arbeiten in epithelialen Zellen demonstrierten, dass Desmoplakin (DSP) mit seiner N-Terminalen Domäne an die N-terminale Kopfdomäne von PKP2 bindet und Plakophilin-2 somit das Verbindungsprotein einerseits zwischen DSP und den Intermediärfilamenten und andererseits den desmosomalen Cadherinen darstellt. [Mertens *et al.*, 1996; Bass-Zubek *et al.*, 2008]. Um die funktionelle Interaktion von mutierten HA-PKP2 Proteinen mit DSP zu untersuchen, wurden Desmosom-defiziente HeLaM2 Zellen verwendet, in denen die Expression des FLAG markierten DSP Konstrukts zu einer Akkumulation des Proteins im Zytoplasma führte (Abbildung 12A). Die Co-Transfektion beider Wildtyp Konstrukte (PKP2-WT und FLAG-DSP-WT) hingegen zeigte einen Einbau beider Proteine in die Zellmembran. Im Gegensatz dazu führte die Co-Transfektion von FLAG-DSP WT und der Missense-Mutation HA-PKP2-C796R zu keiner Interaktion beider Proteine, die somit diffus im Zytoplasma lokalisieren. Des Weiteren zeigten Versuche mit weiteren pathogenen Punkt- und Deletionsmutationen (C693fsX741, S615F) die gleiche gestörte Interaktion mit FLAG-DSP.

Hingegen nach Co-Transfektion der Varianten I531S und V587I konnte eine Interaktion mit FLAG-DSP nachgewiesen werden, da beide Proteine in der Lage waren an der Zellmembran zu lokalisieren (Abbildung 12B). Zusammenfassend zeigte sich, dass die pathogenen Mutationen im PKP2 zu funktionellen Störungen der Interaktion mit DSP führen. Es lässt sich somit vermuten, dass Aufbau und Funktion der Desmosomen beeinträchtigt werden.

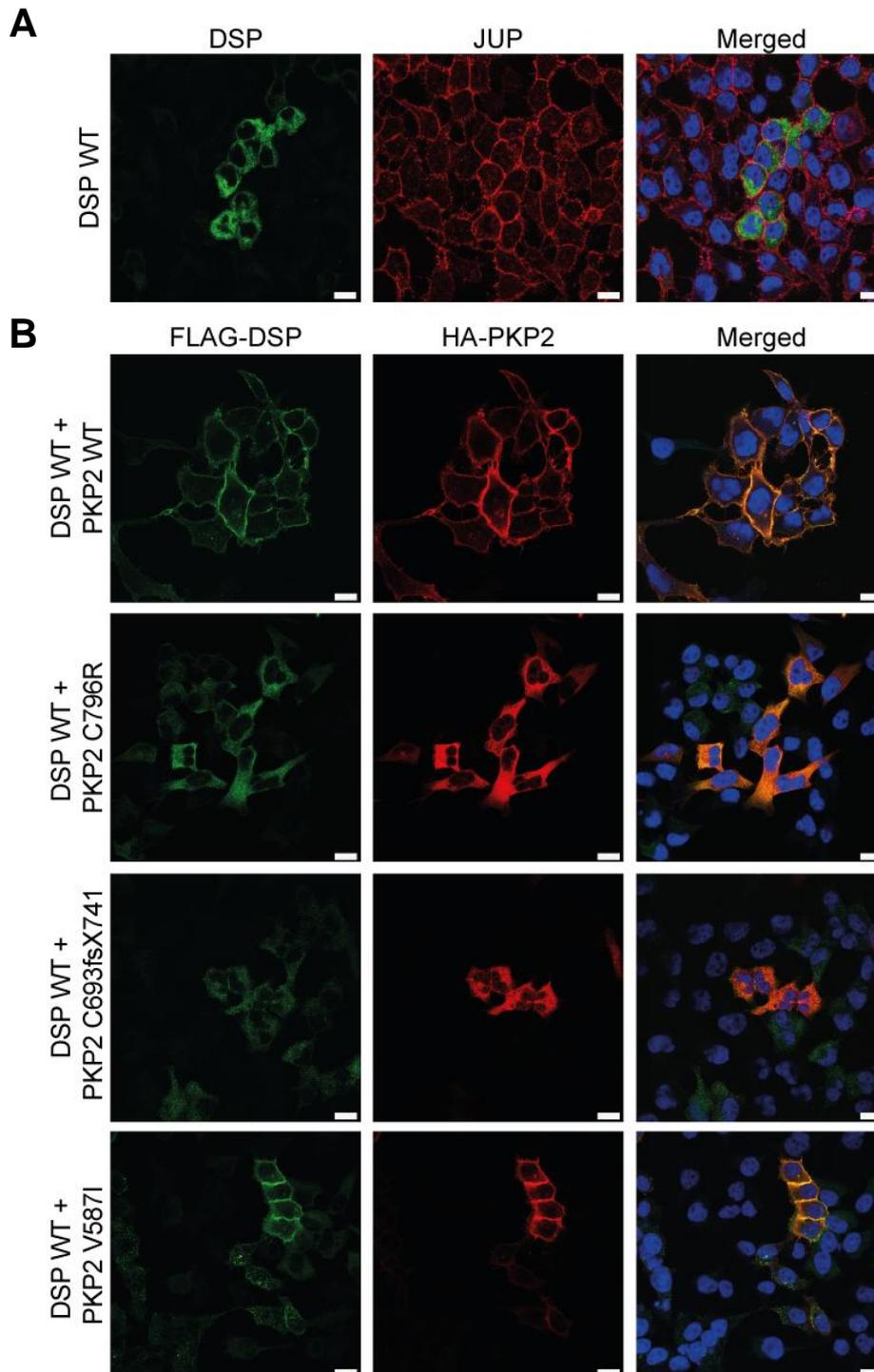


Abbildung 12: *In vitro* Interaktionsstudie von mutiertem PKP2 mit dem Bindungspartner DSP in HeLaM2 Zellen →

3.1.3.5 Bakterielle Expressions- und Strukturanalysen von mutierten PKP2 Armadillo-Domänen bestätigen Proteininstabilität und Degradation

Strukturell setzt sich PKP2 aus einer N-terminalen Kopfdomäne und einer C-terminalen Armadillo (Arm) Domäne mit neun Armadillo-Wiederholungs-Domänen zusammen. Um Auswirkungen von ARVC-assoziierten Mutationen in den Arm Domänen des PKP2 auf Struktur und Stabilität zu untersuchen, wurden Proteinstruktur- und Stabilitätsanalysen sowie ein Modelling der Arm Domänen des PKP2a WT und verschiedener Mutationen durchgeführt. Eine Kristallisierung des gesamten PKP2a Proteins schlug aus Löslichkeits- und strukturtechnischen Gründen fehl. Es wurde für die bakterielle Expression und Kristallisierung die im Herzen dominante PKP2a Isoform verwendet, die 44 AS kürzer ist, als die längere PKP2b Isoform. Aus diesem Grund ändert sich die Nummerierung der AS Abfolge. Aus der p.C796R Mutation wird folglich die p.C752R Mutation (-44 AS) in der PKP2a Isoform. Die gleiche Änderung (-44AS) in der Nummerierung erfolgte für jede andere Variante.

Die bakterielle Expressionsstudie demonstrierte, dass sowohl die PKP2a WT Arm Domäne als auch die potentiellen nicht-pathogenen Varianten I487S und V543I stabil exprimiert wurden und aufgereinigt werden konnten. Im Gegensatz dazu resultierten sowohl Punkt- als auch Deletionsmutationen in den PKP2a Arm Domänen in instabilen Proteinen, die trotz Zugabe von Protease Inhibitoren degradierten. Interessanterweise konnte ein stabiles Fragment gleicher Größe in allen drei untersuchten Mutationen detektiert werden (Abbildung 13).

Abbildung 12: *In vitro* Interaktionsstudie von mutiertem PKP2 mit dem Bindungspartner DSP in HeLaM2 Zellen (A) Repräsentative konfokale Immunfluoreszenz von exogen exprimierten DSP-FLAG in Desmosom-defizienten HeLaM2 Zellen in Gegenfärbung mit endogenem JUP. Das DSP-FLAG mislokalisiert diffuse im Zytoplasma. (B) Immunfluoreszenz Analysis von co-transfizierten HeLaM2 Zellen mit DSP-FLAG und HA-PKP2 WT bzw. Varianten. Auffällig ist, dass sowohl der HA-PKP2 WT als auch die Variante V587I zusammen mit DSP-FLAG an der Zellmembran co-lokalisieren, während die Co-Transfektion mit den HA-PKP2 Mutationen (C796R und C693fsX741) keine DSP-FLAG Lokalisation an der Membran zeigt, sondern zusammen mit den mutierten PKP2 Proteinen im Zytoplasma akkumulieren. n=3. Maßstab, 10 µm

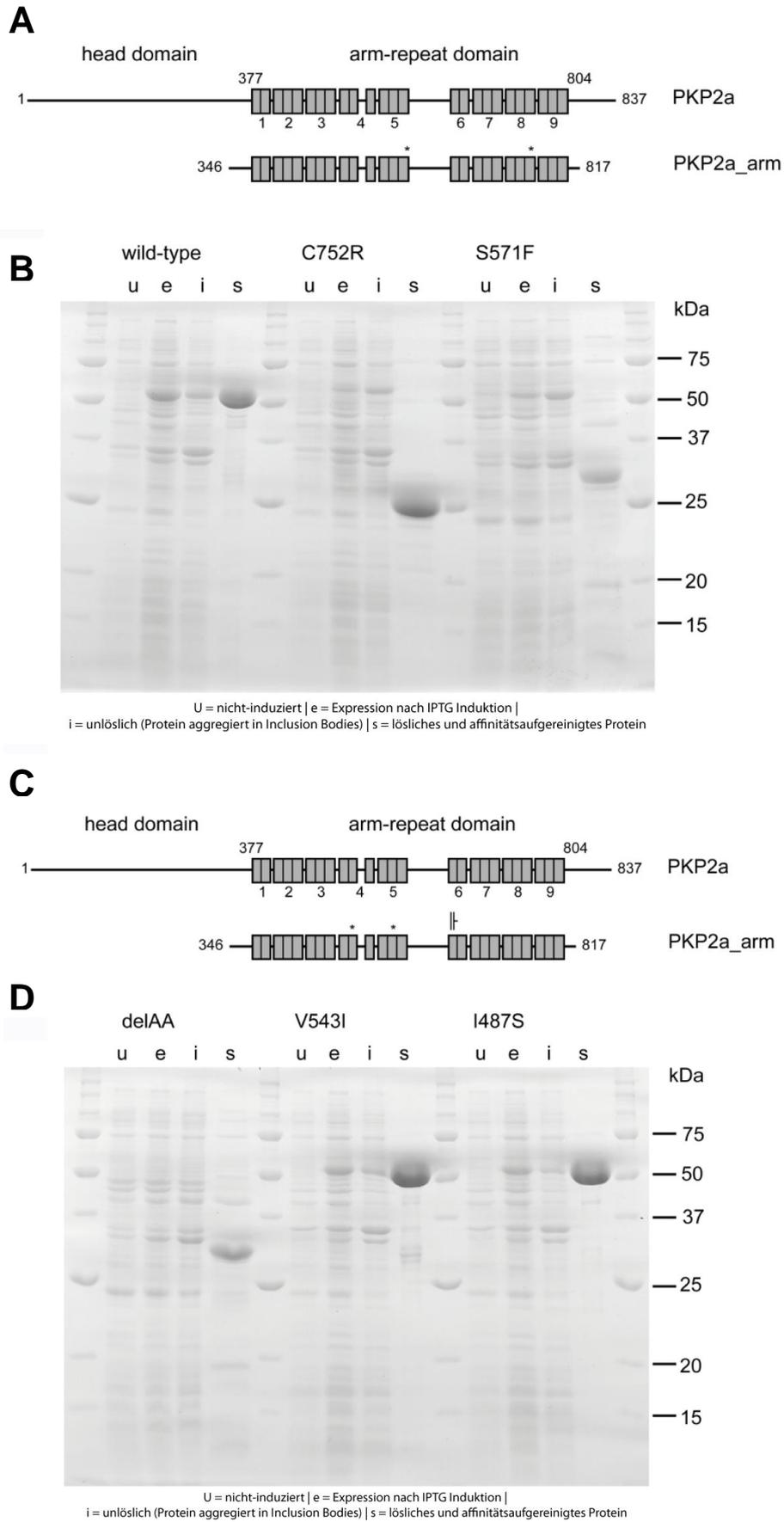


Abbildung 13: Bakterielle Expression verschiedener humaner PKP2a Varianten →

Diese stabilen Arm Domänenfragmente wurden aufgereinigt und mittels Massenspektrometrie analysiert. Es ergab sich jeweils ein stabiles Proteinfragment, welches halb so groß wie der PKP2a-WT war (Anhang Abbildung A5). Die Sequenz entsprach der Aminosäureabfolge der ersten fünf Arm-Wiederholungs-Domänen. Im Weiteren war es möglich, sowohl die gesamte PKP2a Arm Domäne als auch erstmals das stabile Fragment der PKP2a Arm Domänen Variante p.C752 zu kristallisieren (Abbildung 14A). Die Strukturmodellierung wurde durch molekularen Austausch auf der Grundlage der atomaren Koordinaten der homologen humanen PKP1 Arm Domänen Struktur durchgeführt (Anhang Tabelle A2).

Das finale Modell beinhaltet die Aminosäurereste 346-576 plus zwei weitere AS (Gly-Ser) am N-terminalen Teil, die von der Sequenz der His-Markierung stammen. Die Arm-Wiederholungs-Domänen von PKP2 ähneln denen anderer Armadillo-Proteine und bestehen überwiegend aus 3 Helices (H1, H2 und H3), die zusammen ein kompaktes helikales Bündel bilden (Anhang Abbildung A6a-A6c) [Peifer *et al.*, 1994; Andrade *et al.*, 2001; Huber *et al.*, 1997; Striegl *et al.*, 2010].

Für das Verständnis der Destabilisierung und Degradation der ARVC-assoziierten PKP2 Mutationen, die weiter C-Terminal lokalisiert sind und damit außerhalb des kristallisierten Fragmentes liegen, wurde ein Modell der vollständigen Struktur der Arm Domänen entwickelt. Für die Vorhersage wurde die Kristallstruktur des stabilen Fragmentes der p.C752 Variante verwendet und die Struktur des humanen PKP1 als Matrize genutzt. Daraus resultierte ein Modell der gesamten Arm-Domänen des PKP2a mit neun Arm-Wiederholungs-Domänen (R1-R9), bestehend aus drei α -Helices (H1, H2, und H3) mit Ausnahme der Arm-Wiederholungs-Domänen R1 und R6, bei denen die H1 Helix fehlte (Abbildung 14B). Die ARVC-assoziierte Position C752 ist in der H3 Helix der 8. Arm-Wiederholungsdomäne lokalisiert (Abbildung 13A; Anhang Abbildung A7). Die Seitenkette dieses Aminosäurerestes formt ein hydrogenes Band mit dem Sauerstoffatom der Carbonyl-Hauptkette an Position T748. Anschließend wird dieses hydrogenes Band an das Amid des Rückgrates von C752 mit dem Sauerstoffatom der Carbonyl-Hauptkette von T748 verbunden. Dies führt zu einer intra-helikalen Stabilisierung der H3 (Anhang Abbildung A6D). In der ARVC-assoziierten C752R Variante kollidiert die lange und wuchtige Arginin Seitenkette zum einen mit der Seitenkette von I781 in H2 und zum anderen mit dem Sauerstoffatom der Carbonyl-Hauptkette an Position A792 in H3 der 9. Arm-Wiederholungs-Domäne (Abbildung 14D).

Abbildung 13: Bakterielle Expression verschiedener humaner PKP2a Varianten

(A) Die Arm-Wiederholungs-Domänen des PKP2a-WT und verschiedener Varianten. Die Sterne markieren die spezifische Position der entsprechenden Mutationen (S571F, C752R). Die Zahlen geben die Aminosäureposition an. (B) Expression und Aufreinigung der humanen PKP2a-WT Arm-Domänen und anderer Varianten. Die Proteine wurden als N-terminale His7-markierte Fusionsproteine exprimiert und mit Hilfe der Affinitätsaufreinigung aufbereitet. Die Stabilität der resultierenden Proteine variierte aufgrund der enthaltenen Mutationen. (C) Die Arm-Wiederholungs-Domänen der PKP2a Deletionsmutation und zwei verschiedener Varianten. Die Sterne markieren die spezifische Position der entsprechenden Variation (I487S, V543I). Die Zahlen geben die Aminosäureposition an. (D) Expression und Aufreinigung der humanen PKP2a Arm-Domänen der Deletionsmutation und anderer Varianten. Die Stabilität der resultierenden Proteine variierte aufgrund der enthaltenen Mutationen. Mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Anja Schütz (Max-Delbrück-Centrum - AG Heinemann).

Diese Auswirkungen und die ausbleibende intra-helikalen Stabilisation führen zur Destabilisierung und Degradation des Proteins der C752R Variante, resultierend bleibt das stabile Fragment (Abbildung 14A; Anhang Abbildung A5). Der ebenfalls ARVC-assoziierte Aminosäurerest S571 ist in Helix H3 der 3. Arm Wiederholungsdomäne lokalisiert (Abbildung 14A; Anhang Abbildung A7). Die Seitenkette ist sowohl hydrogen an die Seitenkette des Y642 in Arm6-H2 als auch an das Sauerstoffatom der Carbonyl-Hauptkette von L567 in Arm5-H3 gebunden. Diese Interaktionen führen zu einer inter- und intra-helikalen Stabilisation. Der ARVC-assoziierte S571F Austausch zerstört diese Interaktionen durch die lange und wuchtige Phenylalanin Seitenkette und führt ebenfalls zur Destabilisierung und Degradation des F571 Proteins bis sich das stabile Fragment formiert (Abbildung 14C; Anhang Abbildung A6E). Die Deletionsmutation C649fs697 beginnt direkt nach der Helix H2 von Arm6 (Anhang Abbildung A7). Aus diesem Grund kann möglicherweise keine inter-Arm-Wiederholungsdomäne Stabilisierung erfolgen und somit die Bildung des gleichen stabilen Fragmentes erklärt werden (Anhang Abbildung A5). Derartige strukturelle Veränderungen konnten für die Varianten V543I und I487S nicht festgestellt werden. Sie verhielten sich wie das PKP2a-WT Protein.

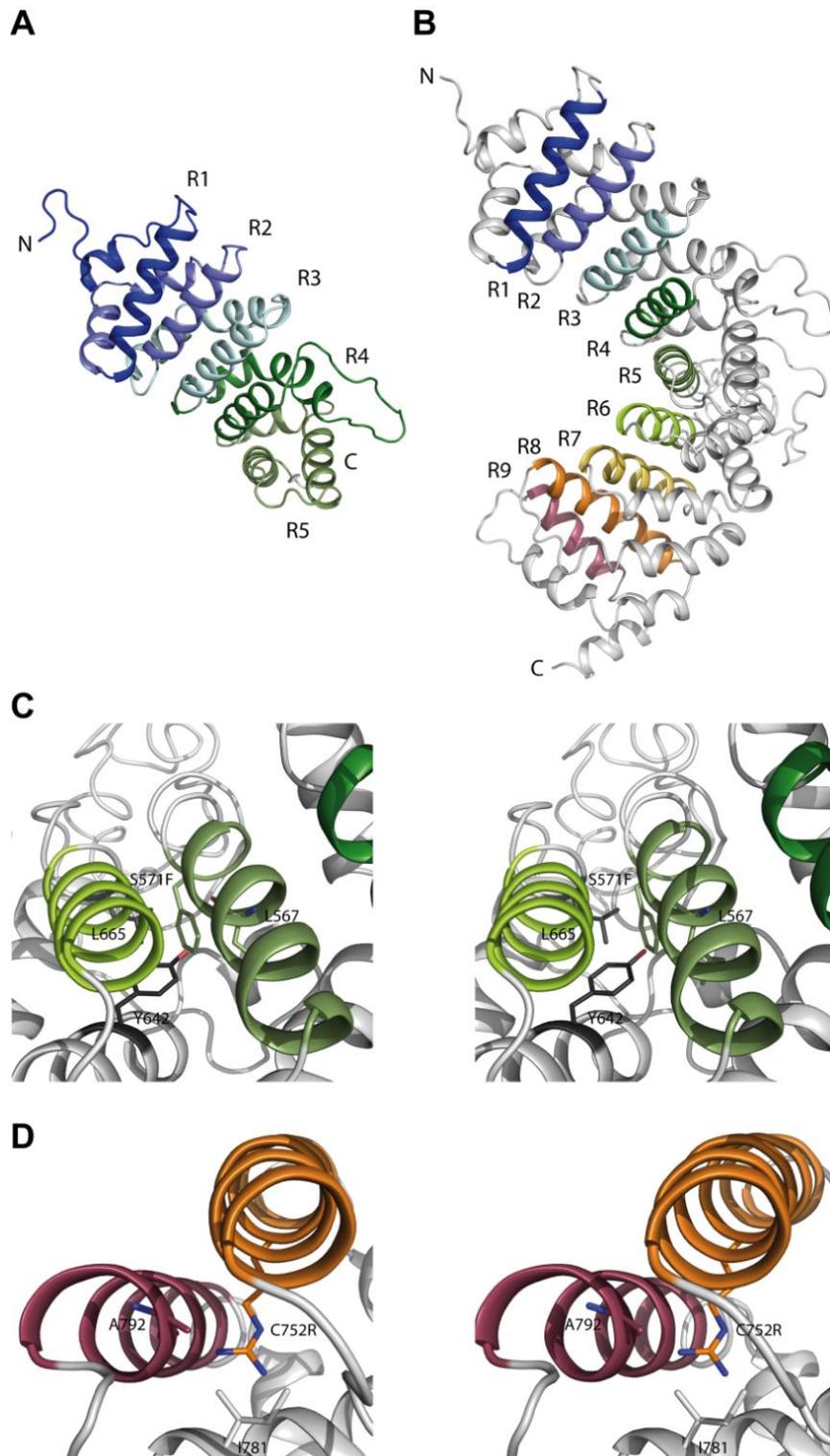


Abbildung 14: Strukturelle Analyse der Arm-Wiederholungs-Domänen des PKP2a

(A) Kristallstruktur des stabilen Fragmentes der Arm-Domäne der humanen PKP2a-C752R Variante. Das N- und C-terminale Ende des Proteins ist mit N bzw. C gekennzeichnet. Die Arm-Wiederholungen sind verschiedenfarbig markiert. (B) Die Gesamtfaltung der vollständigen prognostizierten humanen PKP2a Arm-Domäne. Die Helix H3 jeder Arm-Wiederholung ist hervorgehoben. Die lokalen Auswirkungen der krankheitsbedingenden Mutationen S571F in Arm5 (C) und C752R in Arm8 (D) sind in stereographischer Darstellung gezeigt und demonstrieren die sterische Hinderung, die zur Proteininstabilität und Degradation führt. Die Kolorierung entspricht der in Abbildung B. Mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Anja Schütz (Max-Delbrück-Centrum - AG Heinemann).

3.1.3.6 Proteolytische Degradation der mutierten PKP2 Proteine durch Calpain Proteasen

Die Degradation der meisten fehlgefalteten und nicht mehr benötigten Proteine in eukaryotischen Zellen findet über proteolytische Abbauprozesse durch das Ubiquitin-Proteasom System (UPS), aktivierten Calpain Proteasen, lysosomaler Degradation, Autophagie oder durch den Golgi-Endosomen Signalweg statt [Qingwen *et al.*, 2009].

Zur Aufklärung des beteiligten Systems am Abbau der mutierten PKP2 Proteine wurden die verschiedenen Abbauege mittels Inhibitoren geblockt. Dabei wurden Inhibitoren von Calpain Proteasen, des UPS und lysosomaler Abbauege verwendet.

Die Behandlung von transfizierten HeLaM2 Zellen mit dem Calpain Inhibitor ALLN (100 nM für 8 h) zeigte eine signifikante Steigerung der HA-PKP2-C796R Proteinmenge im Western Blot (DMSO: 17.6 ± 5.8 % vs. ALLN: 61.3 ± 9.6 % im Vergleich zum HA-PKP2 WT Proteins; $p < 0.001$) und verhinderte damit deutlich die Degradation des mutierten Proteins (Abbildung 11A und 11B). Immunfluoreszenz Analysen demonstrierten zusätzlich, dass die Population der Zellen, die das mutierte C796R Protein exprimierten, nach ALLN Zugabe von $25.1 \pm 1.8\%$ auf 78.5 ± 8.6 % ($p < 0.05$) anstieg. Dieser Anstieg war vergleichbar mit der Anzahl der PKP2 WT exprimierenden Zellen (Abbildung 15C und 15D). Es ist bekannt, dass ALLN zusätzlich einen geringen Einfluss auf das UPS und auf den lysosomalen Abbauege hat. Jedoch hatte weder die Behandlung mit dem spezifischen UPS Inhibitors MG132 (10 μ M für 8 h) noch die Zugabe von lysosomalen Inhibitoren Bafilomycin (50 nM für 8 h) und 3-MA (5 mM für 8 h) einen Effekt auf die HA-PKP2-C796R Degradation. Das UPS und der lysosomale Abbauege scheinen daher nicht am Degradationsprozess des mutierten PKP2 Proteins beteiligt zu sein (Abbildung 16C und 16D). Die Verwendung eines weiteren Calpain Inhibitors ZLL (5 μ M für 8h) führte ebenfalls zu einer Stabilisierung des mutierten Proteins (48.5 ± 7.5 %, $p < 0.01$) und bestätigte damit die ALLN Beobachtungen. Auch der Golgi-Endosom Inhibitor Brefeldin A (BFA; 10 μ M für 8 h) inhibierte nicht die Degradation von HA-PKP2-C796R (Abbildung 15A und 15B). Keiner der verwendeten Inhibitoren hatte einen signifikanten Einfluss auf die Proteinstabilität des HA-PKP2-WTs. Das PKP2-WT Protein ist stabil im desmosomalen Komplex integriert und ist aufgrund dessen bei einer Behandlung mit nicht denaturierenden Detergenzien wie Triton X-100 zu einem Großteil unlöslich [Grossmann *et al.*, 2004]. Um die Löslichkeit der mutierten PKP2 Proteine unter Einfluss des Calpain Inhibitors zu untersuchen, wurden sowohl PKP2-WT als auch die Mutante mit TritonX-100 Lysepuffer behandelt und in lösliche und unlösliche Komplexe getrennt. Erwartungsgemäß konnte das intakte PKP2-WT Protein auch nach Zugabe von ALLN verstärkt in der unlöslichen Fraktion detektiert werden. Wiederum konnte bei der PKP2-C796R Mutation gezeigt werden, dass bereits 6 h nach Zugabe des Calpain Inhibitors ALLN eine signifikante Steigerung der Proteinmenge erreicht wurde. Die Stabilisierung des mutierten PKP2 Proteins konnte ausschließlich in der unlöslichen Proteinfraction detektiert werden (Anhang Abbildung A8).

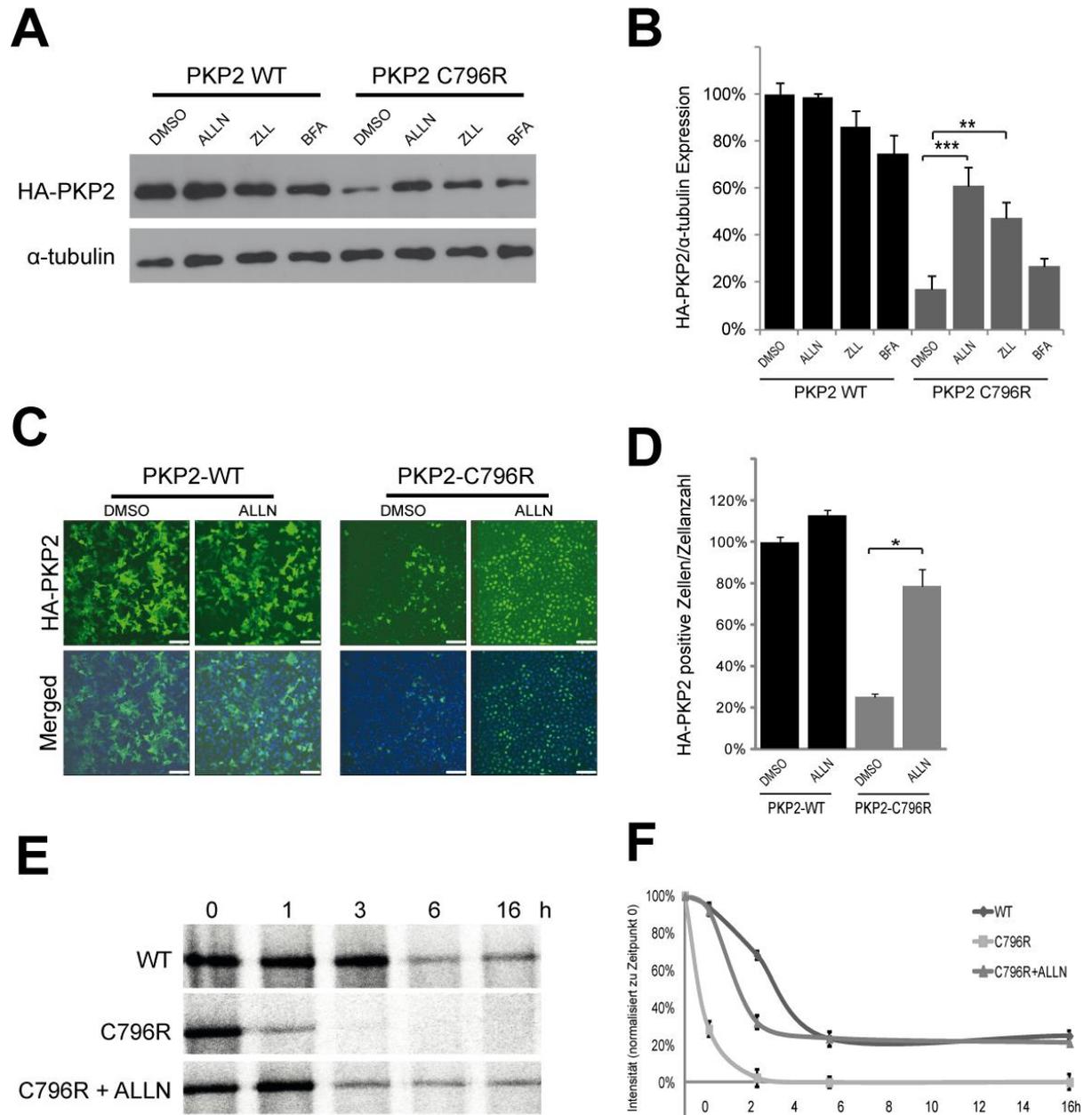
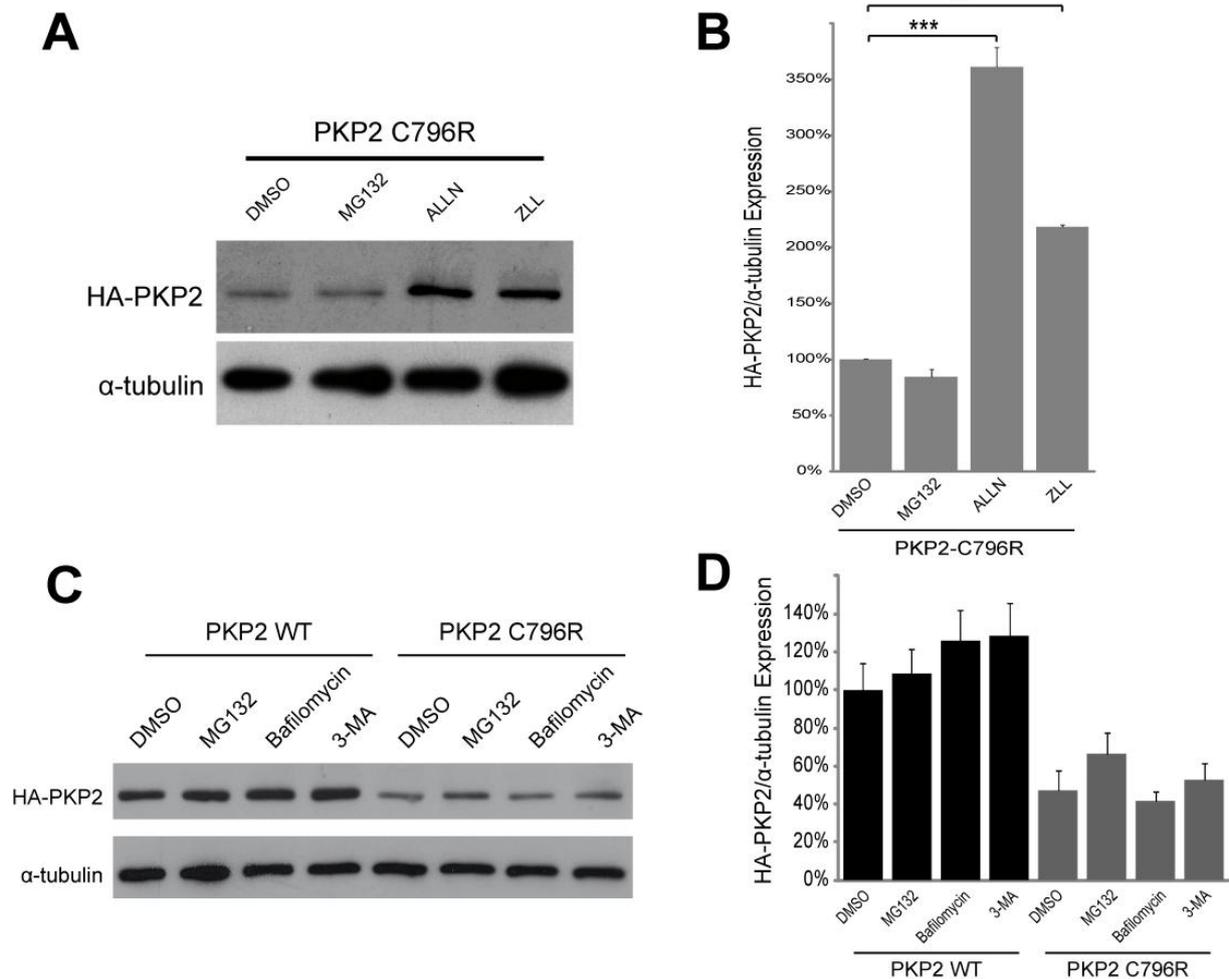


Abbildung 15: Inhibition des Degradationsprozesses der PKP2-C796R Variante durch Calpain Proteasen

(A) Western Blot Analyse der Expression von PKP2-WT und -C796R in HeLaM2 Zellen in Abwesenheit (DMSO) oder nach 8 h Behandlung mit den Calpain Inhibitoren ALLN und ZLL, sowie dem Endosom Inhibitor BrefeldinA (BFA). α -Tubulin dient als Ladekontrolle. Die Calpain Inhibitoren ALLN und ZLL sind in der Lage, das mutierte PKP2 Protein zu stabilisieren. Durch quantitative densitometrische Analyse des HA-PKP2/ α -Tubulin Verhältnisses, welche als Mittelwerte \pm SEM dargestellt werden, konnte dies signifikant bestätigt werden. $**p < 0.01$; $***p < 0.001$. $n = 3$. (C) Repräsentative konfokale Immunofluoreszenz Färbungen von HeLaM2 Zellen, die den PKP2-WT bzw. die Mutante C796R in Abwesenheit (DMSO) oder nach 8 h Behandlung des Calpain Inhibitors ALLN exprimieren. Auffällig war der markante Anstieg der mutierten HA-PKP2 positiven Zellen nach Behandlung mit ALLN, im Vergleich zu unbehandelten Zellen. (D) Quantitative HA-PKP2/Zellzahl Verhältnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. $*p < 0.05$. $n = 3$. Maßstab, 50 μ m. (E) Repräsentative Autoradiogramme von Myc-PKP2-WT und Myc-PKP2-C796R exprimierenden Proteinen in HeLaM2 Zellen, die pulse-markiert wurden durch $[^{35}\text{S}]$ Methionin/Cystein und anschließend für die angezeigten Zeitpunkte gechased wurden. Eine Anti-myc Immunopräzipitation ging der Autoradiografie voraus. (F) Die graphische Darstellung illustriert den zeitabhängigen Degradationsprozess relative zum WT. Die Halbwertszeit des PKP2-C796R Proteins verlängert sich nach Behandlung mit dem Calpain Inhibitor ALLN. Die Werte wurden gegen 100 % an Zeitpunkt 0 normalisiert. $n = 3$.

Unter der Annahme des Einflusses der Calpain Proteasen in den Proteindegradationsprozess wurde die Halbwertszeit der exprimierten mutierten und WT PKP2 Proteine durch einen Pulse-Chase Assay mit und ohne ALLN Behandlung bestimmt. Das mutierte C796R Protein degradierte signifikant schneller, mit einer Halbwertszeit von 0.62 ± 0.23 h, verglichen mit dem WT ($t_{1/2} = 3.75 \pm 0.45$ h). Die Zugabe von ALLN (100 nM für 8 h) führte zu einer verzögerten Degradation, verdeutlicht in der verlängerten Halbwertszeit des mutierten PKP2 Proteins von 2.35 ± 0.55 h (Abbildung 15E und 15F). Des Weiteren konnte aufgezeigt werden, dass der Effekt der Calpain Inhibitoren auf das mutierte PKP2 Protein in HeLaM2 Zellen auch in kardialen HL-1 Zellen bestätigt werden konnte. Beide Calpain Inhibitoren ALLN und ZLL führten zu einem signifikanten Anstieg der Proteinmenge des mutierten PKP2-C796R (DMSO: $100 \pm 0,7$ %; ALLN: 361.4 ± 17.3 %; $p < 0.001$ und ZLL: 218.4 ± 1.8 %; $p < 0.01$). Die Stabilisierung war allerdings nicht so effizient wie in den HeLaM2 Zellen (Abbildung 12A und 12B).



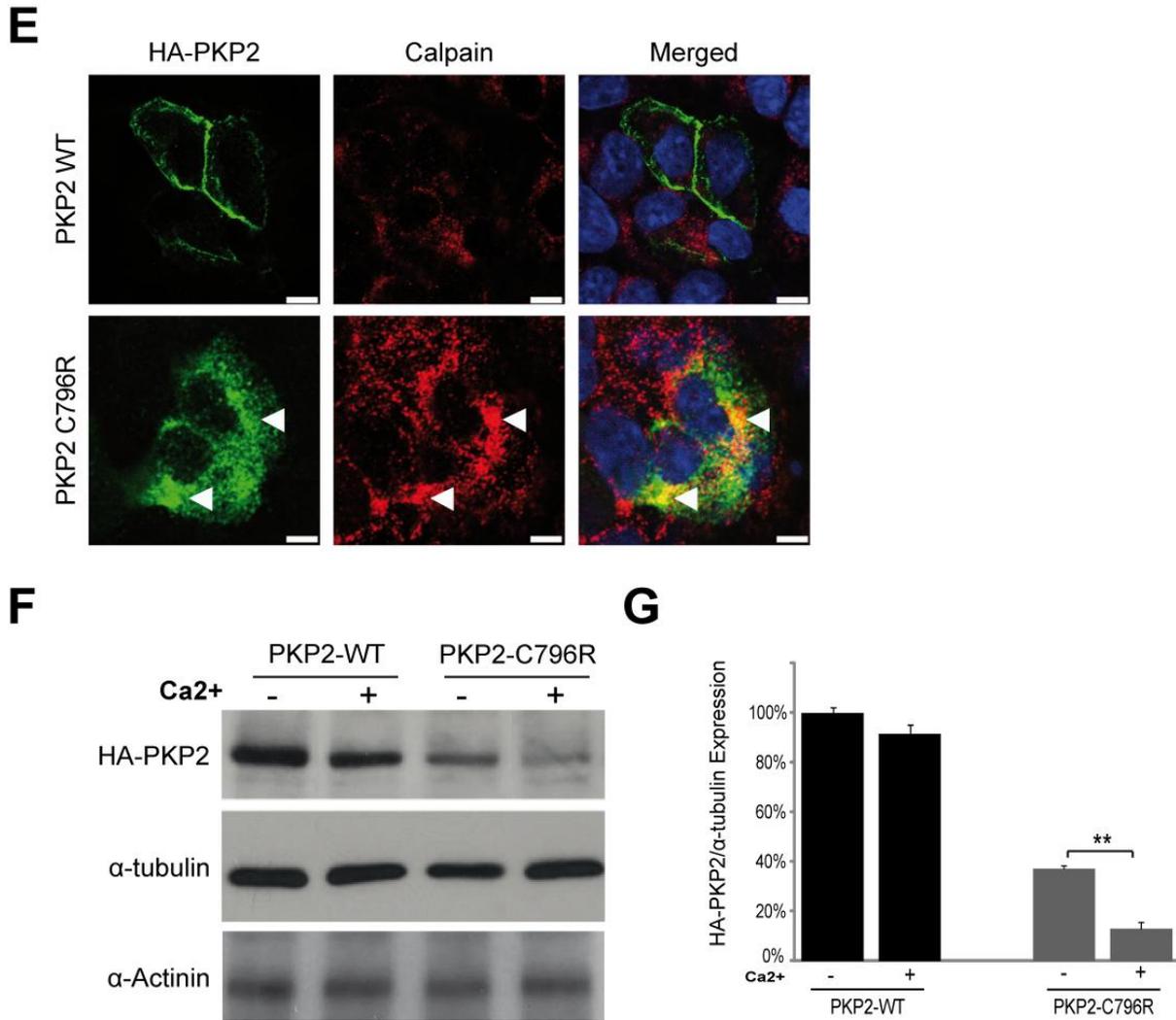


Abbildung 16: Inhibition des Degradationsprozesses der PKP2-C796R Variante durch Calpain Proteasen

(A) Western Blot Analyse der Expression des mutierten PKP2-C796R Proteins in HL-1 Zellen in Abwesenheit (DMSO) oder nach 8 h Behandlung mit Calpain Inhibitoren ALLN und ZLL, sowie dem UPS Inhibitor MG132. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. Die Calpain Inhibitoren ALLN und ZLL erhöhten die Stabilität des mutierten PKP2 Proteins, verglichen mit der DMSO Kontrolle. (B) Quantitative densitometrische Bestimmung des HA-PKP2/ α -Tubulin Verhältnisses werden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. $n = 3$. (C) Inhibition verschiedener Degradationswege. Western Blot Analyse von transfizierten HL-1 Zellen mit HA-PKP2-WT und -C796R Protein in Abwesenheit (DMSO) und nach 8 h Behandlung mit Proteasom Inhibitor MG132 (5 μ M), Lysosom Inhibitor Bafilomycin (50 nM) und des Autophagie Inhibitors 3-MA (5 mM). α -Tubulin diente als Ladekontrolle. Alle Inhibitoren haben keinen Einfluss auf die Proteininstabilität. (D) Quantitative densitometrische Bestimmung des HA-PKP2/ α -Tubulin Verhältnisses werden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. $n = 3$. (E) Repräsentative Immunofluoreszenz Analyse von HL-1 exprimierenden HA-PKP2-C796R Zellen, die eine Co-Lokalisation des mutierten PKP2 Proteins mit der Calpain Protease in fusionierten Aufnahmen demonstrieren. $n = 3$. Maßstab, 5 μ m. (F) Western Blot Analyse von HA-PKP2-WT und -C796R Proteinen in HL-1 Zellen mit (+) und (-) Kalziumzugabe für die Aktivierung endogener Calpain Proteasen. Unter Kalziumzugabe reduziert sich die Proteinmenge des mutierten Proteins deutlich, verglichen mit dem PKP2-WT Protein. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. (G) Quantitative densitometrische Bestimmung des HA-PKP2/ α -Tubulin Verhältnisses werden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. ** $p < 0.01$. $n = 3$.

Immunfluoreszenz Analysen in HL-1 Zellen demonstrierten das Calpain mit mutierten Proteinaggregaten co-lokalisiert. Dies deutet daraufhin, dass die mutierten Proteinaggregate Zielsubstrate der Calpain Proteasen sind. Aufgrund der Tatsache, dass Calpain Proteasen kalziumabhängig sind, könnte die Aktivierung von endogenen Calpain Proteasen durch Zugabe von 5 mM Kalzium für 6 h zu einer verstärkten Degradation führen.

Eine deutlich stärkere Degradation des mutierten PKP2-C796R Proteins konnte nach Aktivierung von Calpain durch Kalzium festgestellt werden. Die detektierten Proteinmengen, mit ($13.2 \pm 2.4 \%$) und ohne Kalziumzugabe ($37.1 \pm 1.3 \%$, $p < 0.01$) erwiesen sich als signifikant verschieden. Andere endogene Substrate der Calpain Proteasen, wie zum Beispiel α -Actinin, waren nicht von der Aktivierung betroffen, was für einen spezifischen Einfluss der Calpain Proteasen auf die Degradation des mutierten Proteins spricht (Abbildung 16F).

3.1.3.7 Einfluss mutierter PKP2 Proteine auf zelluläre Apoptose und ER-Stress

Frühere Studien dokumentieren eine verstärkte Induktion von Apoptose in kardialem Gewebe von ARVC Patienten [Nagata *et al.*, 2000; Yamaji *et al.*, 2005]. Um zu untersuchen, inwiefern die Expression der mutierten PKP2 Proteine bzw. deren Degradation einen direkten Einfluss auf die Induktion von Apoptose haben, wurden in Zellkulturexperimenten TUNEL-Analysen und Immunfluoreszenzfärbungen des cleaved-Caspase 3 Proteins durchgeführt. Beide Nachweisverfahren zur Detektion des programmierten Zelltodes konnten keinen signifikanten Anstieg der Apoptoserate in Zellen detektieren, die das mutierte Protein exprimierten, verglichen mit Zellen, die den PKP2-WT überexprimierten (Abbildung 17A).

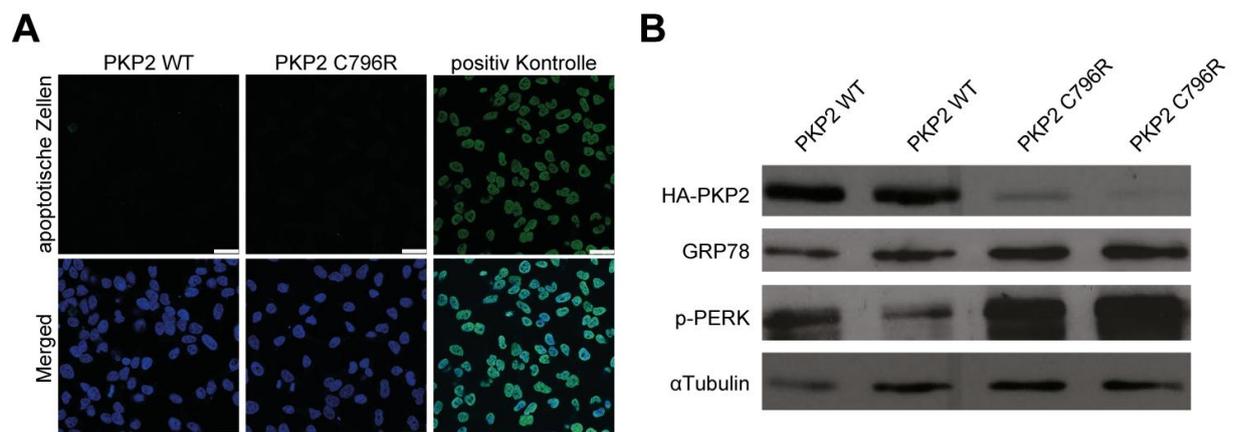


Abbildung 17: Analyse von Apoptose und ER-Stress in PKP2-C796R exprimierenden HeLaM2 Zellen

(A) Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung des TUNEL-Assay zeigten keine vermehrte Apoptose in PKP2 exprimierenden Zellen, verglichen zum PKP2-WT. Die induzierte Positivkontrolle demonstrierte die massive Induktion von Apoptose (B) Western Blot Analyse der erhöhten ER-Stress Antwort, in Folge der Expression der PKP2-C796R Mutation in HeLaM2 Zellen. Die ER-Stress Marker GRP78 und p-PERK waren in PKP2-C796R exprimierenden Zellen deutlich erhöht, im Vergleich zum WT. α -Tubulin diente als Ladekontrolle.

Die andauernde Expression fehlgefalteter Proteine könnte zu einer Induktion von Stress im Endoplasmatischen Retikulum führen, welche wiederum ein Signalnetzwerk aktiviert, welches als Unfolded Protein Response (UPR) bezeichnet wird. Das UPR erhöht die Aktivität des sekretorischen Signalweges durch verstärkte Expression von ER Chaperonen, wie z.B. GRP78. Die Expressionsanalyse von GRP78 und dem nachgeschalteten p-PERK zeigten in Vorversuchen deutlich verstärkte Signale in PKP2-C796R exprimierenden HeLaM2 Zellen (Abbildung 17B). Die Expression des PKP2-WT führte hingegen zu keiner erhöhten Expression der ER-Stress Marker.

3.1.4 Etablierung von transgenen Mauslinien

3.1.4.1 Generierung transgener Mäuse

Um die *in vitro* Daten der Instabilität und Degradation von Mutationen im PKP2 Protein *in vivo* zu verifizieren und weiter zu untersuchen, wurde ein induzierbares transgenes Mausmodell generiert, welches die humane PKP2 Mutation C796R kardial spezifisch überexprimiert.

Die Generierung transgener Mäuse erfolgte durch Mikroinjektion in die Oozyte. Diese Methode beruht auf der Integration von vielen tandemartigen Kopien in das Genom der Maus, wobei die Integrationsorte zufällig und nicht vorhersehbar sind. Um dem Positionseffekt entgegenzuwirken, wurden zunächst mehrere positive Gründerlinien gesichert. Diese transgenen PKP2-WT bzw. -C796R Gründerlinien wurden anschließend mit transgenen homozygoten Transaktivator Mäusen (rtTA) verpaart, um die doppelt transgenen PKP2 (WT bzw. C796R)/rtTA Mauslinien zu generieren. Für die Bestimmung der jeweiligen Genotypen transgener Mäuse durch Genotypisierungs-PCR wurde die genomische DNA aus Ohrbiopsien der Mäuse gewonnen. Die PCR zeigte eine qualitative Aussage über die An- bzw. Abwesenheit von transgenen humanen Kopien im Mausgenom (Abbildung 18A und 18B).

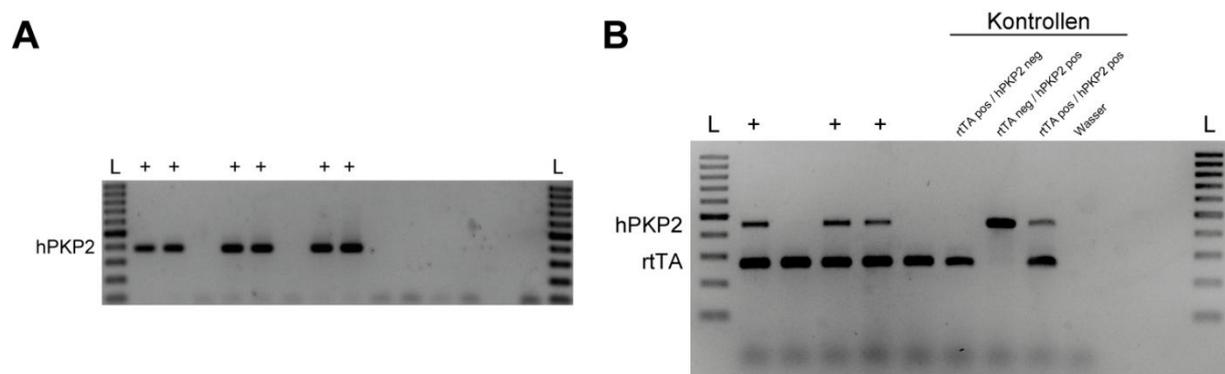


Abbildung 18: Genotypisierung mittels PCR

(A) Agarosegel der Genotypisierung der PKP2-C796R Gründerlinien. Unter Verwendung des human PKP2 Primerpaares (spezifisches Produkt 380 bp) wurden aus 14 Mäusen 6 transgene PKP2-C796R Gründerlinie identifiziert (+). L = 100 bp Leiter. (B) Zur Genotypisierung der doppelte transgenen Mauslinien wurden spezifische Primerpaare für das humane PKP2 und für das rtTA benutzt, die unterschiedlich große PCR-Produkte erzeugten. Für das humane PKP2 wurde ein Fragment von etwa 380 bp amplifiziert. Das rtTA Produkt wies eine Größe von etwa 200 bp auf. Das Agarosegel zeigt exemplarisch, wie aus 5 verschiedenen Proben 3 Mäuse eindeutig als doppelt-transgen positiv identifiziert werden konnten (+). L = 100 bp Leiter.

Die transgenen Mäuse waren fertil und brachten jeweils eine normale Anzahl von Nachkommen hervor (ca. 6-10 Mäuse pro Wurf). Die Tiere hatten unter basalen Bedingungen einen normalen Lebenszyklus und ihre Lebenserwartung entsprach der einer normalen Labormaus. Die endgültigen Zuchtlinien zeichneten sich durch eine schwächere bzw. stärkere Expression des transgenen Konstrukts aus, welches zurückzuführen ist auf unterschiedliche Lokalisation im Genom und Anzahl integrierter Kopien des Transgens. Der Vergleich zwischen den Linien TgPKP2-WT und TgPKP2-C796R #1 bzw. TgPKP2-C796R #2 konnte nur in unterschiedlichen Würfen vorgenommen werden. Um einen möglichen Einfluss des transgenen Transaktivators (rtTA) zu untersuchen, wurden als Kontrolltiere jeweils Geschwister der doppelt transgenen Linien verwendet, die ausschließlich für den Transaktivator positiv waren, jedoch nicht für das transgene PKP2-WT bzw. -C796R. Die Tiere unterschiedlicher Linien wurden nach 12-16 Wochen biochemisch, histologisch und morphometrisch analysiert.

3.1.4.2 Induktion transgener Expression in PKP2-WT und PKP2-C796R Mauslinien

3.1.4.2.1 Stabile RNA Level in transgenen PKP2-C796R Linien

Die Expression der doppelt transgenen TgPKP2-WT und TgPKP2-C796R Linien wurde zunächst auf RNA Ebene untersucht. Für die Induktion der Genexpression des transgenen PKP2-WT bzw. -C796R wurden adulte (8-12 Wochen) doppelt transgene Mäuse (PKP2/rtTA) eine Woche lang mit Doxycyclin versetztem Wasser (2mg/ml) behandelt. Das verabreichte Doxycyclin bewirkt die Bindung des kardial spezifischen Transaktivatorproteins (rtTA) an das Tetracyclin-gesteuerte Promotorelement (TRE) und induziert die Expression des transgenen humanen PKP2 WT bzw. die Mutante PKP2 p.796R. Die aus den Herzen isolierte Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Durch semi-quantitative RT-PCR konnte ermittelt werden, dass gleiche Mengen transgener RNA in der TgPKP2-WT Linie und zwei mutierten (TgPKP2-C796R #1 und #2) Linien vorlagen, was auf eine stabile Transkription der mutierten PKP2 RNA schließen lässt (Abbildung 19A und 19B).

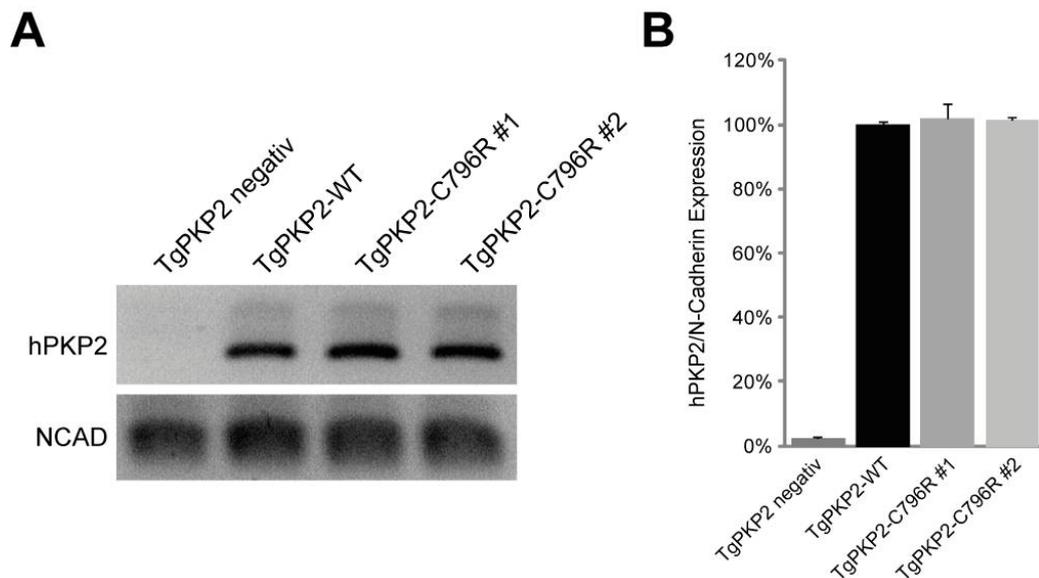


Abbildung 19: Semi-quantitative Bestimmung der PKP2-WT und -C796R RNA Expression

(A) Die Semi-quantitative RT-PCR wurde in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Zum qualitativen Nachweis der transgenen Expression wurde das Primerpaar für das humane PKP2 gewählt. Als interne Kontrolle wurde N-Cadherin verwendet. Es konnte kein Translationsunterschied der RNA zwischen PKP2 WT und Mutante nachgewiesen werden. (B) Quantitative densitometrische Bestimmung des hPKP2/N-Cadherin Verhältnisses werden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. $n=3$.

3.1.4.2.2 Reduzierte transgene Proteinexpression in TgPKP2-C796R Tieren

Für die Analyse der Expression der HA-markierten transgenen Proteine der unterschiedlichen Mauslinien (TgPKP2-WT und TgPKP2-C796R) wurden die Proteine aus den Herzen adulter Doxycyclin-induzierter doppelt transgener Mäuse extrahiert. Mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse konnten die HA-markierten transgenen PKP2-WT und PKP2-C796R Proteine detektiert werden. Bemerkenswert signifikant war die in allen vier etablierten Linien geringere Proteinmenge des mutierten Proteins, verglichen mit dem transgenen PKP2-WT (Abbildung 20A und 20B). Die Degradation des mutierten PKP2 Proteins *in vivo* bestätigte die Ergebnisse der *in vitro* Analysen. Die Proteinexpression des endogenen murinen PKP2 war sowohl im WT als auch in mutierten Mauslinien unverändert. Des Weiteren konnte ebenfalls keine Veränderung der Expression von desmosomalen Proteinen, wie z.B. JUP detektiert werden (Abbildung 20C).

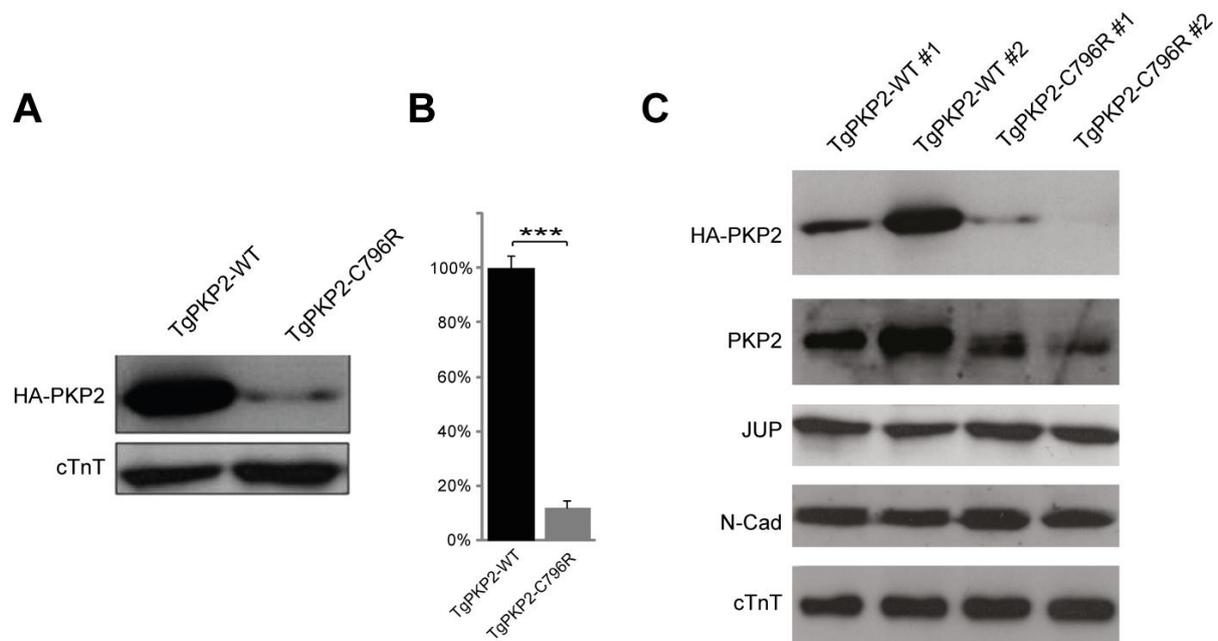


Abbildung 20: Proteininstabilität der transgenen PKP2-C796R Mutation

(A) Western Blot Analyse der Doxycyclin-induzierten transgenen PKP2-WT und -C796R Proteinexpression. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. Die Expression des mutierten PKP2 Proteins ist signifikant reduziert, verglichen mit der Expression des transgenen PKP2 WT. (B) Die Proteinquantität wird mittels quantitativer densitometrischer Bestimmung des HA-PKP2/ α -tubulin Verhältnisses als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *** p <0.001. $n=3$. (C) Immunoblot Analyse der verschiedenen transgenen Linien zeigte die unterschiedliche Expressionstärke des transgenen PKP2. Das endogene murine PKP2 war hingegen in den mutierten Mauslinien unverändert exprimiert. Die Expression des desmosomalen Protein JUP sowie das Adhärenzprotein NCAD waren sowohl im transgenen WT als auch in der mutierten Mauslinie nicht verändert. cTnT diente als Ladekontrolle.

Für die weitere Analyse der Expressionslevel und Lokalisation des mutierten Proteins wurden Immunofluoreszenz Färbungen auf kardialen Kryoschnitten von Doxycyclin-induzierten doppelt transgener Mäuse (TgPKP2-WT und TgPKP2-C796R) angefertigt. Diese demonstrierten, dass der transgene PKP2-WT normal an den Glanzstreifen der Kardiomyozyten exprimiert ist, wohingegen das mutierte PKP2 Protein nur in wenigen Zellen detektierbar und ausschließlich im Zytoplasma zu lokalisieren war (Abbildung 17A). Die Expression der transgenen PKP2 Mutation C796R hatte jedoch ebenso wie der transgene PKP2-WT weder einen Einfluss auf das Expressionsprofil des endogenen murinen PKP2, noch auf die Expression anderer desmosomaler Proteine (Abbildung 21B; Anhang Abbildung A9). Die Expressionsanalysen im adulten Einzelkardiomyozyten bestätigten diese Ergebnisse (Abbildung 22A).

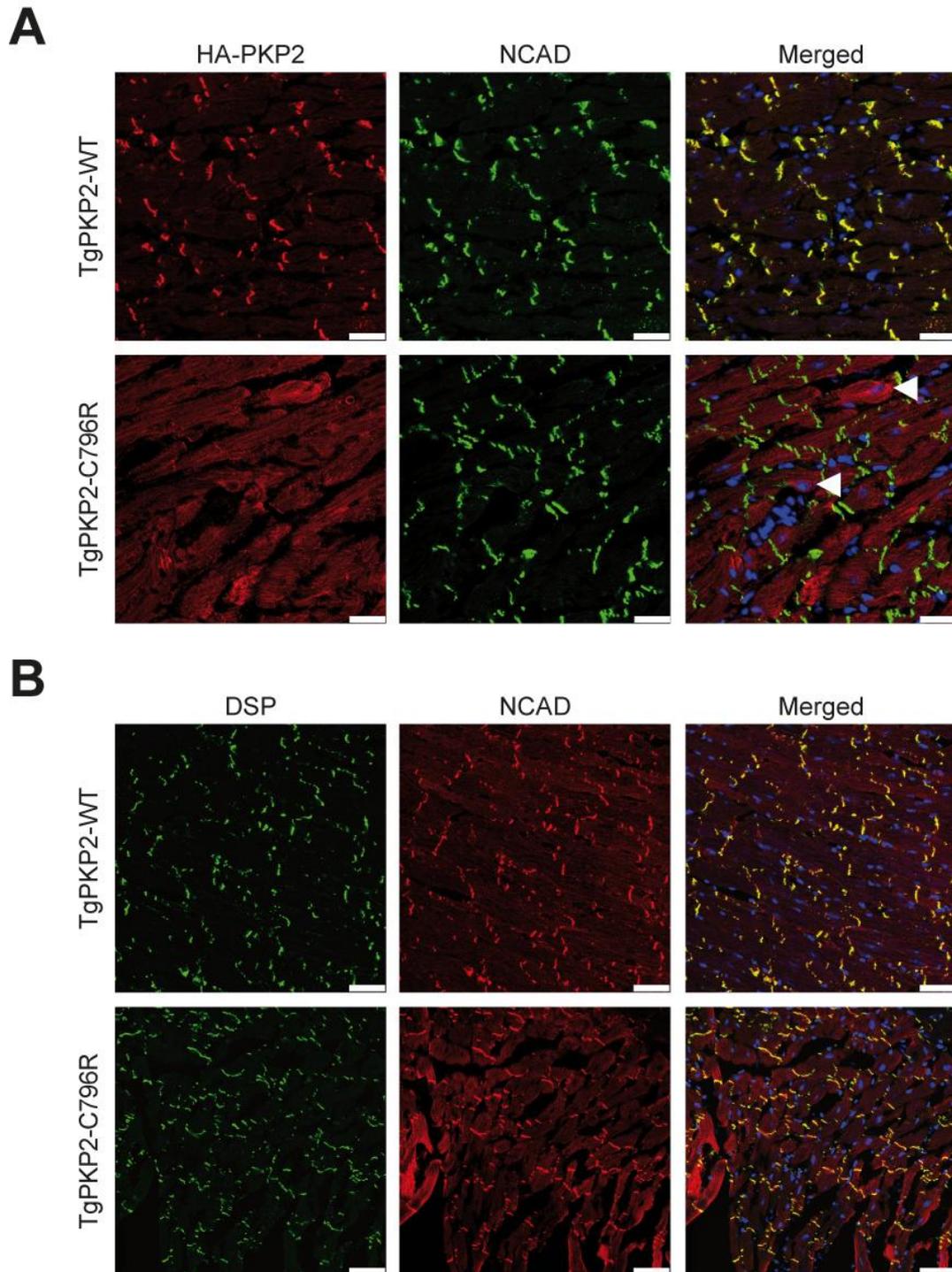


Abbildung 21: *In vivo* Expression der transgenen PKP2-C796R Mutation

(A) Repräsentative Immunofluoreszenz Färbungen von kardialen Kryo-Schnitten der TgPKP2-WT und TgPKP2-C796R Linien zeigen, dass der TgPKP2-WT normal an den Glanzstreifen der Kardiomyozyten lokalisiert, während das mutierte TgPKP2-C796R im Zytoplasma mislokalisiert (Pfeile). Die Expression des Adhärenzprotein N-Cadherin an den Glanzstreifen ist in beiden transgenen Mauslinien unverändert. (B) Das Expressionsmuster von DSP zeigte keine Intensitäts- oder Lokalisationsveränderungen, verglichen mit dem TgPKP2-WT. Maßstab, 25 μ m.

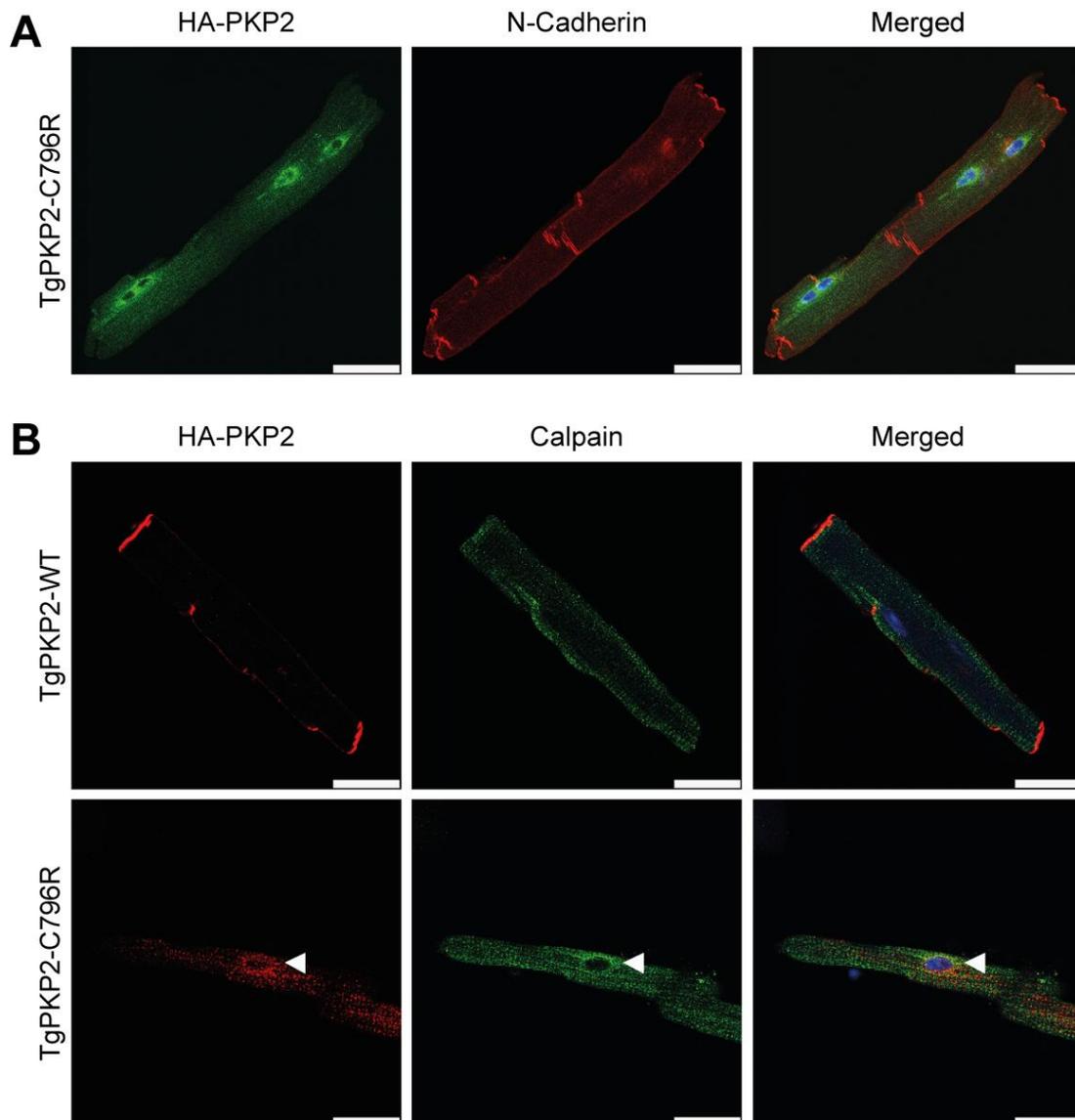


Abbildung 22: Expression der transgenen PKP2-C796R Mutation in adulten Kardiomyozyten

(A) Repräsentative Immunofluoreszenz Färbungen von isolierten adulten Kardiomyozyten der TgPKP2-C796R Linien demonstrieren eine Lokalisation der mutierten Proteine im Zytoplasma mit einer Akkumulation um den Kern. (B) Die akkumulierten mutierten PKP2 Proteine co-lokalisieren mit den Calpain Proteasen (Pfeile), im Vergleich zum transgenen TgPKP2-WT. Maßstab, 25 μ m.

Die *in vitro* vermutete Beteiligung von Calpain Proteasen im Abbauprozess von mutierten PKP2-Proteinen wurde auch *in vivo* durch Co-Lokalisierung von Calpain mit mutiertem PKP2 Protein untersucht. Immunofluoreszenzfärbungen an isolierten adulten Kardiomyozyten bestätigten den Einfluss der Calpain Protease im Degradationsprozess durch Co-Lokalisierung des um den Zellkern akkumulierten HA-PKP2-C796R Proteins mit der Calpain Protease. Im Vergleich dazu zeigte die Expression des transgenen PKP2-WT die erwartete Lokalisation an den Glanzstreifen und folglich keine Interaktion mit den Calpain Proteasen (Abbildung 22B).

3.1.4.2.3 Unveränderte Herzmorphologie und Herzfunktion in TgPKP2-C796R Linien

Um eventuelle Konsequenzen des *in vivo* Degradationsprozesses der PKP2-C796R Mutante auf die Funktion des Herzens zu ermitteln, wurde die Herzfunktion der jeweiligen doppelt-transgenen Tiere nicht-invasiv mittels Echokardiographie zunächst in kleinen Gruppen untersucht. Die Expression der transgenen PKP2-C796R Mutation in den untersuchten Tieren wurde bereits *in utero* durch Doxycyclin Gabe induziert und bis zur Tötung weitergeführt. Als Kontrolltiere zu den doppelt transgenen TgPKP2-C796R/rtTA wurden die transgen-negativen aber rtTA-positiven Geschwistertiere verwendet. Sowohl die Untersuchungen als auch die Auswertungen der gleichgeschlechtlichen Geschwistertiere erfolgten verblindet. Die doppelt transgenen TgPKP2-C796R/rtTA Mäuse besaßen unveränderte Herz/Körpergewichts-Verhältnisse, im Vergleich zu den transgen-negativen Geschwistern. Histologische Massons' Trichromfärbungen zeigten keine Anzeichen einer verstärkten Fibrose oder den Verlust von Kardiomyozyten. Mittels Echokardiogramm konnten keine Anzeichen einer Dilatation oder Hypertrophie der Herzen festgestellt werden. Die Analyse weiterer Parameter ergab keine Unterschiede und deutete auf eine normale Herzmorphologie hin. Funktionelle Parameter wie die linksventrikuläre Auswurfraction, die Pumpfunktion oder die Herzfrequenz wiesen keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Anhang Tabelle A3).

3.2 *In vitro* Charakterisierung des Verlustes von PKP2 in Kardiomyozyten

Im ersten Teil konnte gezeigt werden, dass sowohl verschiedene Punktmutationen als auch Deletionsmutationen im PKP2 zu instabilen Proteinen führen, die in der Folge degradiert und zum Verlust der Proteinexpression führen. Die Tatsache, dass es sich bei über 90% aller krankheitsverursachenden ARVC Mutationen im PKP2 um Trunkierungsmutationen handelt, die nicht stabil sind und die neu gewonnene Erkenntnis, dass auch Punktmutationen zu einem heterozygoten Verlust der PKP2 Kopie führen, ließ die Hypothese zu, dass der komplette oder partielle Verlust der kardialen PKP2 Expression einen entscheidenden Einfluss in der Pathogenese der ARVC einnimmt. Um die Auswirkungen eines solchen Verlustes der PKP2 Expression auf zelluläre Prozesse zu studieren, wurde eine siRNA vermittelte Suppression der PKP2 Expression in neonatalen Rattenkardiomyozyten untersucht.

Im Rahmen der Etablierung einer reinen ausdifferenzierten Kardiomyozytenkultur wurden die Nicht-Kardiomyozyten, hauptsächlich kardiale Fibroblasten, während der Isolation durch zweimaliges Pre-Plating herausgetrennt und eine weitere Proliferation der Zellen durch einen Proliferationshemmer unterbunden. Durch Verwendung von kardialen Markern wie α -Actinin (Sarkomerprotein) und dem Transkriptionsfaktor Nkx2.5, sowie dem Fibroblastenmarker Vimentin konnten mittels Immunfluoreszenz Analyse eine reproduzierbare Reinheit der verwendeten Kardiomyozyten von über 90% erreicht werden (Anhang Abbildung A10). Die erfolgreiche Repression der endogenen PKP2 mRNA Expression wurde durch die spezifische siRNA gegen PKP2 erreicht, die 120 h post Transfektion ihre größte Wirksamkeit erreichte. Mittels Real-time PCR wurden PKP2-Mengen von nur noch $10,4 \pm 3,7$ % im Vergleich zur Kontroll-siRNA GAPDH bestimmt (Abbildung 23A).

Diese signifikante Suppression der PKP2 mRNA führte folglich zu einem Verlust der Proteinexpression, welcher in Western Blot Analysen deutlich zu detektieren war (Abbildung 23B). Die Repression der PKP2 Expression hatte zunächst keinen Einfluss auf die Gesamtanzahl, Zellgröße, die Anzahl der Zellkontakte oder die Kontraktilität der neonatalen Rattenkardiomyozyten. Immunfluoreszenz Studien zeigten, dass der Verlust der PKP2 Expression keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der desmosomalen Interaktionspartner JUP und DSC2 sowie auf Adhäsionsproteine, wie N-Cadherin, hatte (Abbildung 23C,D).

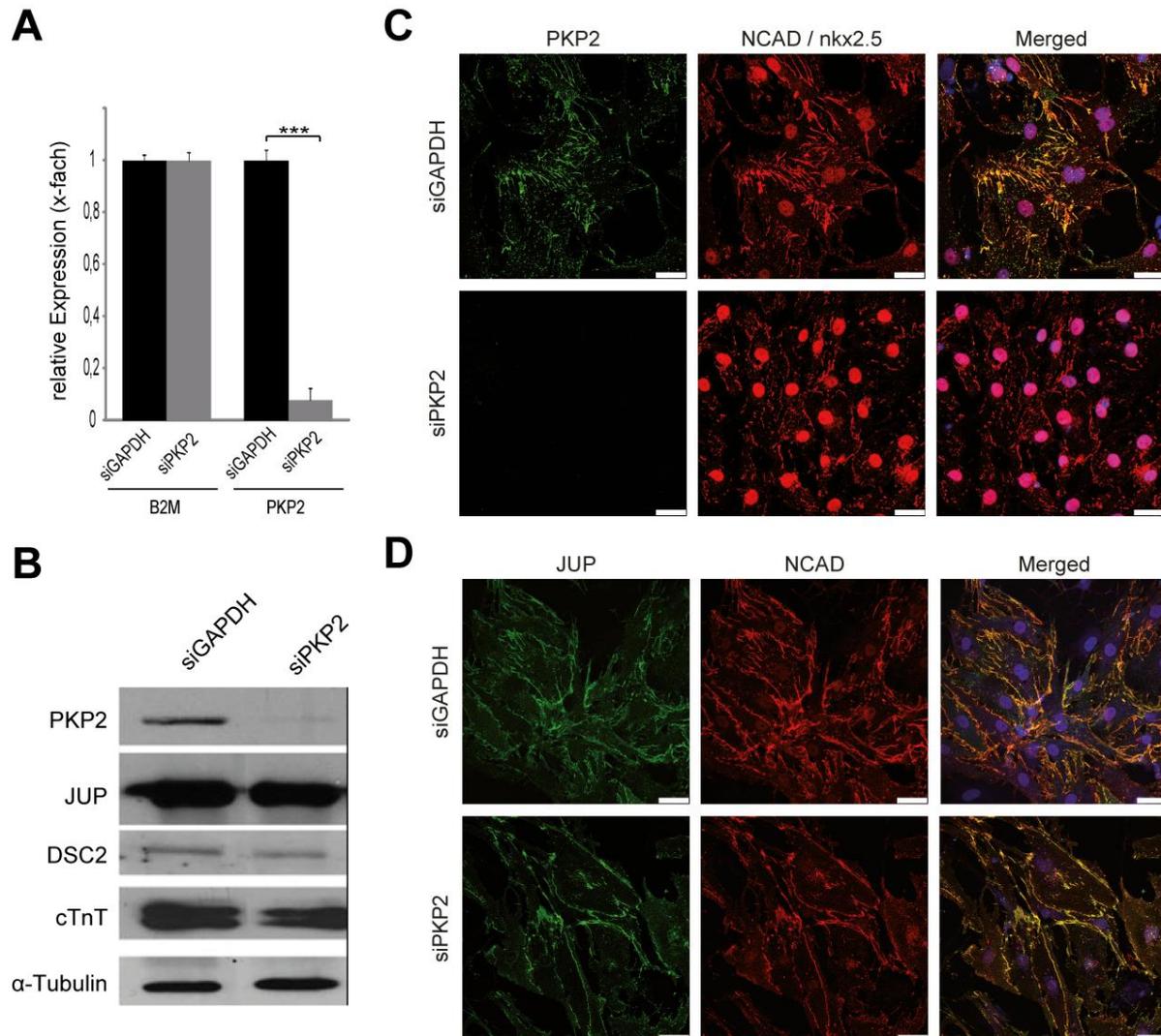


Abbildung 23: Suppression der PKP2 Expression in neonatalen Rattenkardiomyozyten

(A) Bestimmung der Effizienz der PKP2 siRNA mittels Real-time PCR Analyse. Die Expression der PKP2 mRNA wurde 120 h nach siRNA Transfektion signifikant gesenkt, im Vergleich zur Kontroll-siRNA GAPDH. Als internes Kontrollgen (Housekeeper) diente beta-2-Microtubulin. *** $p < 0.01$. $n = 3$. (B) Western Blot Analyse der PKP2 siRNA transfizierten Kardiomyozyten zeigten eine Reduktion des PKP2 Proteins. Die desmosomalen Proteine JUP und DSC2 zeigten keine signifikante Expressionsunterschiede. Als Ladekontrollen dienten cTnT und α -Tubulin. (C) Repräsentative Immunfluoreszenz Analyse der Repression von PKP2. Während in der Kontroll-siRNA GAPDH PKP2 an der Membran lokalisierte, konnte kein PKP2 Signal in den Kardiomyozyten detektiert werden, die mit PKP2 siRNA behandelt wurden. N-Cadherin lokalisierte in beiden siRNA unverändert an der Zellmembran. Der nukleäre Transkriptionsfaktor nkx2.5 markiert ausschließlich Kardiomyozyten. Maßstab, 25 μm . (D) Repräsentative Immunfluoreszenz Analyse der Expression des desmosomalen Protein JUP. Es konnten weder Intensitätsunterschiede noch eine veränderte Lokalisation von JUP in PKP2 defizienten Kardiomyozyten detektiert werden. N-Cadherin und nkx2.5 dienten als interne Qualitätskontrolle der Kardiomyozyten. Maßstab, 25 μm .

Die Analyse der Expression des desmosomalen Interaktionspartners Desmoplakin (DSP) hingegen zeigte in PKP2 defizienten Kardiomyozyten eine eindeutige Delokalisation von der Zellmembran zu einer diffusen Verteilung im Zytoplasma (Abbildung 24A). Kontrollversuche mit siRNA gegen GAPDH zeigten die erwartete membranständige Lokalisation von DSP. Western Blot Analysen der Fraktionierung von Gesamtprotein in eine lösliche zytosolische und eine unlösliche Membranfraktion bestätigten die vermehrte Akkumulation von DSP im Zytoplasma nach Verlust der PKP2 Expression, im Vergleich zu Proteinextrakten aus GAPDH-siRNA isolierten Zellen (Abbildung 24B).

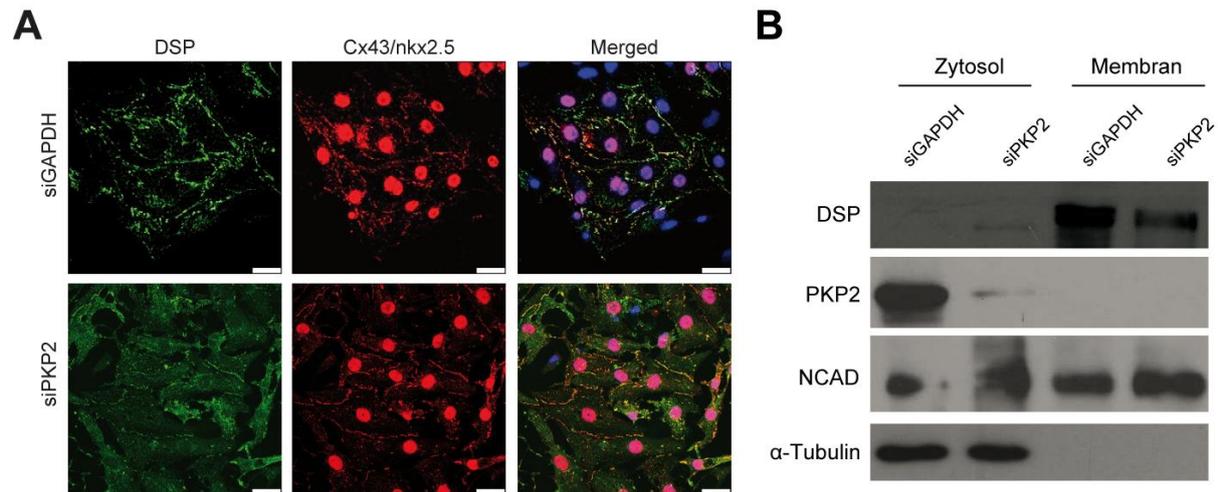


Abbildung 24: Verändertes Expressionsprofil von DSP in neonatalen Rattenkardiomyozyten

(A) Repräsentative Immunofluoreszenz Analyse in PKP2 defizienten Kardiomyozyten zeigten eine verstärkte Delokalisation von DSP von der Zellmembran in das Zytoplasma, verglichen mit der exklusiven DSP Expression an der Membran in der Kontroll-siRNA. Die Lokalisation des Gap Junction Protein Cx43 wurde durch den Verlust der PKP2 Expression nicht beeinflusst. Maßstab, 25 μ m. (B) Immunoblot Analyse der löslichen zytosolischen Proteinfraction und der unlöslichen Membranfraktion von PKP2 siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfizierten Kardiomyozyten. Die Fraktionierung zeigte, dass DSP in PKP2 defizienten Kardiomyozyten verstärkt im Zytoplasma und weniger in der Membranfraktion zu detektieren war. NCAD dient als Ladekontrolle der unlöslichen Fraktion, wobei hingegen α -Tubulin als Ladekontrolle der löslichen Fraktion diente.

3.2.1 Gestörte desmosomale Integration von DSP durch Auflösung des DSP-PKP2-PKC Protein Komplexes

Frühe Studien identifizierten in epithelialen Zelllinien einen Proteinkomplex, bestehend aus DSP, PKP2 und einer Protein Kinase $C\alpha$ (PKC α) [Bass-Zubeck *et al.*, 2007].

Die durch PKC α vermittelte Phosphorylierung von DSP sowie die Bindung von PKP2 an DSP sind essentiell für die Bildung dieses Komplexes und die Integration von DSP in den desmosomalen Membranverband. Die Auflösung dieses Proteinkomplexes sowohl durch den Verlust von PKP2 als auch durch den Verlust der PKC α Expression führte in epithelialen Zelllinien zu einer Akkumulation von DSP im Zytoplasma.

Für den Nachweis der Existenz dieses Proteinkomplexes, bestehend aus PKP2, DSP und PKC in Kardiomyozyten, wurde zunächst der universale PKC Inhibitor BIM (12,5 μM , 48 h) verwendet, welcher in neonatalen Kardiomyozyten eine massive Akkumulation des DSP Proteins im Zytoplasma bewirkte. Im Gegensatz dazu zeigte die mit DMSO behandelten Kontrolle (12,5 μM , 48 h), die erwartete membranständige Lokalisation von DSP.

Die Behandlung mit dem Inhibitor BIM führte des Weiteren zu einer Ansammlung des membranständigen Gap Junction Proteins Cx43 Aggregaten im Zytoplasma. Diese Delokalisation von DSP und Cx43 konnte jedoch 24 h nach Entnahme von BIM und Ersetzen durch DMSO wieder normalisiert werden und wies folglich auf einen reversiblen Prozess hin (Abbildung 25).

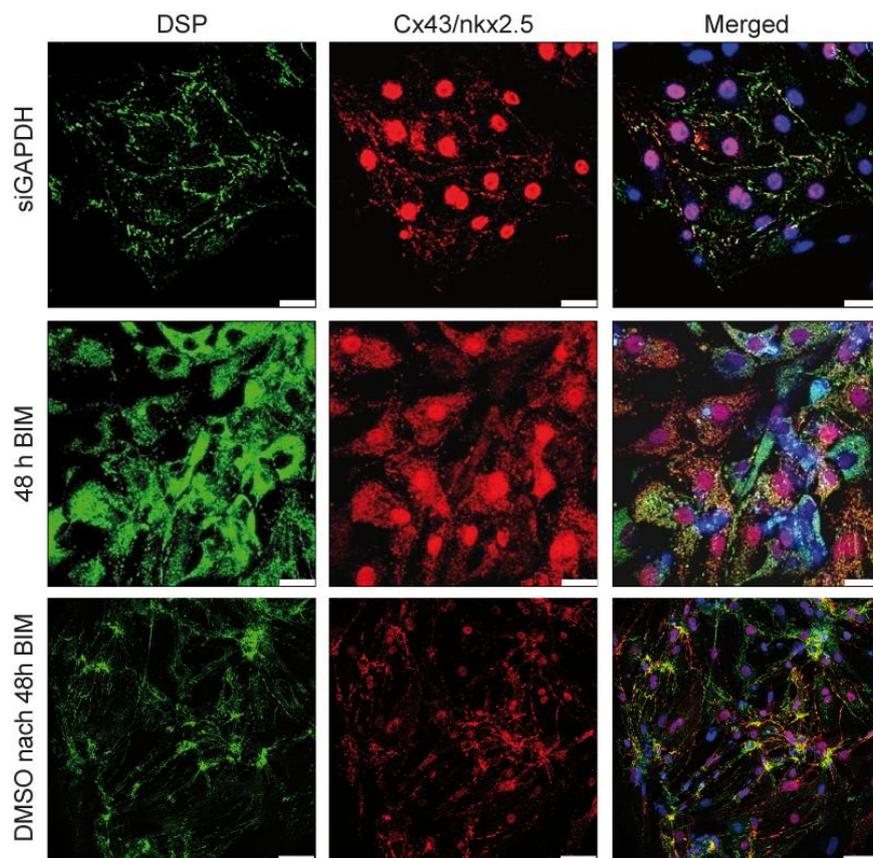


Abbildung 25: DSP Delokalisation durch Protein Kinase C Inhibition

Repräsentative Immunofluoreszenz Analyse von neonatalen Rattenkardiomyozyten unter Einfluss eines Protein Kinase C (PKC) Inhibitors. Der allgemeine Protein Kinase C Inhibitor BIM (12,5 μM) bewirkte nach 48 h Inkubation eine massive Mislokalisierung von DSP im Zytoplasma. Das Gap Junction Protein Cx43 akkumuliert nach Inkubation mit BIM ebenfalls im Zytoplasma. Die Delokalisation von DSP und Cx43 war durch Wegnahme des Inhibitors und Zugabe von frischem Kulturmedium nach 24 h reversibel. Maßstab, 25 μm .

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei dem PKC Inhibitor BIM um einen PKC Isoform unabhängigen Inhibitor handelt, der unspezifisch alle Isoformen blockiert, wurden im Folgenden spezifische Inhibitoren getestet. Die Behandlung mit dem PKC α spezifischen Inhibitor Gö6976 (10 μM für 16 h) zeigte keinen Effekt auf die Expression und Lokalisation von DSP in Kardiomyozyten (Abbildung 26A). Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit diesem spezifischen PKC α Inhibitor in epithelialen A431 Zellen zu der erwarteten Akkumulation von DSP im Zytoplasma.

Für die Identifikation einer eventuell kardial spezifischen PKC wurde im Weiteren die Beteiligung der PKC Isoform PKC ϵ untersucht, da PKC ϵ im Herzen aufgrund der Modulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren, der Regulation von Ionenkanälen und die Interaktion mit Proteinen der Myofilamente wichtige Funktionen einnimmt [Schreiber *et al.*, 2001; Newton *et al.*, 2010].

Interessanterweise führte sowohl die Behandlung von neonatalen Rattenkardiomyozyten mit dem PKC ϵ Inhibitor (10 μ M für 16 h) als auch die Transfektion der Zellen mit einer spezifischen PKC ϵ siRNA zu einer Delokalisation von DSP in das Zytoplasma (Abbildung 26A).

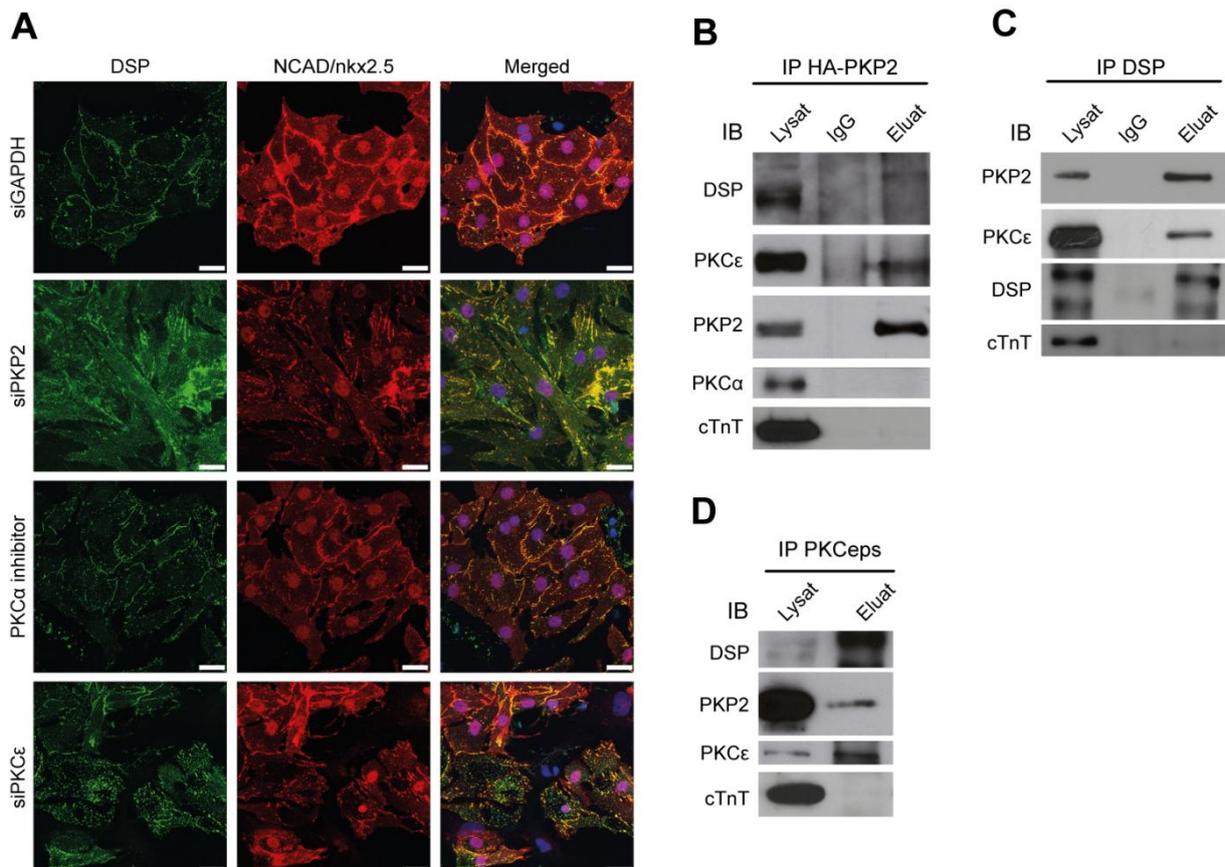


Abbildung 26: Identifikation von PKC ϵ als kardial spezifische PKC Isoform im desmosomalen DSP-PKP2-PKC Komplex

(A) Repräsentative Immunofluoreszenz von siRNA transduzierten bzw. Inhibitor behandelten neonatalen Rattenkardiomyozyten. Die Repression von PKP2 führte zur Delokalisation von DSP ins Zytoplasma. Die Behandlung mit dem spezifischen PKC α Inhibitor (GÖ6976) zeigte hingegen keine Expressionsveränderung von DSP. Im Gegensatz dazu bewirkte die Repression der PKC ϵ Expression mittels siRNA eine verstärkte Delokalisation von DSP ins Zytoplasma. Die Expression von N-Cadherin ist unter allen Bedingungen nicht verändert. Maßstab, 25 μ m. (B) Repräsentative Immunoblot Analyse der Co-Immunopräzipitation aus kardialem Gewebe von adulten transgenen HA-PKP2 WT Mäusen. Das Eluat der Präzipitation ergab eine Interaktion von PKP2 mit DSP und PKC ϵ . Hingegen war es nicht möglich, eine Bindung von PKP2 und PKC α nachzuweisen. Die IgG Probe diente der Detektion von unspezifischen Interaktionspartnern. Die Detektion von PKP2 diente als Positivkontrolle. cTnT diente als Negativkontrolle. (C) Immunoblot Analyse der Co-Immunopräzipitation von DSP zeigte eine Interaktion mit PKP2 und PKC ϵ im Eluat. Die Detektion von DSP diente als Positivkontrolle und cTnT als Negativkontrolle. (D) Die Co-Immunopräzipitation von PKC ϵ zeigte eine Interaktion mit PKP2 und DSP im Eluat. PKC ϵ Detektion diente als Positivkontrolle und cTnT als Negativkontrolle.

Die wahrscheinliche Beteiligung von PKC ϵ als kardial spezifische Isoform im DSP-PKP2-PKC Proteinkomplex wurde mittels Co-Immunopräzipitation (Co-IP) in adultem murinem Herzgewebe weiter untersucht. Für die Analyse der Bindung der Komplexpartner von PKP2 wurde das transgene HA-PKP2 WT Mausmodell nach Induktion durch Doxycyclin verwendet. Für die Co-IP von PKP2 wurde der HA-Antikörper verwendet, welcher das markierte PKP2 Protein bindet.

Mittels Western Blot Analyse wurden nach Co-IP die Interaktion der PKC ϵ Isoform mit PKP2 bestätigt, wohingegen eine Interaktion von PKP2 mit PKC α nicht detektiert wurde. Weiterhin wurde die erwartungsgemäße Bindung von DSP an PKP2 in der Co-IP belegt (Abbildung 22B). Eine weiterführende Bestätigung der Existenz des Proteinkomplexes, bestehend aus PKP2 DSP und PKC ϵ im Herzen, konnte sowohl in der Co-IP von DSP (Abbildung 26C) als auch von PKC ϵ (Abbildung 26D) verifiziert werden, da die jeweiligen Bindungspartner im Eluat nachgewiesen werden konnten. Die Bindung und Detektion unspezifischer Partner konnte durch die ausbleibende Detektion von TroponinT im Eluat und die Verwendung von reinen IgG Proben ausgeschlossen werden.

3.2.2 Hyper-Phosphorylierung von PKC ϵ Substraten und Aktivierung des Wnt unabhängigen β -Catenin Signalweges

In Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation von DSP im Zytoplasma und die somit ausbleibende Phosphorylierung zu einer erhöhten Kapazität der PKC Aktivität führt und folglich andere Isoform-spezifische Substrate hyper-phosphoryliert werden. Dies führte in Epithelzellen im Falle von PKC α zur Hyper-Phosphorylierung von Zielproteinen wie MARCKS und Adducin. Beide Proteine waren in PKP2 defizienten Kardiomyozyten nicht verstärkt phosphoryliert.

Auf der Suche nach PKC ϵ Substraten, die als potentielle Targets für die Hyper-Phosphorylierung in Frage kommen könnten, wurde zunächst die Lokalisierung von PKC ϵ nach Zerstörung des Proteinkomplexes durch siRNA gegen PKP2 sowie nach verstärkter Aktivierung von PKCs analysiert. (Abbildung 27A). Die Expression von PKC ϵ in GAPDH-siRNA transfizierten Kardiomyozyten zeigte eine diffuse Verteilung im Zytoplasma, die der endogenen Verteilung von PKC ϵ entsprach.

Im Gegensatz dazu bewirkte eine induzierte Aktivierung von PKC durch das Phorbolester PMA (100 nM für 15 min) neben einer erhöhten Expression um den Kern vor allem eine verstärkte Lokalisation von PKC ϵ an der Zellmembran. Interessanterweise konnte durch Ausschaltung von PKP2 via siRNA auch eine verstärkte Expression von PKC ϵ an der Zellmembran detektiert werden (Abbildung 27 unten).

3.2.2.1 Hyper-Phosphorylierung von Connexin 43

Ein potentielles membranständiges Substrat von PKC ϵ ist das Gap Junction Protein Connexin 43 (Cx43). Cx43 weist eine spezifische Phosphorylierungsstelle für PKC ϵ am Serin 368 auf, was auf eine hohe Membranverankerung hindeutet [Lampe *et al.*, 2000]. Western Blot Analysen zeigten eine deutliche Verstärkung der Phosphorylierung von Cx43 in Position S368 in PKP2 defizienten Kardiomyozyten, welche auch nach Aktivierung durch PMA nicht mehr entscheidend gesteigert werden konnte (Abbildung 27B). Die Expression von pan-Cx43 ist in diesen Zellen ebenfalls erhöht, was auf einen bekannten Feedback-Mechanismus zurückzuführen ist, der bei Phosphorylierung von Cx43-S368 aktiviert wird und dann zu einer erhöhten Expression von Cx43 führt [Doble *et al.*, 2000; Doble *et al.*, 2001] Im Vergleich dazu konnte eine verstärkte Phosphorylierung in Kontroll-siRNA transfizierten Kardiomyozyten nur nach PMA Aktivierung detektiert werden.

Der Verlust der PKC ϵ Expression führte hingegen zu einer sehr schwachen Phosphorylierung von Cx43 (S368), die selbst nach PMA Behandlung nicht induziert werden konnte.

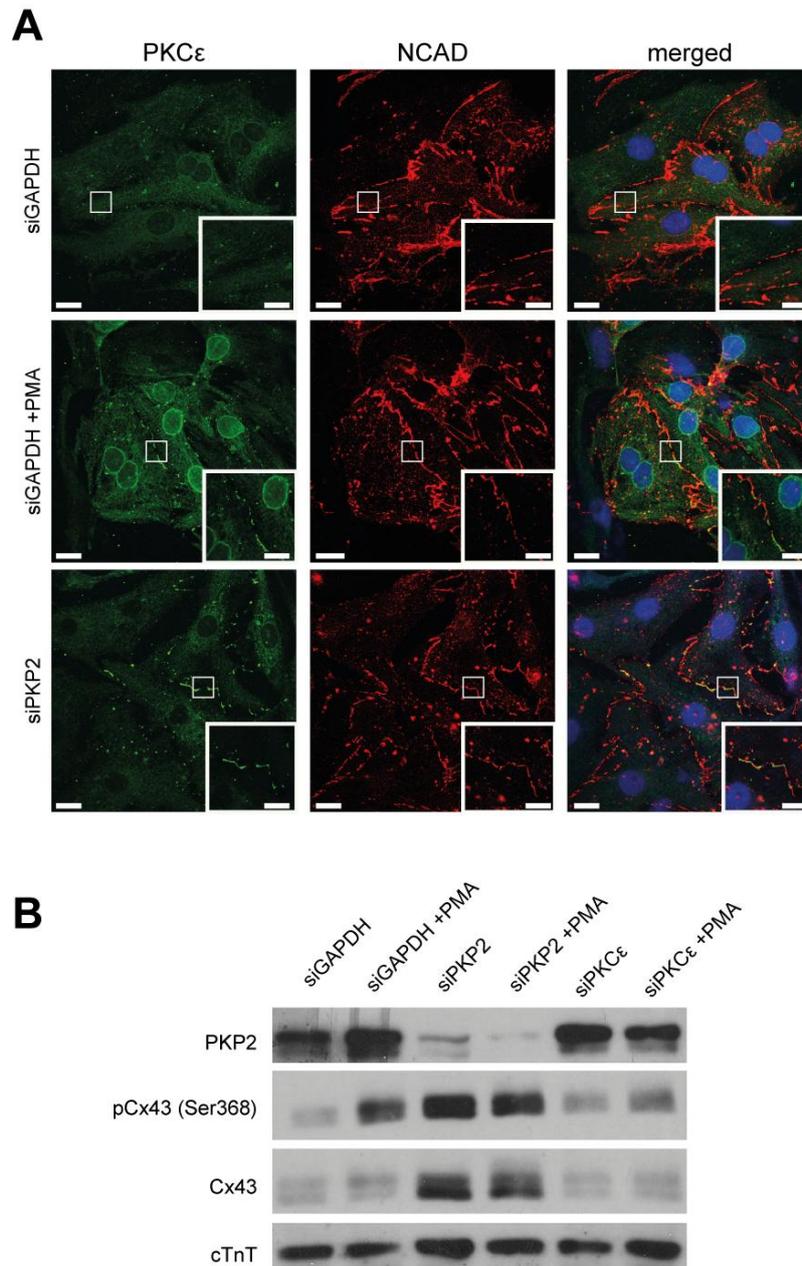


Abbildung 23: PKC ϵ Lokalisation und Hyper-Phosphorylierung von Substraten

(A) Repräsentative Immunfluoreszenz Analyse der PKC ϵ Lokalisation in neonataler Rattenkardiomyozyten. In der Kontroll-siRNA GAPDH lokalisierte PKC ϵ diffus im Zytoplasma. Die Aktivierung von PKC durch Zugabe von PMA (50 nM für 15 min) resultierte in einer verstärkten Lokalisation von PKC ϵ an der Zellmembran. Die jeweilige vergrößerte Detaildarstellung verdeutlicht die Membranständigkeit von PKC ϵ . In PKP2 defizienten Kardiomyozyten konnte PKC ϵ bereits ohne PMA Aktivierung an der Zellmembran detektiert werden. Die Gegenfärbung mit N-Cadherin diente der internen Qualitätskontrolle der Kardiomyozyten und der Visualisierung der Zell-Zellkontakte. Maßstab Übersicht, 25 μ m; Maßstab Detailvergrößerung, 5 μ m. (B) Western Blot Analyse der Phosphorylierung von Cx43 an Aminosäure Position S368 in neonatalen Rattenkardiomyozyten. In Kontroll-siRNA transfizierten Kardiomyozyten konnte erst nach PKC Aktivierung mit PMA eine erhöhte Phosphorylierung von pCx43 detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte in PKP2 defizienten Kardiomyozyten sowohl ein verstärktes Signal von pCx43 als auch Cx43 detektiert werden. Bei der Repression von PKC ϵ in neonatalen Rattenkardiomyozyten hingegen konnte keine verstärkte Phosphorylierung erkannt werden, welche sich auch durch Zugabe von PMA nicht deutlich erhöhte. cTnT diente als Ladekontrolle.

3.2.2.2 Hyper-Phosphorylierung von AKT und erhöhte Expression von LEF/TCF Zielgenen

Als weiteres PKC ϵ Substrat, welches in hyper-phosphorylierter Form vorlag, konnte AKT/Protein Kinase B (PKB) identifiziert werden. Western Blot Analysen ergaben eine verstärkte Phosphorylierung

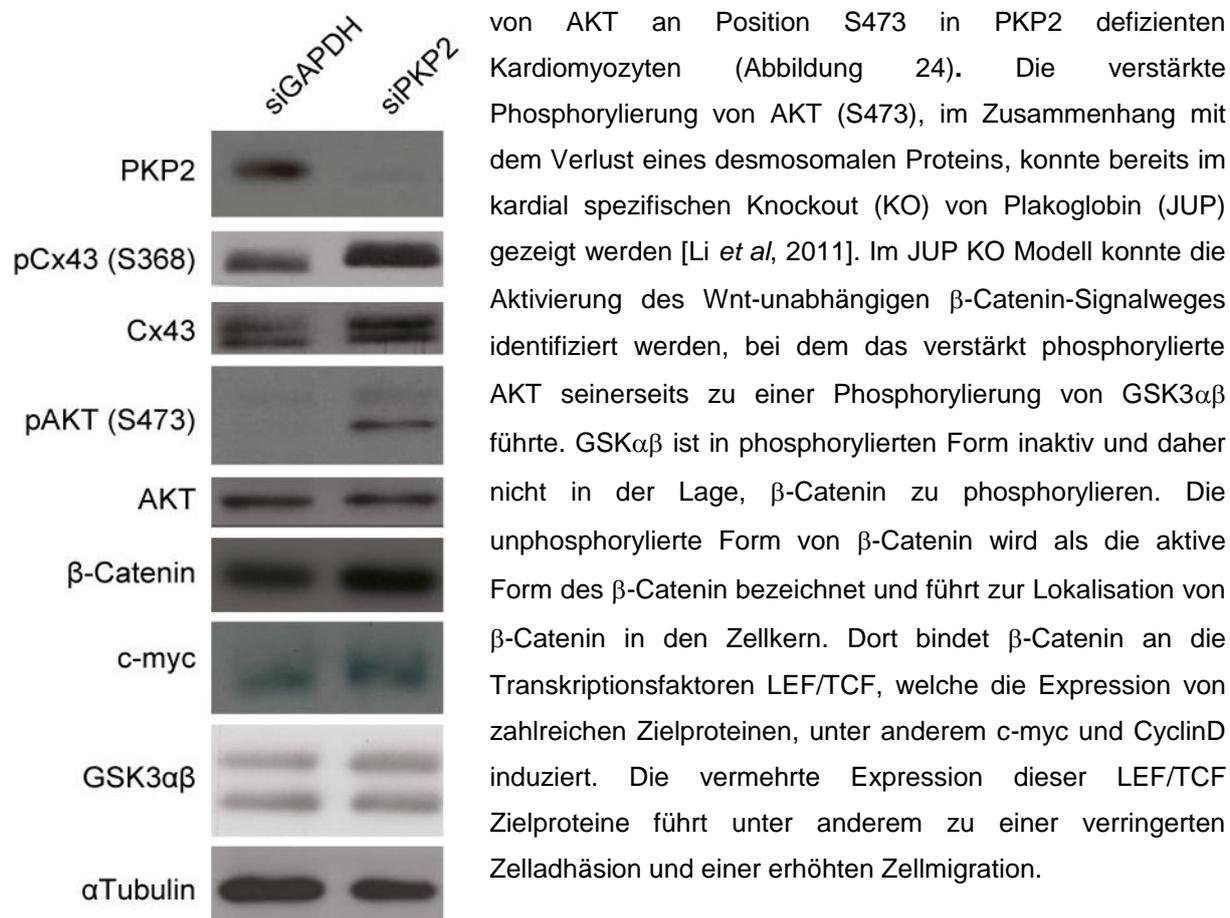


Abbildung 28: Expressionsprofil von Proteinen des Wnt-Signalweges

Repräsentativer Immunoblot der Expression von PKC ϵ Zielproteinen in neonatalen Rattenkardiomyozyten. In PKP2 defizienten Kardiomyozyten wurden die spezifischen PKC ϵ Phosphorylierungsstellen an pCx43 (S368) und p-AKT (S473) verstärkt phosphoryliert, im Vergleich zur Kontroll-siRNA. Darüber hinaus konnte im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte Expression von β -Catenin und dem LEF/TCF Zielgen c-myc detektiert werden. Die pan-GSK3 $\alpha\beta$ Expression blieb hingegen unverändert. α -Tubulin diente als Ladekontrolle.

Western Blot Analysen des β -Catenin Wnt-unabhängigen Signalweges in PKP2 defizienten Kardiomyozyten zeigten eine moderate Steigerung der β -Catenin Expression und vor allem eine erhöhte Expression des LEF/TCF- Zielproteins c-myc (Abbildung 28).

Aufgrund von experimentellen Limitationen der verwendeten neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden für die weitere Charakterisierung des Wnt-unabhängigen β -Catenin-Signalweges HL-1-Zellen (Tumorzelllinie atrialer Mauskardiomyozyten) verwendet. Die erfolgreiche Etablierung der PKP2 defizienten HL-1 Zellen durch Transfektion der spezifischen siRNA gegen PKP2 konnte mithilfe von Immunfluoreszenz Analysen bestätigt werden (Abbildung 29A).

Der Verlust der PKP2 Expression in HL-1 Zellen hatte ebenso wie in neonatalen Kardiomyozyten keine Auswirkungen auf die Expression und Lokalisation der desmosomalen Bindungspartner JUP, (Abbildung 29B) DSG2 und DSC2.

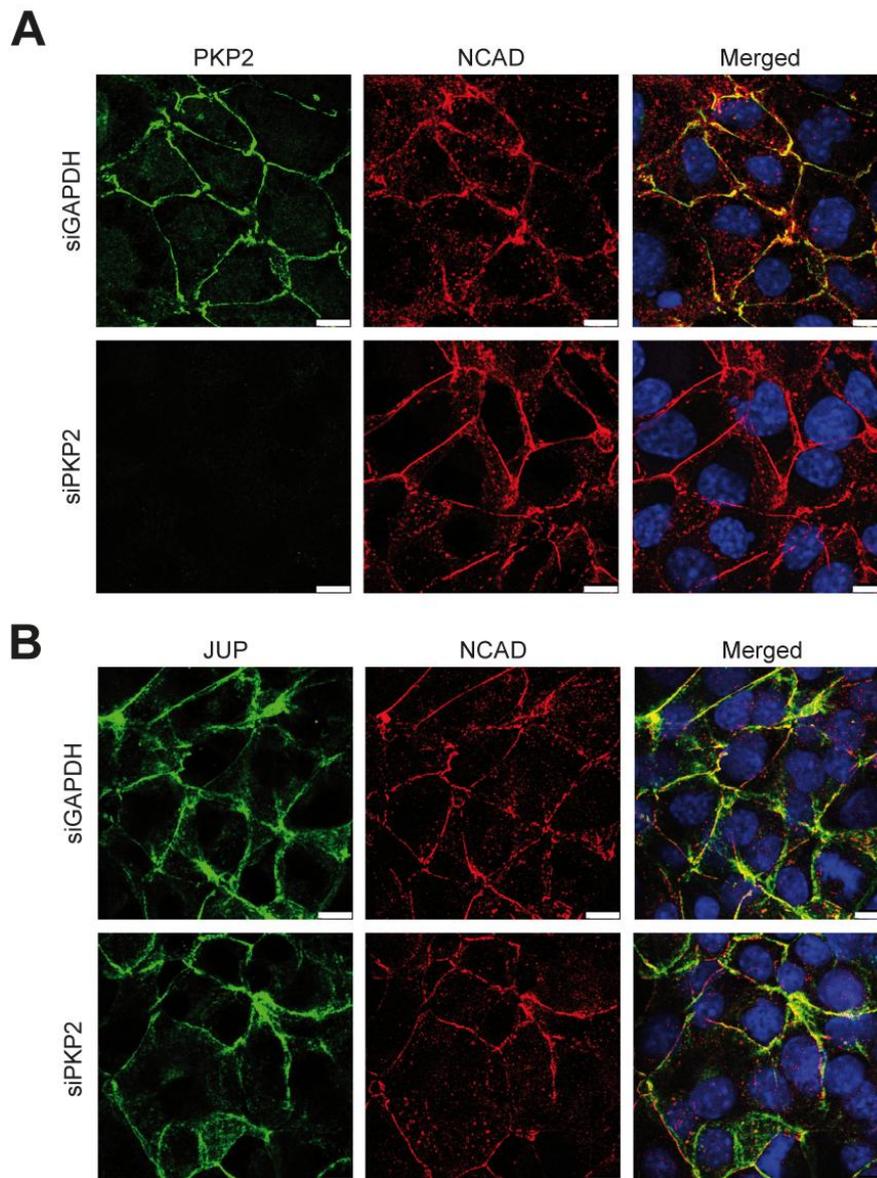


Abbildung 29: Repression der PKP2 Expression in kardialen HL-1 Zellen

(A) Repräsentative Immunofluoreszenz Analyse der Repression der PKP2 Expression führt zum Verlust des PKP2 Signals. Der Verlust der PKP2 Expression hat jedoch keinen Einfluss auf die Expression des desmosomalen Interaktionspartners JUP (B). Die NCAD Expression ist nicht verändert. Maßstab, 7,5 μ m.

Real-time PCR konnte die Verringerung der PKP2 mRNA Expression auf $20,0 \pm 8,2$ %, im Vergleich zu Kontroll-siRNA (GAPDH) behandelten Zellen quantifizieren. Des Weiteren wurde in PKP2 defizienten HL-1 Zellen neben einer leicht erhöhten DSP Expression, vor allem eine signifikant erhöhte Expression der LEF/TCF Zielgene c-myc um $4,9 \pm 1,15$ fach und CyclinD um $12,13 \pm 3,69$ fach gemessen. (Abbildung 30A).

Die Expressionsunterschiede auf mRNA Ebene konnten durch Western Blot Analysen auf Proteinebene bestätigt werden (Abbildung 30B). PKP2 defizienten HL-Zellen zeigten eine verstärkte

Phosphorylierung von AKT in Position S473 und eine leicht erhöhte β -Catenin Expression. Diese potentielle Aktivierung des Wnt-unabhängigen β -Catenin-Signalweges führte, wie zuvor auf RNA-Ebene zu einer stark erhöhten LEF/TCF vermittelten Expression von c-myc (Abbildung 30B).

Interessanterweise konnte auch im kardialen Gewebe des ARVC-Patienten (III-1) mittels Immunfluoreszenz Analyse eine erhöhte c-myc Expression, im Vergleich zum Kontrollgewebe detektiert werden (Abbildung 31).

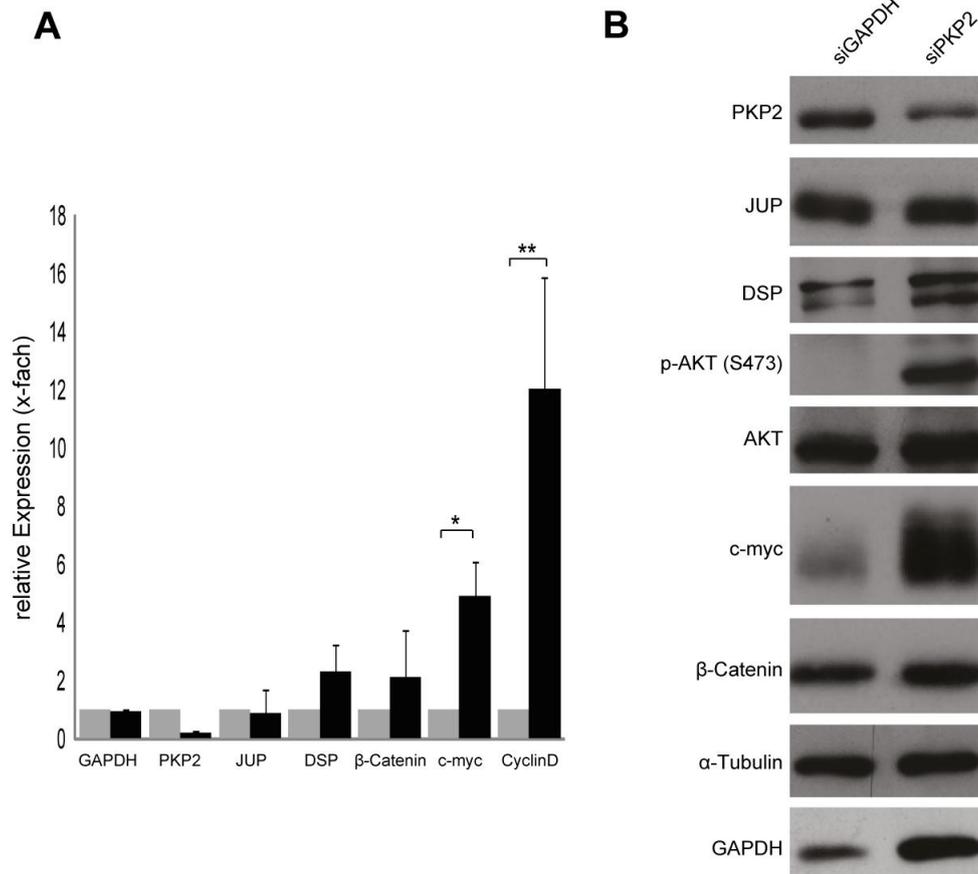


Abbildung 30: Verstärkte LEF/TCF Zielgenexpression in HL-1 Zellen

(A) Real-time PCR Analyse der relativen Genexpression von desmosomalen und Signaltransduktionsgenen in PKP2 defizienten HL-1 Zellen. Die Expression der LEF/TCF Zielgene c-myc und CyclinD sind signifikant erhöht, verglichen mit der siRNA Kontrolle. * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$. $n=3$. (B) Repräsentative Western Blot Analyse von Desmosomalen und Signaltransduktionsproteinen in PKP2 defizienten HL-1 Zellen, im Vergleich zur Kontroll-siRNA. Die Expression des desmosomalen Protein JUP ist unverändert, jedoch ist ein Anstieg der DSP Expression zu detektieren. Besonders auffällig sind die deutlich verstärkte Phosphorylierung von AKT an S473 und die Expression des LEF/TCF Zielgen c-myc in PKP2 defizienten Zellen. Die Expression von β -Catenin ist ebenfalls erhöht. GAPDH diente als Nachweis der Wirksamkeit der Kontroll-siRNA. α -Tubulin diente als Ladekontrolle.

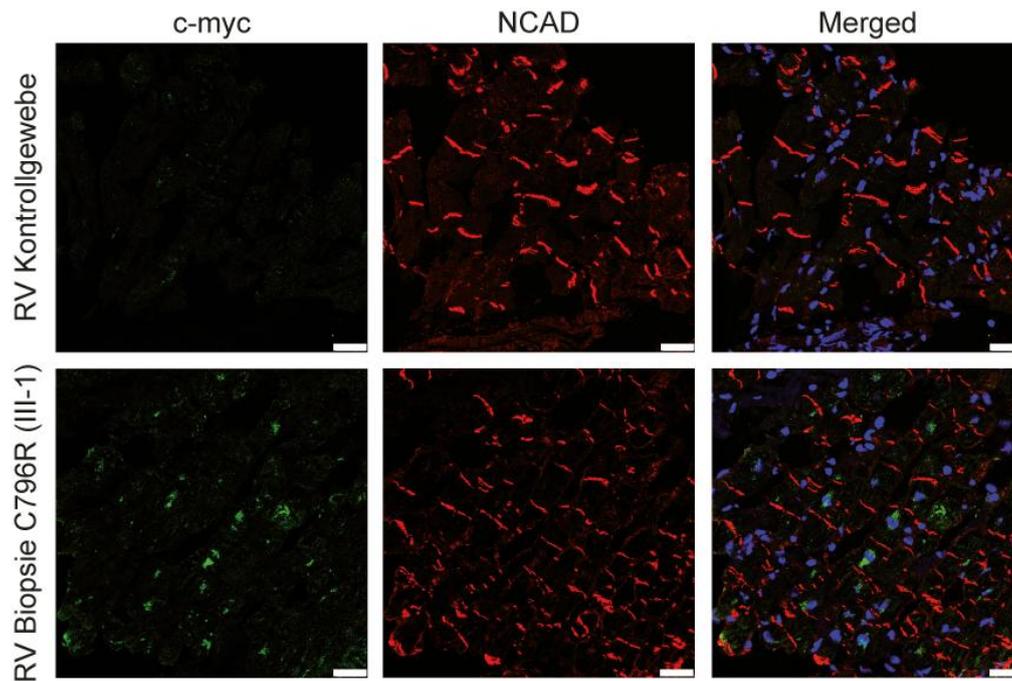


Abbildung 31: Verstärkte c-myc Expression in endokardialen Biopsiegewebe vom rechten Ventrikel (Proband III-1) im Vergleich zum Kontrollgewebe. Maßstab, 25 µm.

3.2.3 Minderung der zellulären Integrität

Desmosomen sind für die Aufrechterhaltung der zellulären Integrität verantwortlich. Der Verlust einer desmosomalen Komponente, wie PKP2, könnte folglich zu einer Schwächung dieser Integrität führen. Allerdings konnte unter basalen Zellkulturbedingungen sowohl in kontrahierenden PKP2 defizienten neonatalen Rattenkardiomyozyten als auch in kontrahierenden kardialen HL-1 Zellen keine Beeinträchtigung der interzellulären Integrität identifiziert werden.

Induziert man jedoch nun einen exogenen passiven Stress, resultierte dies in einer Verminderung des zellulären Zusammenhaltes. Durch den Einfluss des Enzyms Dispase konnte die Stabilität der zellulären Adhäsion gemessen werden. Die Dispase bewirkt vorrangig ein Ablösen adhärenter Zellen von der Oberfläche. Der dadurch abgelöste Zellrasen wurde anschließend definiert hin und her geschüttelt. Diese mechanische Belastung auf den Zellverband hatte zur Folge, dass PKP2 defizienten Zellen in zahlreiche einzelne Fragmente zerfielen, wobei sowohl die MOCK-Kontrolle (nur Transfektionsreagenz allein) als auch GAPDH-siRNA transfizierten Zellen weitgehend im Zellverband verblieben (Abbildung 32A und 32B). Dieser Dispase Assay konnte aus technischen Gründen nur in reproduzierbarer Art und Weise in Epithelzellen (A431) durchgeführt werden. Ein weiterer Ansatz zur Analyse der Beständigkeit der zellulären Integrität ist die Durchführung eines Zell-Migrations-Assays. Hierzu wurden neonatale Rattenkardiomyozyten in zwei getrennten Kammern ausgesät und mit siRNA die Expression von PKP2 bzw. GAPDH (Kontrolle) unterdrückt. Nach 120 h wurde der Steg zwischen beiden Kammern entfernt und der Abstand der beiden Zellpopulationen über die Zeit gemessen. Bereits nach 16 h konnte gezeigt werden, dass PKP2 defiziente Kardiomyozyten schneller in den Spalt einwandern als Zellen, die mit GAPDH-siRNA transfiziert wurden (Abbildung 32C und 32D).

Über einen Zeitraum von 48 h hinweg erfolgte diese Einwanderung in den Spalt signifikant schneller in PKP2 defizienten Zellen. Die Reduktion der Spaltbreite verringerte sich nach Verlust der PKP2 Expression von $0,66 \pm 0,01$ mm auf $0,27 \pm 0,06$ mm, verglichen mit der GAPDH-siRNA von $0,65 \pm 0,01$ mm auf $0,52 \pm 0,05$ mm. Diese Ergebnisse der verminderten Adhäsion und der erhöhten Migration von PKP2 defizienten Kardiomyozyten deuten auf eine beeinträchtigte zelluläre Integrität unter Einflussnahme exogener Faktoren hin, wie z.B. der mechanischen Belastung.

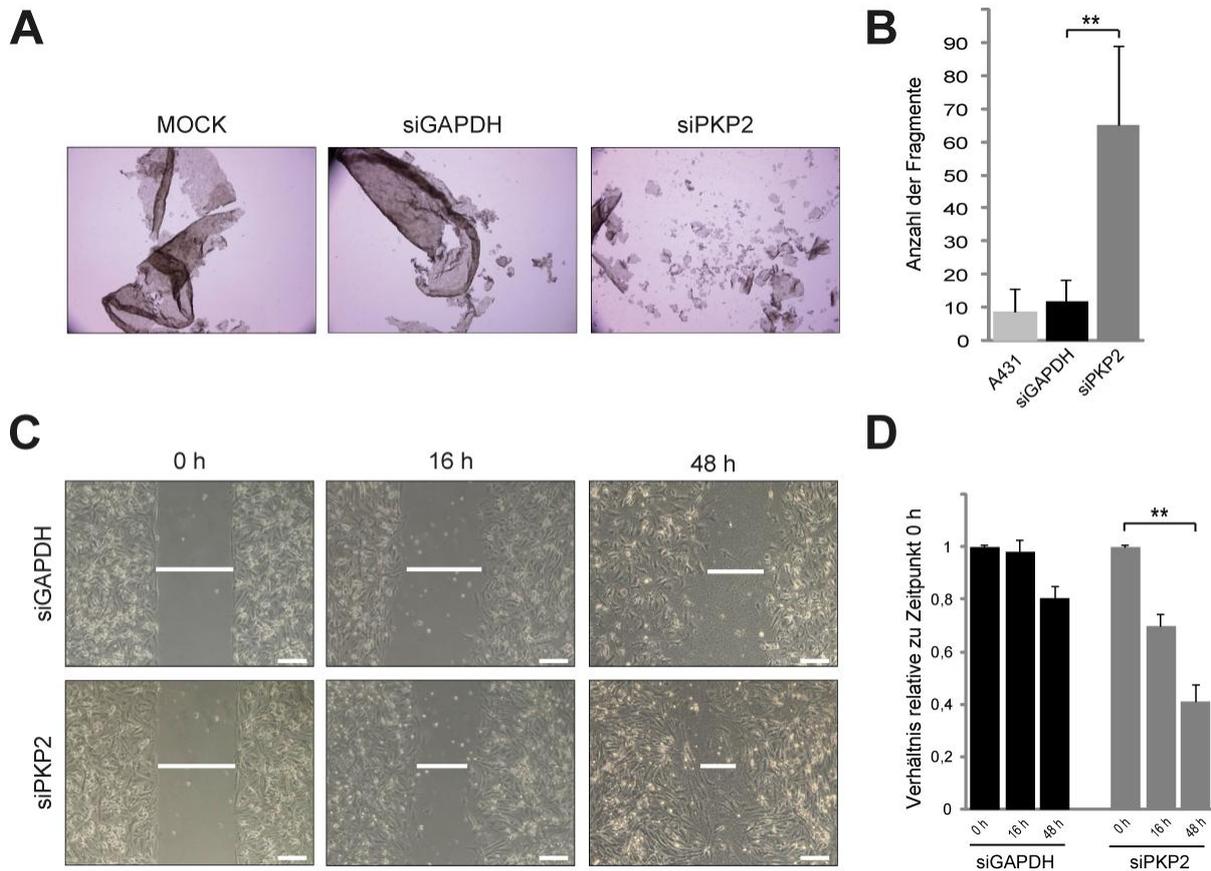


Abbildung 32: Verlust der zellulären Integrität in PKP2 defizienten Zellen

(A) Dispase Assay an epithelialen A431 nach siRNA vermittelte Repression der PKP2 Expression. PKP2 defizienten A431 Zellen zerfielen in signifikant mehr einzelne Fragmente nach Dispase Zugabe und definierter mechanischer Beanspruchung, verglichen mit MOCK- und Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. (B) Quantitative Bestimmung der entstandenen einzelnen Fragmente werden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. $**p > 0,01$. $n=3$. (C) Migrationsassay von PKP2 defizienten neonatalen Rattenkardiomyozyten, im Vergleich zur Kontroll-siRNA über die Zeit. Nach 48 h waren signifikant mehr PKP2 defiziente Kardiomyozyten in den Spalt eingewandert als die Kardiomyozyten, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Maßstab, 200 μ m (D) Quantitative Bestimmung der relativen Migrationsgeschwindigkeit der Zellen werden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. $**p > 0,01$. $n=3$.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden ARVC-verursachende Mutationen im desmosomalen Plakophilin-2 (PKP2) molekulargenetisch charakterisiert und deren Einfluss auf die Pathogenese der Arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie (ARVC) untersucht. Ausgehend von der Hypothese, dass pathogene Missense-Mutationen in den Armadillo Domänen des PKP2 in gleicher Weise zu einem Verlust des PKP2 Proteins führen, wie die überwiegend identifizierter Trunkierungsmutationen, wurden erstmals Expressionsstudien *in vitro* und *in vivo* durchgeführt.

Interessanterweise zeigte die molekulare Analyse humaner endomyokardialer Gewebeproben heterozygoter Träger der PKP2 Missense-Mutation p.C796R ein heterogenes Expressionsmuster.

Bei zwei Patienten derselben Familie konnten keine Veränderungen der PKP2 Expression detektiert werden oder der Verlust der PKP2 Expression beschränkte sich lediglich auf lokale Areale in der Nachbarschaft zu histologisch stark veränderten Gewebearealen. Im Gegensatz dazu konnten *in vitro* Expressionsstudien von verschiedenen pathogenen PKP2 Missense-Mutationen deutlich den Verlust der Proteinstabilität und Funktion demonstrieren. Die Degradation der instabilen PKP2 mutierten Proteine wurde dabei über einen Calpain Protease vermittelten Abbauprozess reguliert. Die Identifikation von degradierten stabilen Proteinfragmenten in bakteriellen Expressionsstudien verifizierte die Instabilität der Missense-Mutationen im PKP2 und verdeutlichte erstmals durch Kristallstrukturanalysen der resultierenden Proteinfragmente eine vergleichbare Degradation von Missense- und Deletionsmutationen im PKP2. Durch die kardial-spezifische Überexpression der PKP2 Mutation p.C796R im transgenen Mausmodell konnten die *in vitro* beobachtete Instabilität und Degradation von PKP2 *in vivo* verifiziert werden. Um im Weiteren die Auswirkungen des Verlustes von PKP2 aufgrund eines mutierten Allels *in vitro* zu simulieren, wurde als Modell die siRNA vermittelte Suppression der PKP2 Expression in Kardiomyozyten verwendet. Der Verlust der PKP2 Expression führte zu einer Delokalisation des desmosomalen Proteins Desmoplakin (DSP) und einer Störung des DSP-PKP2-Protein Kinase C (PKC) Komplexes, bei dem erstmals PKC ϵ als kardial spezifische Komponente dieses Komplexes identifiziert werden konnte. Die Störung des DSP-PKP2-PKC ϵ Komplexes resultierte in der Hyper-Phosphorylierung der PKC ϵ spezifischen Substrate Connexin 43 und Protein Kinase B / AKT (AKT). Die Aktivierung von AKT führte zur Regulation des Wnt-unabhängigen β -Catenin Signalweges und steigerte die Expression der LEF/TCF Zielgene c-myc und CyclinD. Die zelluläre Integrität und Stabilität konnte durch den Verlust von PKP2 nach Einfluss mechanischer Belastungen nicht mehr aufrechterhalten werden.

Zusammenfassend konnte erstmals gezeigt werden, dass ARVC-verursachende Mutationen im PKP2, unabhängig vom Mutationstyp zu instabilen Proteinen führen, die vermittelt durch Calpain Proteasen degradiert werden. Der Verlust von PKP2 resultiert in einer Reduktion der zellulären Integrität und führt zu Veränderungen von intrazellulären Signalkaskaden, die einen wesentlichen Einfluss auf die Pathogenese der ARVC haben könnten.

4.1 Verwendung endokardialer Biopsien in der ARVC Diagnostik

Die heterozygote Missense-Mutation c.2386 führt zum Austausch der Aminosäure Cystein in Position 796 des PKP2 Proteins (p.C796R). Diese Mutation wurde bereits in mehreren ARVC-Patienten beschrieben [Gerull *et al.*, 2004; van Tintelen *et al.*, 2006] und als niederländische „Founder“-Mutation identifiziert [Kapplinger *et al.*, 2011]. Durch die histologische und molekulare Analyse von endomyokardialen Gewebeproben zweier heterozygoter PKP2 p.C796R Mutationsträger (II-1, III-1) derselben Familie, konnte die Auswirkung der Mutation näher untersucht werden. Überraschenderweise konnte bei dem Probanden III-1 in der untersuchten endomyokardialen Biopsie des RV ausschließlich eine unveränderte Expression von PKP2 beobachtet werden, was entweder für ein stabiles mutiertes PKP2 Protein oder eine Hochregulierung der Expression des verbliebenen Wildtyp Allels sprechen könnte. Alle anderen desmosomalen Proteine waren ebenfalls nicht verändert. Im Gegensatz dazu zeigten Immunfluoreszenzstudien des RV des Probanden II-1 regional sehr unterschiedliche Expressionsmuster. Die Bereiche, die histologisch unverändertes Myokard aufwiesen, zeigten vermehrt eine normale PKP2 Expression, wohingegen eine starke Reduktion der immunreaktiven Signale von PKP2, JUP, DSP, DSC2 in den Regionen auftraten, die nahe an Bereiche mit charakteristischen Kennzeichen für Gewebedegeneration und Ersatz durch fibröses Gewebe grenzten. Jedoch zeigte sich auch in diesen degenerativen Gewebebereichen, dass N-Cadherin eine unveränderte Expression aufwies und sich somit die Gewebequalität selbst als ausreichend erwies. Diese Ergebnisse deuten auf einen regionalen Prozess hin, bei dem in einem lokal begrenzten Bereich eine gestörte Zelladhäsion aufgrund von starker punktueller mechanischer Belastung, Entzündungen oder anderen Faktoren auftritt. Diese Destabilisation der Membran könnte eventuell in einigen Bereichen durch eine induzierte Gewebereparatur teilweise kompensiert werden, so dass es zu einem progressiven Verlauf kommt. Betrachtet man dieses zerstreute bzw. nicht einheitliche Expressionsmuster, so wird einem das Dilemma bei der Beurteilung einer entnommenen endomyokardialen Biopsie deutlich, vor allem wenn es sich um eine diagnostische Analyse handelt. Lange Zeit galt die Histologie der endomyokardialen Biopsie als Standard in der ARVC-Diagnostik. Aktuelle Studien zeigen jedoch, dass die Entnahme einer Biopsie vor allem aus dem selten histologisch betroffenen RV-Septum eine ungenügende Sensitivität besitzt [Asimaki *et al.*, 2010]. Ein alternativer Ansatz für die Entnahme von Biopsien aus vorwiegend fibrös-fettigen Arealen, bietet das elektroanatomische Voltage-Mapping, welches die niedrigere elektrische Spannung in den betroffenen Arealen detektiert [Corrado *et al.*, 2005]. Dieses Verfahren bedarf allerdings weiterer Validierung. Vorangegangene Studien mit ARVC-diagnostizierten endomyokardialen Gewebeproben zeigten vor allem eine charakteristische Reduktion der Plakoglobin (JUP) Expression an den Glanzstreifen. Neben einem vollständigen Verlust der JUP Expression, aufgrund von Mutationen im desmosomalen Komplex, wurde jedoch auch über eine mögliche Translokation von JUP in andere Zellkompartimente spekuliert. Diese Erkenntnisse der JUP Signalreduktion wurden allerdings überwiegend in endomyokardialen Autopsien von Patienten im Endstadium der ARVC Erkrankung identifiziert [Asimaki *et al.*, 2009; Gehmlich *et al.*, 2011; Gehmlich *et al.*, 2011]. Die in dieser Arbeit untersuchten humanen Gewebeproben der heterozygoten Mutationsträger konnten einen Verlust der JUP Expression ausschließlich in vereinzelt Arealen der Autopsie des Probanden II-1 zeigen, in denen gleichzeitig auch die PKP2 Expression reduziert war.

Die kardiale Biopsie des Probanden III-1 hingegen zeigte keinerlei Veränderungen der JUP Expression in Bezug auf die Proteinmenge sowie die Signalstärke an den Glanzstreifen. Aufgrund dieser Ergebnisse bleibt es fraglich, ob überhaupt und mit welcher Sensitivität und Spezifität die Reduktion der JUP Expression als diagnostischer Marker verwendet werden kann.

Die limitierte Betrachtung einer spezifischen Missense-Mutation im PKP2 in zwei Mutationsträgern einer Familie lässt sicherlich keine Generalisierung der bisherigen Ergebnisse zu. Hierfür wären weitere Untersuchungen kardialer Gewebeproben von PKP2 Mutationsträgern notwendig, um die gewonnenen Erkenntnisse zu verifizieren.

4.2 Proteininstabilität von PKP2 Mutationen

Mutationen im PKP2 wurden mit ungefähr 45 % aller ARVC-assoziierten Mutationen am häufigsten als Ursache der ARVC identifiziert. Die Datenlage in Bezug auf deren Charakterisierung in biologischen Systemen ist jedoch sehr gering. Die identifizierten pathogenen Mutationen im PKP2 erstrecken sich über das gesamte Protein, wobei ein Großteil der Mutationen in den Armadillo (Arm) Wiederholungsdomänen lokalisiert sind. Bisherige Studien analysierten lediglich krankheitsbedingte Deletions- bzw. Missense-Mutationen, die in den N-terminalen Domänen des PKP2 lokalisiert sind (Q59L, Q62K, R79X) [Joshi-Mukherjee *et al.*, 2008; Hall *et al.*, 2009]. Die vorliegende Arbeit fokussierte sich erstmals auf Missense-Mutationen in den C-terminalen Armadillo Domänen. Zunächst wurde auf mRNA Ebene deren Stabilität untersucht und eine stabile mRNA Expression von PKP2 nachgewiesen. Somit konnte "Nonsense-mediated mRNA decay" als Mechanismus ausgeschlossen werden. Die signifikant reduzierte Proteinexpression der mutierten PKP2 Proteine, die sowohl in epithelialen als auch in kardialen Zellen nachgewiesen werden konnte, lässt sich somit auf eine verminderte Proteininstabilität zurückführen. Die Instabilität der mutierten Proteine führte zu einem kompletten Funktionsverlust von PKP2, sodass das mutierte Protein weder in die Zellmembran integriert wurde, noch mit dem desmosomalen Interaktionspartner Desmoplakin interagiert. Die Delokalisation der mutierten PKP2 Proteine im Zytoplasma wies dabei eine auffällige Akkumulation um den Zellkern auf. Eine Expression von PKP2 im Nukleus, wie in früheren Publikationen beschrieben, konnte in keiner verwendeten Zelllinie weder bei der Expression von PKP2 WT noch bei den unterschiedlichen mutierten PKP2 Protein detektiert werden [Hatzfeld *et al.*, 2007]. Die im epithelialen und kardialen Zellkulturmodell ermittelte Instabilität und Delokalisation der ARVC-assoziierten PKP2 Mutationen konnte in dieser Arbeit erstmals durch die Generierung eines transgenen Mausmodells für die pathogene Missense-Mutation p.C796R im PKP2 auch *in vivo* verifiziert werden. Die kardial spezifische Überexpression der PKP2 p.C796R Mutation ergab eine signifikant reduzierte Proteinexpression und eine Delokalisation des Restproteins von den Glanzstreifen der Kardiomyozyten in das Zytoplasma. Diese Ergebnisse der analysierten PKP2 Mutationen korrelieren mit den Beobachtungen N-terminaler Mutationen (Q59L, Q62K, R79X) sowie einer Deletionsmutante (PKP2 1-554) aus früheren Studien, bei denen ebenfalls eine Delokalisation ins Zytoplasma und eine reduzierte Expression im Vergleich zum PKP2 WT gezeigt werden konnte [Joshi-Mukherjee *et al.*, 2008; Hall *et al.*, 2009].

Diese Erkenntnisse deuten auf ein einheitliches charakteristisches Verhalten aller PKP2 Mutationen unabhängig vom Mutationstyp hin. Die intrinsische Instabilität der mutierten Proteine führte zu einer raschen post-translationalen Degradation innerhalb der ersten zwei Stunden. Ergänzende bakterielle Expressionsstudien verschiedener PKP2 Missense- und Deletionsmutationen in den Armadillo Domänen verifizierten die Instabilität der mutierten Proteine und detektierten die Degradation in identische stabile Proteinfragmente. Aufgrund technischer Limitationen, das vollständige PKP2 Protein in diesem bakteriellen Modell exprimieren zu können, beschränken sich die Strukturanalysen zurzeit auf Mutationen in den Arm Wiederholungsdomänen. Während die Armadillo Domänen der Varianten I487S und V531I stabil in Bakterien exprimiert werden konnten, resultierten alle drei untersuchten pathogenen Mutationen C752R, S571F und C649fsX697 in instabilen Proteinen, die alle in identischen Fragmente degradierten, welche sich aus den ersten fünf Armadillo Wiederholungsdomänen zusammensetzten. Die Kristallisation dieser identischen Proteinfragmente ermöglichte erstmals ein Kristallstrukturmodell der PKP2 Armadillo Domänen anhand dessen die strukturellen Auswirkungen der einzelnen Mutation auf die Proteinstruktur detailliert analysiert werden können. Obwohl die Mutationen in unterschiedlichen Armadillo Domänen und Helices lokalisiert sind, führt der zugrundeliegende Degradationsprozess zu den gleichen Proteinfragmenten, unabhängig vom Mutationstyp.

4.3 Identifikation von pathogenen PKP2 Mutationen

Die Erkenntnis, dass sowohl pathogene Missense- als auch Deletions-Mutationen im PKP2 zu instabilen Proteinen führen, die eine gestörte intrazelluläre Lokalisation sowie einen Funktionsverlust aufweisen, könnte potenziell zu diagnostischen Zwecken eingesetzt werden. Ein simples Zellkulturmodell könnte bei der Bewertung einer neu identifizierter PKP2 Variante verwendet werden, um vorhersagen zu können, ob die Variante einen negativen Effekt auf die Proteininstabilität ausübt. Für die Etablierung des Modells exprimierten wir in dieser Arbeit verschiedene Varianten, die durch herkömmlich verwendete Vorhersagemechanismen (Polyphen-2, SIFT, Konservierung etc.) als pathogen bzw. gutartig (benign) klassifiziert wurden. Unser Zellkulturmodell konnte bestätigen, dass zuvor als pathogen klassifizierte PKP2 Mutationen zu instabilen Proteinen führten und diffus im Zytoplasma lokalisierten, während zwei als gutartig (benign) klassifizierte Polymorphismen (V587I, I531S) stabile und membranständige PKP2 Proteine erzeugten. Wie diese Ergebnisse zeigen, konnte eindeutig zwischen benignen oder pathogenen PKP2 Mutationen unterschieden werden. Die Verwendung eines solchen einfachen Zellkulturtests könnte in der Zukunft eine Hilfe bei der Klassifizierung von Varianten im PKP2 sein. Bei der Bewertung von identifizierten PKP2 Mutationen würde man davon auszugehen, dass es sich bei einer nachgewiesenen Proteininstabilität mit gleichzeitig auftretender Delokalisation, um eine pathogene PKP2 Mutation handelt. Zeigt die unbekannt Variante jedoch eine stabile Proteinexpression und/oder membranständige Lokalisation, so wäre deren Pathogenität in Frage gestellt.

Ergänzend dazu könnten Strukturanalysen der etablierten Kristallstruktur der PKP2 Armadillo Domänen verwendet werden, um detaillierte Vorhersagen der Konsequenzen der Mutation auf die Proteinfaltung und Stabilität machen zu können, unter der Voraussetzung, dass die identifizierte PKP2 Mutation innerhalb der Arm Wiederholungsdomänen lokalisiert ist.

4.4 Degradation der mutierter PKP2 Proteine

Eukaryotische Zellen verfügen über zahlreiche Proteindegradationssysteme, um fehlgefaltete bzw. anormale oder nicht mehr benötigte Proteine abzubauen. Um der Frage nachzugehen, ob die instabilen ARVC-assoziierten PKP2 Mutationen über einen spezifischen Degradationsprozess abgebaut werden, wurden die bedeutenden proteolytischen Signalwege im Zellkulturmodell blockiert. Weder spezifische Inhibitoren für das Ubiquitin-Proteasom System (UPS) (MG132) noch für die Lysosom-vermittelnde Autophagie (3-MA) führten zu einer Stabilisierung der PKP2 Missense-Mutation p.C796R auf Proteinebene. Diese Ergebnisse verifizieren die Daten einer früheren Studie, die ebenfalls das Ubiquitin-Proteasom Systems (UPS) als möglichen zugrundeliegenden Degradationsprozess anderer mutierter Proteine nicht nachweisen konnten [Hall *et al.*, 2009]. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit den spezifischen Calpain Protease Inhibitoren ALLN und ZLL in epithelialen HeLaM2 Zellen sowie in kardialen HL-1 Zellen zu signifikant erhöhten Expressionslevel der PKP2 Missense-Mutation p.C796R. Für die Verifizierung des spezifischen Einflusses der Calpain Proteasen in den Degradationsprozess des mutierten Proteins, wurden die endogenen Calpain Proteasen durch eine erhöhte Kalziumkonzentration aktiviert. Diese Aktivierung der Calpain Proteasen führte zu einer signifikant schnelleren Degradation der PKP2 Mutation. Diese verstärkte Degradation wirkte sich spezifisch auf das instabile mutierte Protein aus, da andere intakte endogene Zielproteine der Calpain Proteasen wie z.B. α -Actinin hingegen in dem untersuchten Zeitraum keine Expressionsänderungen aufwiesen. Der Effekt der Stabilisation der PKP2 Missense-Mutation p.C796R durch die Calpain Inhibitoren und die beschleunigte Degradation des mutierten Proteins nach Aktivierung der Calpain Protease lassen den Schluss zu, dass mutierte PKP2 Proteine durch einen Calpain-Protease vermittelten Degradationsprozess abgebaut werden. Über den generellen Degradationsprozess desmosomaler Proteine an sich ist bisher wenig bekannt. Die Calpain Proteasen übernehmen in der Zelle wichtige regulatorische Funktionen bei der Signaltransduktion, der Apoptose sowie der proteolytischen Spaltung von Proteinen des Zellzyklus sowie des Zytoskeletts [Perrin *et al.*, 2002; Glading *et al.*, 2002; Goll *et al.*, 2003; Bartoli *et al.*, 2005]. Nach bisherigem Kenntnisstand konnte keine Interaktion von Calpain Proteasen und desmosomalen Proteinen nachgewiesen werden. Allerdings konnte eine Interaktion zwischen den Calpain Proteasen und dem PKP2 verwandten Armadillo Protein p120-catenin beschrieben werden, welche eine grundsätzlich mögliche Bindung der Calpain Proteasen an PKP2 darstellt [Carnahan *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011]. Die Calpain Protease-vermittelte Degradation von mutierten PKP2 Proteinen könnte speziell in Kardiomyozyten weiterführende Effekte auf zelluläre Prozesse ausüben, da die Calpain Proteasen als wichtige Regulatoren der Proteolyse von myofibrillären Proteine fungieren [Galvez *et al.*, 2007; Goll *et al.*, 2008].

Die Störung des sensiblen Calpain Signalweges und des damit verbundenen myofibrillären Netzwerkes durch die pathogenen PKP2 Mutationen könnten die zelluläre Integrität vermindern und so einen Einfluss auf die Pathologie der ARVC ausüben. Weiterführende Analysen sind notwendig, um die generelle Bedeutung des Calpain Protease-vermittelten Degradationsprozesses von ARVC-assoziierten PKP2 Mutationen zu verifizieren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Missense-Mutation p.C796R zu einer Fehlfaltung des PKP2 Proteins führt, die zu einem Zerfall in kleinere, teilweise stabile, Proteinfragmente führt. Inwiefern diese Instabilität des mutierten PKP2 Proteins und die vermeidlich stabilen existierenden Fragmente einen direkten Einfluss auf zelluläre Prozesse ausüben, konnte durch die verwendeten Versuchsmodelle nicht abschließend geklärt werden. Der Einfluss instabiler mutierter PKP2 Proteine auf zelluläre Prozesse könnte sich durch die andauernde Degradation der fehlgefalteten Proteine negativ auswirken. Die Degradation der mutierten PKP2 Proteine könnte möglicherweise zu einer Aktivierung des zellulären Endoplasmatischen Retikulum (ER)-Stress führen. Erste Ergebnisse zeigten, dass die Expression von pathogenen PKP2 Mutationen zu einer Aktivierung des ER-Stresses über die Chaparone vermittelte GRP78 und p-PERK Kaskade führte. Die Induktion von ER-Stress kann in der Zelle weitreichende genregulatorische Veränderungen bedingen, welche u.a. zum Zelltod führen können [Hedge *et al.*, 2010; Minamino *et al.*, 2010]. Weiterführende Studien sind zur Verifizierung des Einflusses der PKP2 Mutationen auf die Induktion von ER-Stress notwendig. Darüber hinaus könnten die in den anhaltenden Abbauprozess der mutierten Proteine beteiligten Calpain Proteasen durch eine vermehrte Aktivierung über die Zeit eine Induktion des ER-Stresses zur Folge haben und zur Degradation der Kardiomyozyten führen [Wang *et al.*, 2008]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die aus früheren Studien beschriebene verstärkte Apoptose in kardialem ARVC-Gewebe nicht primär auf die mutierten PKP2 Proteine zurückzuführen sind [Nagata *et al.*, 2000; Yamaji *et al.*, 2005]. Sowohl der Apoptose kennzeichnende TUNEL-Assay als auch die Expression des Apoptose Marker Cleaved-Caspase 3 zeigten keinen verstärkten programmierten Zelltod in Expressionsstudien pathogener PKP2 Mutationen.

4.5 Genetischer Mechanismus der ARVC-verursachenden PKP2 Mutationen

Autosomal dominante Mutationen in Genen der desmosomalen Proteine sind die grundlegende Ursache für die Pathogenese der ARVC. Der genetische Mechanismus, der diesen dominanten Mutationen im PKP2 zugrunde liegt, ist bisher nicht eindeutig identifiziert. Die in dieser Arbeit analysierten Missense-Mutationen könnten entweder einen dominant negativen Effekt ausüben oder zu einer Haploinsuffizienz führen. Der Mechanismus des dominant negativen Effektes ist begründet auf stabile fehlgefaltete mutierte Proteine, die neben einem möglichen Funktionsverlust einen negativen Einfluss auf zelluläre Prozesse ausüben.

Im Gegensatz dazu führt bei der Haploinsuffizienz der vollständige Verlust bereits eines mutierten Allels entweder durch eine instabile mRNA Expression (mRNA mediated decay) oder die Instabilität des mutierten Proteins mit anschließender Degradation zur Pathogenese der Erkrankung.

Für die Aufklärung des genetischen Mechanismus der ARVC-assoziierten Mutationen im PKP2 könnte aufgrund der Identifikation von rund 90 % Deletionsmutationen im PKP2 verstärkt eine zugrundeliegende Haploinsuffizienz postuliert werden. Die Analysen in dieser Arbeit und vorangegangene Studien demonstrierten für verschiedene Deletionsmutationen sowie Missense-Mutationen stabile Level der mRNA Expression, so dass der Mechanismus des mRNA mediated decay für die untersuchten ARVC-assoziierten PKP2 Mutationen ausgeschlossen werden kann [Hall *et al.*, 2009]. Neben der Vielzahl an Deletionsmutationen konnten auch 10 % pathogene Missense-Mutationen im PKP2 identifiziert werden, die einen dominant negativen Effekt zur Folge haben könnten. Jedoch konnte durch die in dieser Arbeit durchgeführten Zellkultur- und Tiermodellversuche sowie ergänzenden Proteinstrukturanalysen eindeutig eine Proteininstabilität der zahlreichen Missense-Mutationen sowie der Deletionsmutationen im PKP2 aufgezeigt werden. Diese Instabilität der ARVC-assoziierten Proteine, unabhängig vom Mutationstyp, würde die Hypothese des zugrundeliegenden genetischen Mechanismus der Haploinsuffizienz bestätigen. Diese Evidenz basierten *in vitro* und *in vivo* Daten stehen jedoch zunächst teilweise im Kontrast zu den erhobenen Erkenntnissen der Gewebeanalysen humaner PKP2 Mutationsträger. So konnte in der Biopsie des Patienten III-1, der heterozygot die *in vitro* charakterisierte instabile PKP2 Missense-Mutation p.C796R PKP2 trägt, kein Areal identifiziert werden, welches eine Reduktion der PKP2 Expression aufzeigte. Im Vergleich hierzu demonstrierte die Analyse der Autopsie eines weiteren ARVC-diagnostizierten Familienmitgliedes neben Bereichen mit vollständigem Verlust der PKP2 Expression jedoch auch Areale, in denen die PKP2 Expression unverändert zu detektieren war. Die Ergebnisse dieser ARVC diagnostizierten endomyokardialen Gewebeproben mit der heterozygot tragenden PKP2 Missense-Mutation p.C796R würde für sich betrachtet einen dominant negativen Effekt der Mutation im Gegensatz zur Haploinsuffizienz favorisieren. Betrachtet man jedoch die erstmals detaillierte molekulargenetische Charakterisierung der ARVC-assoziierten Missense-Mutationen, so ist die Beteiligung eines rein dominant negativen Effekts der PKP2 Mutationen in der Pathogenese der ARVC sehr unwahrscheinlich. Auf der zugrundeliegenden Datenlage resultiert die Hypothese, dass die heterozygoten Mutationen im PKP2 zu einem Verlust des betroffenen Allels führen. Dieser Verlust könnte durch die Beteiligung eines kompensatorischen Feedback-Mechanismuses auf Transkriptionsebene durch eine erhöhte Regulation des PKP2 Wildtyp Allels zunächst ausgeglichen werden. Dieser Feedback-Mechanismus würde die beobachteten identischen Level der PKP2 Expression in den ARVC-diagnostizierten endomyokardialen Gewebeproben erklären können. Solch ein potentieller Kompensationsmechanismus auf transkriptioneller Ebene könnte einer sensiblen inter- und intrazellulärer Regulation unterliegen, die eventuell primär in Abhängigkeit genetischer Prädispositionen bzw. aufgrund des geführten Lebensstils der PKP2 Mutationen tragenden Individuen beeinflusst wird. Ein wesentlicher Faktor könnten die Auswirkungen von spezifischen Stressfaktoren sein. Von großer Bedeutung könnte hierbei der biomechanischen Beanspruchung des Gewebes sein. Pathohistologische Analysen charakterisierten Areale mit häufig auftretenden Atrophien des myokardialen Gewebes im sogenannten Dysplasiedreieck (subtrikuspidal, apikal oder rechtsventrikulärer Ausflusstrakt) [Herren *et al.*, 2009]. Eine besonders starke mechanische Beanspruchung könnte daher bewirken, dass der postulierte Feedback-Mechanismus über die Zeit den Verlust eines Allels nicht weiter kompensieren kann.

Darüber hinaus könnte als weiterer Stressfaktor die permanent in der Zelle ablaufende Degradation der instabilen PKP2 Proteine einen negativen Einfluss ausüben, in dem sie in der Folge zu intrazellulärem ER-Stress führen könnte und somit eine mögliche Induktion von Apoptose bzw. Nekrose initiiert. Eine Verifizierung dieser Hypothese steht jedoch noch aus. Ein weiteres Argument für den Einfluss eines Kompensationsmechanismus durch das gesunde PKP2 WT Allel ist die Tatsache, dass rezessive Mutationen im PKP2 zur Naxos Erkrankung führen, die neben dem kardialen Phänotypen vor allem durch anormale Phänotypen der Haare und der Haut charakterisiert sind [Coonar *et al.*, 1998]. Bei diesen rezessiven Mutationen ist der postulierte Kompensationsmechanismus im Gegensatz zu den dominanten Mutationen im PKP2 nicht möglich, aufgrund des Fehlens eines endogenen PKP2 WT Allels. Unter dem Aspekt, dass die dominanten Mutationen im PKP2 zu einer kardial spezifischen Erkrankung führen, wird deutlich gezeigt, dass der Verlust eines PKP2 Allels durch die weiteren Plakophiline PKP1 und PKP3, z.B. in Epithelzellen der Haut, ebenfalls eindrucksvoll kompensiert werden können.

Zusammenfassend betrachtet, lässt sich aus den detaillierten *in vitro* und *in vivo* Charakterisierungen verschiedener Mutationstypen im PKP2 und der *in vivo* Analyse von humanem Patientenmaterial weder der genetische Mechanismus der Haploinsuffizienz noch der dominant negativen Effekt in der Pathogenese der ARVC eindeutig identifizieren. Basierend auf der Instabilität heterozygoter mutierter PKP2 Proteine kann grundsätzlich von dem Verlust des betroffenen PKP2 Allels ausgegangen werden. Der Einfluss weiterer intrazellulärer Regulationsprozesse muss in weiteren Studien verifiziert werden.

4.6 Vergleich von PKP2 zu anderen desmosomalen Proteinen

Die detaillierte Charakterisierung von unterschiedlichen ARVC-bedingenden PKP2 Mutationen erbrachte unter Einbeziehung vorangegangener Studien die Erkenntnis einer einheitlichen Instabilität der resultierenden mutierten PKP2 Proteine [Joshi-Mukherjee *et al.*, 2008; Hall *et al.*, 2009]. Aufgrund der Tatsache, dass PKP2 als häufigstes Krankheitsgen der ARVC identifiziert wurde, stellt sich die Frage, ob ebenfalls Missense-Mutationen in den anderen ARVC-bedingenden desmosomalen Proteinen ähnliche Charakteristika aufweisen. Die meisten Studien existieren zu ARVC-bedingenden Mutationen in den desmosomalen Cadherinen. Sowohl Missense-Mutationen als auch Deletionsmutationen im Desmoglein2 (DSG2) weisen zwar ebenfalls eine diffuse Lokalisation im Zytoplasma auf, aber im Gegensatz zu PKP2 Mutationen, werden diese mutierten DSG2 Proteine stabil exprimiert [Pilichou *et al.*, 2009; Krusche *et al.*, 2010]. Ähnliche Ergebnisse einer stabilen Expression von mutierten Proteinen konnten in mehreren ARVC-assoziierten Missense-Mutationen im Desmocollin 2 (DSC2) analysiert werden [Beffagna *et al.*, 2007; Gehmlich *et al.*, 2010].

Neben den desmosomalen Cadherinen konnte eine stabile Proteinexpression von ARVC-assoziierten Missense-Mutationen sowohl im Desmoplakin [Yang *et al.*, 2006] als auch im Plakoglobin (JUP) [Asimaki *et al.*, 2007] nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden neben diesen *in vitro* Zellkulturexperimenten vor allem die desmosomalen Cadherine in transgenen Mausmodellen untersucht.

Die kardial spezifische Überexpression von Mutationen im DSG2 und DSP führte zu einem vorzeitigen Tod der Versuchstiere und zeigte unter anderem eine verstärkte Fibrose im Myokard, die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie und eine erhöhte ventrikuläre Apoptose- bzw. Nekrose Rate [Yang *et al.*, 2006; Pilichou *et al.*, 2009; Krusche *et al.*, 2011]. Derartige Erkenntnisse konnten in dem in dieser Arbeit generierten transgenen PKP2 Mausmodell derzeit unter basalen Bedingungen nicht verifiziert werden. Ein wesentlicher Grund dafür liegt in der unterschiedlichen Stabilität der mutierten PKP2 Proteine, verglichen zu den anderen desmosomalen Proteinen. Aufgrund von *in vitro* und *in vivo* Daten kann postuliert werden, dass ein Großteil der Missense-Mutationen in den desmosomalen Proteinen DSC2, DSG2, JUP und DSP zu einem dominant negativen Effekt führt, der einen direkten negativen Einfluss auf zelluläre Prozesse nehmen könnte. Der genaue Mechanismus dieser negativen Einflussnahme ist derzeit noch unklar. Im Gegensatz dazu nehmen ARVC-assoziierte Mutationen im PKP2 eine gesonderte Stellung ein. Bisher identifizierte pathogene Missense-Mutationen führen einzig im PKP2 zu instabilen Proteinen und zum Verlust der mutierten heterozygoten Allele. Die Identifikation eines einheitlichen genetischen sowie molekularen Mechanismus der ARVC für alle identifizierten desmosomalen und nicht-desmosomalen Krankheitsgene ist aufgrund der differenziellen molekulargenetischen Charakteristika eher unwahrscheinlich.

4.7 Auswirkungen des Verlustes von PKP2

Die in dieser Arbeit identifizierte Proteininstabilität von pathogenen Mutationen im desmosomalen PKP2 und dem daraus resultierenden Verlust der PKP2 Expression, führte im Weiteren zu der Frage nach den Konsequenzen eines Verlustes von PKP2 auf die zelluläre Integrität sowie die Effekte auf intrazelluläre Signaltransduktionswege, speziell in kardialen Zellen. Als Modell für die Analyse der Auswirkungen des Verlustes von PKP2 wurde die siRNA vermittelte Suppression der PKP2 Expression in ausdifferenzierten neonatalen Rattenkardiomyozyten angewendet. Der signifikante Verlust der PKP2 Expression in neonatalen Rattenkardiomyozyten entsprach, in Bezug auf die Effektivität der Suppression von ca. 90 % und einer Reinheit der isolierten Kardiomyozyten von fast 100 % den Ergebnissen früherer Studien [Pieperhoff *et al.*, 2008]. Die PKP2 defizienten Kardiomyozyten wiesen unter basalen Bedingungen keine Veränderungen im adhärennten Zellverband auf. Die Expressionsanalysen sowohl der desmosomalen Cadherine DSC2 und DSG2 als auch des ARM-Domänen Proteins JUP zeigten keine signifikanten Unterschiede, im Vergleich zur Kontroll-siRNA GAPDH. Im Gegensatz dazu, zeigte die Expression des desmosomalen Proteins DSP eine auffällige Akkumulation im Zytoplasma der Zelle. Ähnliche Beobachtungen einer Delokalisation von DSP in Folge eines Funktionsverlustes von PKP2 durch pathogene Mutationen konnte bereits in dieser Arbeit in Co-Expressionsstudien im Zellkulturmodell identifiziert werden.

Diese Ergebnisse verifizieren, dass die DSP Lokalisation in der Zelle abhängig ist von der Anwesenheit des funktionsfähigen PKP2 Proteins. Frühere Studien in Epithelzellen postulierten bereits, dass PKP2 eine essentielle Rolle bei der Etablierung von Desmosomen als Komponente eines Komplexes spielt, welcher aus DSP-PKP2-Protein Kinase C α (PKC α) besteht und für die Integration von DSP in den desmosomalen Membrankomplex verantwortlich ist [Godsel *et al.*, 2005].

Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass sowohl in PKP2 defizienten als auch PKC α defizienten Epithelzellen sich dieser Komplex auflöst und aufgrund der ausbleibenden Phosphorylierung von DSP durch PKC α , akkumuliert das unphosphorylierte DSP in der Zelle [Bass-Zubeck *et al.*, 2008]. Dieser beschriebene Komplex ist im Zytoplasma lokalisiert und PKP2 fungiert dabei als essentielles Linkerprotein, um die Vermittlung der Interaktion zwischen der PKC und DSP zu initiieren [Wallis *et al.*, 2000]. Es wird postuliert, dass nachdem PKC α an DSP gebunden hat, die Kinase DSP an Position p-S2849 phosphoryliert und DSP als Folge der Phosphorylierung in den Membrankomplex eingebaut werden kann. Die Auflösung des Komplexes führte zu einer gesteigerten Phosphorylierung anderer Zielproteine von PKC α . Diese Erkenntnisse aus Epithelzellen über die Existenz und die Bedeutung dieses Komplexes für die desmosomale Etablierung sollte durch diese Arbeit weiterführend in kardialen Zellen verifiziert werden. Die Analyse der PKP2 defizienten neonatalen Rattenkardiomyozyten resultierte, wie bereits beschrieben, zu einer Akkumulation von DSP im Zytoplasma, jedoch führte der Verlust von PKC α in kardialen Zellen zu keiner Veränderung in der DSP Expression. Die Bedeutung der PKC Isoform PKC α in kardialen Zellen ist essentiell für die Regulation der Kontraktilität der Zelle [Bian *et al.*, 1998]. PKC α vermittelt unter anderem die Phosphorylierung des Inhibitorproteins p-I, welches über Phospholamban wiederum den Calciumkanal des Sarcoplasmatischen Retikulums (SR) SERCA2 reguliert. Aktivitätsänderungen von PKC α könnten daher zu erheblichen Störungen der sensiblen kardialen Kontraktilität führen und zu einer Beeinträchtigung der kardialen Funktion beitragen [Braz *et al.*, 2004]. Diese Aspekte könnten Gründe dafür sein, dass in kardialen Zellen eine andere PKC Isoform an dem desmosomalen DSP-PKP2-PKC Komplex beteiligt ist. Unter der Annahme der grundsätzlichen Existenz dieses Komplexes, unter Beteiligung einer spezifischen PKC Isoform in Kardiomyozyten, wurde die ebenfalls kardial bedeutsame PKC Isoform PKC ϵ genauer untersucht. PKC ϵ reguliert eine Vielzahl von Strukturproteinen, Signalproteinen, wie z.B. Connexin 43, und ist beteiligt an diversen Signaltransduktionswegen. Zahlreiche Experimente identifizierten nach Inhibition und siRNA vermittelter Suppression der PKC Isoform PKC ϵ eine Delokalisation von DSP von der Membran ins Zytoplasma. Für die weitere Verifizierung dieses kardial spezifischen Komplexes wurden diverse Co-IPs in murinem Myokardgewebe durchgeführt. Die Co-IP von PKP2 bestätigte die Interaktion mit DSP und der PKC Isoform PKC ϵ . Die jeweiligen Co-IP der anderen beteiligten Mitglieder des Komplexes DSP und PKC ϵ wiesen jeweils die Interaktion mit den beiden anderen beteiligten Proteinen auf. Eine Interaktion mit der PKC Isoform PKC α konnte in keiner Co-IP nachgewiesen werden. Die Spezifität der jeweiligen Interaktionen konnte durch die ausbleibende Detektion von Kontrollproteinen minimiert werden. Zusammenfassend zeigten die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, dass die Existenz des DSP-PKP2-PKC Komplexes in Kardiomyozyten verifiziert werden konnte.

Verglichen mit Epithelzellen konnten wir jedoch anstelle von PKC α die Beteiligung der PKC Isoform PKC ϵ im kardialen desmosomalen Komplex identifizieren. Die Auflösung dieses Komplexes aufgrund des Verlustes von PKP2 führte neben der Akkumulation von DSP zu einer Freisetzung der PKC ϵ , welche in der Folge in Lage waren, andere Zielproteine vermehrt zu phosphorylieren. In PKP2 defizienten Epithelzellen hatte die Auflösung des Aufbaukomplexes eine Hyper-Phosphorylierung unter anderem des PKC α Zielproteins α -Adducin und MARCKS zur Folge [Bass-Zubeck *et al.*, 2008].

Diese verstärkte Phosphorylierung der PKC α Substrate konnte jedoch in kardialen Zellen nicht detektiert werden. Im Vergleich dazu wiesen PKP2-defiziente Kardiomyozyten eine verstärkte Phosphorylierung der PKC ϵ Zielproteine Cx43 und AKT auf. Diese Hyper-Phosphorylierung von PKC ϵ Zielproteinen und die ausbleibende Phosphorylierung von PKC α Zielproteinen bestätigten erneut die Beteiligung von PKC ϵ an diesem Komplex zur desmosomalen Etablierung in Kardiomyozyten.

4.8 Protein Kinase C ϵ und die Hyper-Phosphorylierung spezifischer Substrate

Durch die erstmalige Identifikation von PKC ϵ als spezifischer Interaktionspartner von DSP und PKP2 und der damit nachgewiesenen Beteiligung am DSP-PKP2-PKC Komplex der kardialen Desmosomen, führte zu der Frage nach der Bedeutung der PKC ϵ in Kardiomyozyten.

PKC ϵ ist in der Myokardzelle an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt, wie unter anderem an der Regulationen der Gap Junctions, Modulation der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und Interaktion mit Proteinen der Myofilamente [Newton *et al.*, 2010]. *In vitro* und *in vivo* Studien in Kardiomyozyten konnten zeigen, dass der Verlust von PKC ϵ zu einer Aktivierung des p38 Signalweges führt und eine gestörte diastolische Funktion zur Folge hat [Klein *et al.*, 2005]. Im Gegensatz dazu resultierte die Überexpression von PKC ϵ zu einer dilatativen Kardiomyopathie aufgrund von veränderter Phosphorylierung von Proteinen des Myofilamentes [Montgomery *et al.*, 2005]. Die in dieser Arbeit beschriebene Auflösung des desmosomalen DSP-PKP2-PKC Komplexes durch den Verlust der PKP2 Expression führte neben einer ausbleibenden DSP Phosphorylierung zu einer Freisetzung von PKC ϵ aus dem Komplex in das Zytoplasma. Bei dieser Freisetzung erhält PKC ϵ das Potential, andere spezifische Substrate zu hyper-phosphorylieren [Newton *et al.*, 2010]. Interessanterweise wurde nach Auflösung des Aufbaukomplexes in PKP2 defizienten neonatalen Rattenkardiomyozyten die Lokalisation von PKC ϵ vermehrt entlang der Zellmembran detektiert.

Ein in der Zellmembran vorkommendes PKC ϵ spezifisches Substrat ist das Gap Junction Protein Cx43. Frühere Arbeiten identifizieren eine direkte Phosphorylierung von Cx43 an S368 durch PKC ϵ in Kardiomyozyten [Lampe *et al.*, 2000; Palatinus *et al.*, 2011]. Die Analyse dieser PKC ϵ spezifischen Phosphorylierungsstelle an S368 des Cx43 zeigte nach Verlust der PKP2 Expression eine deutlich verstärkte Phosphorylierung. Weitere Phosphorylierungsstellen, wie zum Beispiel an Serin 262, die nicht primär von PKC ϵ phosphoryliert werden, zeigten keine Veränderung des Phosphorylierungsstatus. Diese Beobachtungen zeigten erstmals eine erhöhte Cx43 Expression, resultierend durch eine Hyper-Phosphorylierung des PKC ϵ spezifischen Zielproteins Cx43 in ausdifferenzierten PKP2 defizienten Kardiomyozyten.

In früheren Studien führte, abweichend von den zugrundeliegenden Ergebnissen, der Verlust der PKP2 Expression in kardialen Zelllinien hingegen zu einer verringerten Expression der gesamten Cx43 Expression und beeinträchtigte die Cx43 vermittelte Zell-Zell Kommunikation [Oxford *et al.*, 2007; Fidler *et al.*, 2009; Gehmlich *et al.*, 2011; Sato *et al.*, 2009]. Im Unterschied zu den aufgeführten Studien wurde der Verlust der PKP2 Expression erst nach vollständiger Ausdifferenzierung der neonatalen Kardiomyozyten induziert, in der keine Proliferation mehr stattfindet.

Eine weiterführende Analyse der Cx43 Expression ist bekanntermaßen sehr komplex, da das Cx43 Protein eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt und sich daher die Gap Junction Komplexe in einem andauernden Auf- und Abbauprozess befinden, der in Abhängigkeit von unterschiedlichen Bedingungen variabel sein kann [Severs *et al.*, 2008; Ai *et al.*, 2010; Imanaga *et al.*, 2010; Dunn *et al.*, 2012]. Darüber hinaus stellt die Phosphorylierung von Connexin43 einen Schlüsselmechanismus für die Regulation der Gap Junction Kommunikation dar. Die PKC ϵ spezifische Phosphorylierungsstelle des Cx43 an S368 ist überwiegend an der Zellmembran lokalisiert und bewirkt bei Hyper-Phosphorylierung einen Anstieg der gesamt Cx43 Expression, bevor ein negativer Feedback-Mechanismus eingeleitet wird, der die Cx43 Expression stark verringert [Doble *et al.*, 2001]. Unsere *in vitro* Ergebnisse korrelierten interessanterweise mit unseren *in vivo* Daten der Patientenbiopsie III-1, in der wir ebenfalls eine gesteigerte Expression von phosphoryliertem Cx43 am Serin 368 detektierten konnten, wobei das Level an totalem Cx43 Expression unverändert blieb. Die Tatsache allerdings, dass die Biopsie eine unveränderten Menge der PKP2 Expression aufweist, lässt die Frage offen, ob und wie das mutierte Protein oder der Verlust von PKP2 einen Einfluss auf den desmosomalen DSP-PKP2-PKC ϵ -Komplex und die Cx43 Phosphorylierung *in vivo* einnimmt. Die in dieser Arbeit ebenfalls analysierte Autopsie des Patienten II-1 demonstrierte hingegen eine fortschreitende Cx43 Reduktion. Jedoch ist nicht eindeutig aufzuklären, ob derartige Veränderungen der Gap Junction Proteine in einem 76 Jahre alten Patienten mit einer Anamnese anderer kardialer Beschwerden auf eine ARVC bedingende Cx43 Reduktion zurückzuführen ist. Inwiefern dieser veränderte Phosphorylierungsstatus einen Einfluss auf die Induktion möglicher auftretender Arrhythmien sein könnte und Auswirkungen auf die Pathogenese der ARVC haben könnte, kann erst durch weiterführende elektrophysiologische Studien detaillierter analysiert werden [Chu *et al.*, 2010].

4.9 Regulation des β -catenin Signalweges

Die Freisetzung von PKC ϵ aus dem kardialen desmosomalen DSP-PKP2-PKC ϵ Komplex als Folge des Verlustes der PKP2 Expression führte neben der Hyper-Phosphorylierung von Cx43 (S368) des Weiteren zu einer erhöhten Phosphorylierung des PKC ϵ spezifischen Substrates Protein Kinase B/AKT (AKT) an Position S473 [Zhang *et al.*, 2005]. Sowohl in PKP2 defizienten Kardiomyozyten als auch HL-1 Zellen konnte eine deutlich verstärkte Phosphorylierung von AKT detektiert werden. Die durch Phosphorylierung aktivierte Kinase AKT wirkt u.a. regulierend in Prozesse der Proliferation, der Zellviabilität und der kardiovaskulären Homöostase [Fulton *et al.*, 1999]. Ähnliche Beobachtungen einer erhöhten kardialen AKT Phosphorylierung nach Verlust eines desmosomalen Proteins konnten in adulten homozygoten JUP Knockout Mäusen gezeigt werden [Li *et al.*, 2011].

Der Verlust des kardialen JUP Proteins führte neben einem progressiven Verlust von Kardiomyozyten und dem Auftreten massiver Fibrose zu einer Stabilisierung des JUP homologen Proteins β -catenin und einer Aktivierung des Wnt/ β -catenin unabhängigen Signalweges. Frühere Studien postulierten bereits eine Veränderung des β -catenin Signalweges in der Pathogenese der ARVC [Garcia-Gras *et al.*, 2006]. Der Verlust der DSP Expression *in vitro* und im Knockout (KO) Mausmodell zeigte, dass der Verlust von DSP zu einer Delokalisation von JUP in den Zellkern führte.

Diese Akkumulation von JUP im Nukleus resultierte in einer kompetitiven Interaktion mit β -catenin um die Bindung an dem Transkriptionsfaktorkomplex LEF (lymphoid enhancer factor-1)/ TCF (T-cell factor) [Hecht *et al.*, 1999]. Diese Suppression des Wnt/ β -catenin-abhängigen Signalweges durch die LEF/TCF spezifischen Zielgene bewirkt eine verstärkte Induktion von Adipogenese, Fibrose und Apoptose [Zhurinsky *et al.*, 2000]. Die in dieser Arbeit untersuchten Auswirkungen des Verlustes der PKP2 Expression in kardialen Zellen detektierten jedoch keine Translokation von JUP in den Nukleus. Die Analyse des β -catenin/LEF/TCF Signalweges zeigte hingegen eine verstärkte Expression von β -catenin und eine erhöhte Expression der LEF/TCF Zielgene c-myc und CyclinD. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Daten des JUP KO. Der Verlust der JUP Expression im KO-Mausmodell führte zu einer Stabilisierung des zytoplasmatischen β -catenin und einer damit resultierenden höheren Transkriptionsaktivität. Diese β -catenin Stabilisierung erfolgte durch die ausbleibende Phosphorylierung von β -catenin durch die verantwortliche Kinase GSK3, die ihrerseits aufgrund einer verstärkten Phosphorylierung durch AKT inaktiviert wurde [Kaidanovich *et al.*, 2011; Cross *et al.*, 1995]. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, resultiert die Aktivierung von AKT in PKP2 defizienten Kardiomyozyten aus der verstärkten Phosphorylierung durch PKC ϵ . Eine vermehrte Aktivierung von AKT vermittelt darüber hinaus eine direkte Phosphorylierung von β -catenin an Position S552 und bewirkt eine Dissoziation von der Zellmembran in das Zytoplasma sowie in den Kern [Fang *et al.*, 2007]. Sowohl in PKP2 als auch in JUP defizienten Kardiomyozyten transloziert das stabilisierte unphosphorylierte β -catenin in den Nukleus und bindet an die Transkriptionsfaktoren LEF/TCF. Die Interaktion von β -catenin mit LEF/TCF führte zu einer verstärkten Induktion der Expression spezifischer Zielgene wie u.a. c-myc und CyclinD. Interessanterweise ergaben Immunofluoreszenzanalysen der humanen Biopsie des Probanden III-1 ebenfalls ein relativ stark erhöhtes c-myc Signal im Vergleich zur verwendeten Kontrolle. Diese auf eine Probandenprobe limitierte Beobachtung könnte dennoch einen Hinweis darauf geben, dass das mutierte PKP2 Allel, trotz der insgesamt quantitativ unveränderten PKP2 Expression, zu einer Beeinflussung intrazellulärer Signalwege beiträgt, welche zur Aktivierung des LEF/TCF/ β -catenin führt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die unterschiedliche Regulation des β -catenin Signalweges in Abhängigkeit vom desmosomalen Protein differenziert zu betrachten ist. Der Verlust von DSP führte zu einer Suppression des β -catenin Signalweges, wohingegen die ARM-Wiederholungsproteine PKP2 und JUP eine Aktivierung des β -catenin Signalweges bewirkten. Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass eventuell mehrere unterschiedliche Faktoren auf die Pathogenese der ARVC einwirken. Die stärkeren Auswirkungen des Verlustes von JUP auf den β -catenin Signalweg und andere zelluläre Prozesse im Gegensatz zu PKP2 defizienten Zellen lässt sich zum einen damit begründen, dass in JUP defizienten Zellen stabilisiertes β -catenin ohne kompetitive Hemmung durch JUP an die Transkriptionsfaktoren LEF/TCF binden kann und dadurch eine stärkere Zielgen Expression hervorgerufen wird. Zum anderen unterliegt ein direkter Vergleich zwischen *in vivo* und *in vitro* Studien vielen Limitationen. Nichtsdestotrotz bewirkt der Verlust von JUP und PKP2 eine erhöhte Expression der LEF/TCF Zielgene, welche zu einer verstärkten Hypertrophie, gesteigertem Zellwachstum und vermehrter Zellmigration führt, welches eine gleichzeitige bedingte Schwächung der Zelladhärenz bewirkt [Chen *et al.*, 2006; Haq *et al.*, 2003].

4.10 Auswirkungen des Verlustes von PKP2 auf die zelluläre Integrität

Desmosomen etablieren vorrangig die zelluläre Integrität unterschiedlicher Zelltypen, wie z.B. Epithelzellen oder Kardiomyozyten, die gewissen internen oder externen Beanspruchungen ausgesetzt sind. Desmosome wirken Belastungen wie Druck, Zug oder Dehnung protektiv entgegen. Genetische oder molekulare Veränderungen im desmosomalen Komplex (DSG2, DSC2, JUP, PKP2 und DSP) führen zu einer Minderung der zellulären Integrität [Getsios *et al.*, 2004; Garrod *et al.*, 2005; Green *et al.*, 2007; Garrod *et al.*, 2008].

Die in dieser Arbeit analysierten ARVC-assoziierten Mutationen im PKP2 führten zu instabilen PKP2 Proteinen, die funktionell und strukturell entarteteten. Diese Instabilität der PKP2 Mutationen resultierte im Verlust des PKP2 Proteins. Überexpressionsanalysen dieser pathogenen PKP2 Mutationen im Zellkulturmodell als auch im Tiermodell führten jedoch zu keiner signifikanten Veränderung der Zell-Zellkontakte bzw. der zellulären Integrität. Ein wesentlicher Grund könnte die Überexpression der pathogenen Mutation in einem genetischen Hintergrund von zwei endogenen funktionsfähigen PKP2-WT Allelen sein. Diese funktionsfähigen PKP2 Allele kompensierten mögliche Effekte, die die pathogene PKP2 Mutation auslösen könnte. Um die spezifischen Auswirkungen des Verlustes der PKP2 Expression auf die zelluläre Integrität genauer zu analysieren, wurde die PKP2 Expression durch siRNA in Kardiomyozyten sowie Epithelzellen supprimiert. Der nahezu vollständige Verlust der PKP2 Expression führte unter basalen Bedingungen sowohl in verschiedenen Epithelzellen als auch in isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten zu keiner signifikanten Veränderung der zellulären Integrität bzw. zu einer vermehrten Auflösung vorhandener Zell-Zellkontakte. Die essentielle Bedeutung von PKP2 bei der Aufrechterhaltung der zellulären Integrität konnte bereits in der frühen Entwicklung im homozygoten PKP2 KO Mausmodell demonstriert werden [Grossmann *et al.*, 2004]. Der Verlust von PKP2 führte bereits im frühen Embryonalstadium an Tag 10.75 zum Tod des Embryos. Da es sich bei ARVC-bedingten PKP2 Mutationen jedoch um heterozygot dominante Mutationen handelt und die Prävalenz bzw. die Symptome der ARVC erst im jungen erwachsenen Alter zum Vorschein treten, haben die pathogenen PKP2 Mutationen nachweislich keinen primär negativen Effekt in der embryonalen und postnatalen Entwicklung. Die möglichen Auswirkungen des mutierten Allels können somit über einen langen Zeitraum der Entwicklung von dem endogen intakten Allel kompensiert werden. Ein wesentlicher Prädiktor für den eintretenden Verlust der zellulären Integrität könnte daher die Einwirkungen von endogenem oder exogenem erzeugten Stress auf die Zelle sein.

In PKP2 defizienten Zellen im Zellkulturexperimente wirkt per se ein relativ geringes Maß an Stress auf die Zellen ein. Der Verlust der PKP2 Expression und die damit verbundene Schwächung des desmosomalen Komplexes könnte unter den gegebenen zellulären Bedingungen entweder durch das Linkerprotein JUP oder die Adherens Junctions kompensiert werden. Jedoch führte die Ausübung von passivem Stress, in Form des Ablösens der adhärennten Zellen von der Oberfläche mittels Dispase und anschließendem definierten mechanischen Schütteln in PKP2 defizienten epithelialen A431 Zellen, zu einer signifikanten Vereinzelnung der Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Der induzierte exogene Stress konnte folglich nicht mehr von den PKP2 defizienten Zellen kompensiert werden und resultierte in einem Verlust der zellulären Integrität, welche eine Zellvereinzelnung zur Folge hatte.

Diese Erkenntnisse verdeutlichen die essentielle Bedeutung der PKP2 Expression für die Aufrechterhaltung der desmosomalen Struktur, welche notwendig sind, um biomechanischen Stressfaktoren entgegen wirken zu können bzw. zu kompensieren. Frühere Publikationen konnten vergleichbare Beobachtungen bei dem Verlust der PKP1 Expression bzw. bei stabilen mutierten JUP Expression demonstrieren [South *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2008].

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass in ausdifferenzierten PKP2 defizienten neonatalen Rattenkardiomyozyten die Migration signifikant erhöht war, im Vergleich zur Kontrolle. Die gesteigert Migration resultiert aus der verminderte Adhäsion der Zell-Zellkontakte nach dem Verlust der PKP2 Expression. Diese Beobachtungen korrelieren mit den Erkenntnissen dieser Arbeit, dass der Verlust der PKP2 Expression zu einer Aktivierung des LEF/TCF/ β -catenin Signalkaskade führte und die stärkere Expression von c-myc und CyclinD zur Folge hatte, welche einen aktivierenden Einfluss auf die Zellmigration ausüben. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Einwirkungen von passiven mechanischen Stressfaktoren im PKP2 defizienten Zellkulturmodell zu einer deutlichen Minderung der zellulären Integrität führt. Diese artifiziellen passiven Stressfaktoren sind jedoch mit den physiologischen Bedingungen, die auf den einzelnen Kardiomyozyten wirken nicht vergleichbar. Unter physiologischen Bedingungen unterliegen Kardiomyozyten einer ständigen mechanischen Zugbelastung aufgrund der permanenten Kontraktion des gesamten Herzmuskels. Diese biomechanische Beanspruchung wirkt sich darüber hinaus zum einen auf die elektrische Kommunikation aus und zum anderen wirkt sie regulierend auf intrazelluläre Signalwegen [Yamada *et al.*, 2005; Michaelson *et al.*, 2012]. Inwiefern der Verlust der zellulären Integrität in PKP2 defizienten Zellen einen Einfluss auf diese Mechanotransduktion ausübt ist bislang unbekannt. Um diesen physiologischen Stressfaktor auf den kardialen Zellkulturansatz zu übertragen, etablierten wir ein mechanisches Stressmodell, bei dem neonatalen Rattenkardiomyozyten auf eine flexible Silikonoberfläche ausgesät wurden, die dann über ein computergesteuertes Vakuumsystem definierter Zugbelastungen über die Zeit ausgesetzt werden [Hornberger *et al.*, 2005; Salameh *et al.*, 2010]. Erste Vorversuche dieser Applikation von mechanischem Stress auf PKP2 defiziente Kardiomyozyten über einen Zeitraum von 48 h zeigten zwar keinen signifikanten Verlust der zellulären Integrität, jedoch konnte neben einer verstärkter Delokalisation von DSP in das Zytoplasma eine verminderte Expression der desmosomalen Cadherine detektiert werden. Diese Form der aktiven Stressapplikation bietet erstmals die Möglichkeit auf molekularer Ebene die Auswirkungen von mechanischem Stress auf die kardialen Desmosomen im Zellkulturansatz zu untersuchen.

Technische Optimierung und weiterführende Analysen werden notwendig sein, um detaillierte Aussagen über den Einfluss der verminderten zellulären Integrität in PKP2 defizienten Kardiomyozyten auf die Pathogenese der ARVC machen zu können.

4.11 Limitationen verwendeter Modelle

Für die Charakterisierung pathogener Mutationen im PKP2 und deren Einfluss auf die komplexe Pathogenese der ARVC wurden in dieser Arbeit verschiedene *in vitro* und *in vivo* Modelle verwendet, die jeweils spezifischen Limitationen unterliegen:

Die Erkenntnisse der analysierten Gewebeproben von ARVC diagnostizierten PKP2 Mutationsträgern (p.C796R) kennzeichnen jeweils einen limitierten Einzelfall und können daher nicht als allgemein gültig angesehen werden. Dennoch ist die Bedeutung der Analyse solcher wertvollen Biopsien unabdingbar für die Aufklärung der Pathogenese der ARVC. Weitere Analysen von PKP2 Mutationsträgern dieser analysierten Familie bzw. anderer Familien sind für eine Verifizierung der identifizierten Erkenntnisse notwendig.

Die strukturelle Charakterisierung der PKP2 Mutationen konnte aufgrund von bereits bekannten Stabilitätsproblemen nicht an der vollständigen Sequenz der PKP2 in *E.coli* durchgeführt werden, sondern beschränkte sich auf die stabil exprimierten Arm Domänen des PKP2. Die zu analysierenden pathogenen Mutationen und Varianten waren jedoch alle in den Arm-Wiederholungsdomänen des PKP2 lokalisiert und es konnte daher die spezifischen Auswirkungen auf die Proteinfaltung und Stabilität erstmals untersucht werden.

Die Übertragung von zellulären Vorgängen im myokardialen Gewebe in ein Zellkulturmodell unterliegt mehreren Limitationen: Die geeignetste sekundäre kardiale Zelllinie sind HL-1 Zellen, die aufgrund ihres Expressionsprofils und der spontanen rhythmischen Kontraktilität dem endogenen Kardiomyozyten physiologisch und funktionell sehr ähnlich sind. HL-1 Zellen entstammen einem arteriellen Mauskarzinom und unterscheiden sich in ihrer Morphologie deutlich von primären bzw. adulten Kardiomyozyten. Aufgrund der starken Zell-Zellverbindungen der HL-1 Zellen sowie der festen Adhäsion an die Oberfläche eignet sich diese Zelllinie nicht, um die Auswirkungen auf die zelluläre Integrität untersuchen zu können.

Neben den kardialen HL-1 Zellen wurden in dieser Arbeit primäre neonatale Rattenkardiomyozyten als weiteres kardial spezifisches Zellkulturmodell verwendet. Neonatale Kardiomyozyten zeichnen sich im Gegensatz zu adulten Kardiomyozyten vor allem durch die Aktivierungen von postnataler Genexpression und Proliferationsprogrammen aus, die mögliche Auswirkungen des Verlustes der PKP2 Expression beeinflussen könnten. In dieser Arbeit wurde darauf Wert gelegt, dass vor siRNA Behandlung die neonatalen Rattenkardiomyozyten sich mindestens drei Tage in Kultur befanden, um möglichst ausdifferenzierte Kardiomyozyten zu analysieren. Die Verwendung von isolierten adulten Mauskardiomyozyten ermöglicht eine detaillierte physiologische Charakterisierung des adulten kardialen Gewebes. Die Limitationen der isolierten adulten Kardiomyozyten liegen vor allem in der Zellvereinzelnung, so dass die Auswirkungen auf die Zell-Zellkontakte nicht analysiert werden können. Des Weiteren können Überexpressionsstudien nur durch virale Transfektion erreicht werden.

Aufgrund der kurzen Überlebenszeit in der Zellkultur eignen sich adulte Mauskardiomyozyten nur für eine Analyse eines sehr kurzen Betrachtungszeitraums. Allen kardialen Zellmodellen gemeinsam ist die Tatsache, dass sie nicht die endogene physiologische Situation im kardialen Gewebe abbilden. Bei den verwendeten kardialen Modellen handelt es sich primär um reine Kardiomyozytenkulturen.

Das kardiale Gewebe setzt jedoch aus einer Vielzahl von verschiedenen Zelltypen zusammen. Neben den Myozyten besteht das Herz aus kardialen Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen. Die Zusammensetzung konnte für das Rattenherz mit einem Verhältnis von 30 % kardialen Myozyten zu 70 % Nicht-Myozyten beschrieben werden [Souders *et al.*, 2009]. Eine besondere Bedeutung für die interzelluläre Kommunikation spielt dabei die dynamische Interaktion zwischen Kardiomyozyten, Fibroblasten und der Extrazellulären Matrix (ECM) [Banerjee *et al.*, 2006]. In allen angewandten Zellkulturmodellen dieser Arbeit konnten Auswirkungen auf diesen Interaktionskomplex nicht mit einbezogen werden.

Mit dem generierten transgenen PKP2 Mausmodell konnte erstmals die humane ARVC-assoziierte Missense-Mutation im PKP2 kardial spezifisch *in vivo* überexprimiert werden. Als Limitation dieses Systems ist anzumerken, dass die Überexpression der PKP2 Mutation im endogen genetischen Hintergrund zweier intakter muriner PKP2 Allele stattfindet, die möglicherweise die Auswirkungen der PKP2 Mutation auf zelluläre Prozesse bzw. auf die zelluläre Integrität kompensieren könnten.

4.12 Ausblick

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse geben zum ersten Mal Einblicke in die Auswirkungen von ARVC-verursachenden PKP2 Mutationen und deren mögliche Einflüsse in die Pathogenese der ARVC. Diese Erkenntnisse eröffnen eine Reihe von Fragestellungen für weiterführende Arbeiten. Diese erstrecken sich über alle hier behandelten Themengebiete, von dem spezifischen Proteinabbauprozess der mutierten PKP2 Proteine über die Folgen des Verlustes der PKP2 Proteinexpression bis hin zur Charakterisierung des transgenen PKP2-C796R Phänotyps.

- 1) Für die weitere Charakterisierung der Auswirkungen von pathogenen PKP2 Mutationen auf die Proteinfaltung und Proteinstruktur werden post-translationale Modifikationen der PKP2 Sequenz dabei helfen, die Kristallisierung eines vollständigen PKP2 Proteins zu ermöglichen. Vor allem die Identifikation des strukturellen Aufbaus der N-terminalen Domänen des PKP2 wird neue funktionelle Erkenntnisse der Interaktion von PKP2 ermöglichen.
- 2) Es ist von besonderem Interesse, den spezifischen Calpain-vermittelten Abbauprozess der instabilen mutierten PKP2 Proteine durch weitere funktionelle Assays und Interaktionsanalysen näher zu verifizieren. Des Weiteren muss die Beteiligung weiterer Degradationsprozesse in den Abbau des mutierten PKP2 Proteins untersucht werden. Ebenso ist die mögliche Induktion von ER-Stress durch die andauernde Degradation der mutierten PKP2 Proteine bzw. der aktivierter Calpain Proteasen detailliert durch Expressionsstudien *in vitro* und *in vivo* zu ermitteln.
- 3) Der kardiale Verlust der PKP2 Expression demonstrierte die Auflösung des DSP-PKP2-PKC ϵ Komplexes und führte zur Hyper-Phosphorylierung der PKC ϵ spezifischen Substrate Cx43 und AKT. Inwieweit weitere PKC ϵ Substrate einer verstärkten Phosphorylierung unterliegen, muss in weiterführenden Expressionsanalysen charakterisiert werden.

Des Weiteren ist es notwendig durch elektrophysiologische Experimente aufzuklären, ob die Modulation der Cx43 Phosphorylierung einen Einfluss auf die Induktion von Arrhythmien ausübt. Ferner könnte die beobachtete Aktivierung des LEF/TCF/ β -catenin Signalweges in Folge der Phosphorylierung von AKT durch Reportersysteme wie u.a. dem Luziferase-basierten TOP/FOPflash Assay verifiziert werden. Zusätzlich ist es von großem Interesse, durch microarray-Experimente bzw. real-time PCR Assays von PKP2 defizienten Kardiomyozyten die Regulation weiterer Signalwege zu identifizieren und näher zu charakterisieren.

- 4) Die Bedeutung des Verlustes der PKP2 Expression auf die zelluläre Integrität konnten in ersten Vorversuchen durch die Einwirkung von biomechanischem Stress auf die Zellen verdeutlicht werden. Weiterführende Optimierung des FLEXCELL System wird erforderlich sein, um die zellulären Veränderungen im Zuge der mechanischen Beanspruchung in PKP2 defizienten Kardiomyozyten zu analysieren und mögliche Veränderungen der zellulären Integrität und Mechanotransduktion zu ermitteln. Als weiteres vielversprechendes Modell zur Übertragung der physiologischen Bedingungen des Herzens in das Zellkulturmodell gilt das Tissue Engineering [Domian *et al.*, 2009]. Dieses Modell ermöglicht es die Interaktion zwischen Kardiomyozyten, Fibroblasten und der ECM gezielt nachzubilden und deren Auswirkungen auf die Einwirkung von biomechanischem Stress zu analysieren.
- 5) Für die weitere Aufklärung des molekularen Mechanismus der ARVC ist die Analyse geeigneter Tiermodelle von entscheidender Bedeutung. Erstmals wurde in dieser Arbeit ein kardial spezifisches transgenes PKP2 Mausmodell geniert, welches die Möglichkeit der Charakterisierung einer ARVC-assoziierten PKP2 Mutation *in vivo* bietet. Weiterführende Studien werden sich mit der detaillierten Aufklärung des Phänotyps der transgenen PKP2 Mutation (p.C796R) sowie des PKP2-WT auf histologischer, molekularer und funktioneller Ebene befassen. Ferner werden die Auswirkungen der Induktion der transgenen PKP2 Mutante in unterschiedlichen Stadien der Entwicklung untersucht. Erste Untersuchungen ergaben, dass die Expression der PKP2 Mutation p.C796R keinen signifikanten Einfluss auf das Mausmodell ausübte. Interessanterweise führt der Verlust eines PKP2 Alleles im heterozygoten PKP2 KO Mausmodell unter basalen Bedingungen weder zu einer erhöhten Letalität noch zu anderen phänotypischen Veränderungen [Grossmann, 2005]. Der Verlust einer einzigen Kopie von PKP2 führt per se daher nicht zu einem Verlust der zellulären Integrität und zur Entstehung eines ARVC ähnlichen Phänotyps. Im Vergleich dazu konnten frühe Studien zeigen, dass der vollständige Verlust von PKP2 im klassischen homozygoten KO Mausmodell zur embryonalen Letalität führte [Grossmann *et al.*, 2004]. Das weiterführende Modell eines kardial-spezifischen homozygoten induzierbaren KO Mausmodell wurde parallel zu dieser Arbeit ebenfalls in der Arbeitsgruppe Herrn Professor Dr. Ludwig Thierfelder generiert und phänotypisiert. Erste unveröffentlichte Daten zeigen eine erhöhte Sterblichkeit nach Induktion der Deletion der beiden PKP2 Allele. Ein interessantes Kooperationsprojekt würde die Kreuzung des induzierbaren homozygoten PKP2 KO Modells mit dem induzierbaren transgenen PKP2-WT bzw. PKP2-C796R Modell darstellen.

Die entstehenden Mausmodelle könnten zum einen zeigen, inwiefern der letale homozygote PKP2 KO durch die Überexpression des transgenen PKP2-WT gerettet werden könnte und zum anderen, ob dieser rettende Effekt durch die PKP2 p.C796R Mutation funktionell nicht vermittelt wird. Für die weitere detaillierte Charakterisierung des molekularen Mechanismus der ARVC würde jedoch ein sehr vielversprechendes Mausmodell durch die Kreuzung des heterozygoten PKP2 KO Modells mit dem transgenen PKP2 p.C796R Mausmodell entstehen. Dieses Modell würde sowohl eine intakte PKP2 Kopie als auch eine Kopie der dominanten ARVC-verursachenden PKP2-C796R Mutation beinhalten und damit erstmals den realen genetischen Hintergrund eines humanen ARVC-diagnostizierten Mutationsträgers im Tiermodell darstellen können. Mit Hilfe dieses Modells könnten detailliert die Auswirkungen einer instabilen PKP2 Missens-Mutation auf zelluläre Prozesse sowie auf die zelluläre Integrität *in vivo* beschrieben werden und neue Erkenntnisse in der Pathogenese der ARVC gewonnen werden.

5. Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Materialien und Geräte

Materialien / Geräte	Firma
μ-Dish	IBIDI GmbH, München, Deutschland
Bakterieninkubator Innova 4200	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Bioanalyser Typhoon FLA 7000	GE Healthcare, Fairfield, USA
Chirurgisches Besteck	FST, Bad Oeynhausen, Deutschland
Deckgläschen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Elektroporationsküvette IMM/100UI	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Eppendorf Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Feinwaage CA770	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Film Entwickler	FujiFilm Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Filme für ECL Detektion CL-XPosure Film	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
FluostarOPTIMA	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Geldokumentation GelDoc 2000	BioRad, Hercules, USA
Gelelektrophoresekammern	Hoefer, Holliston, USA
Gellaufkammer Mini-PROTEAN 3-Cell	BioRad, Hercules, USA
Geltrockner SLAB GelDryer SE 1160	Hoefer, Holliston, USA
Gene Pulser Elektroporation	BioRad, Hercules, USA
Glaswaren	Schott AG, Mainz, Deutschland
Heizblock	neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland
HisTrap FF-crude Säule	GE Healthcare, Fairfield, USA
Homogenisator Precellys 24	peqLab Biotechnology, Wilmington, USA
Horizontalschüttler GFL 3016	GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland
Hybridisierungsöfen OV1	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
iCycler iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System	BioRad, Hercules, USA
Kamera DFC 420 für DMIL Lichtmikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Konfokales Laser Scanning Mikroskop SP5	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kryo-Einbettkassetten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kryostat Leica CM 1950	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop invers DMIL	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Microtom Leica RM 2155	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikrowelle	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland

Mini Trans-Blot Cell	BioRad, Hercules, USA
Mini-Protean 3 Elektrophorese	BioRad, Hercules, USA
NanoDrop Spektrophotometer ND-1000	peqLab Biotechnology, Wilmington, USA
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Nitrozellulose Membran Hybond ECL	GE Healthcare, Fairfield, USA
Nylon Sieb 200µM	neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland
Objektträger SuperFrost Plus	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Octal Bio Amp ML 138 und PowerLab	ADInstruments GmbH, Spechbach, Deutschland
Optima L100K - SW 28 Rotor	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Paraffineinbettung EC350-1	Microm, Walldorf, Deutschland
PCR Gefäße	BRAND GmbH, Gießen, Deutschland
PCR-Thermocycler PTC-200	MJ Research, Hatboro, USA
PCR-Tube Zentrifuge Galaxy Mini	VWR, Darmstadt, Deutschland
Perfusions-Apparatur	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
pH-Meter Calimatic pH-Meter 766	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Phosphor Imager Platte für Bioanalyser BAS-III	GE Healthcare, Fairfield, USA
Pipette (2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen	VWR, Darmstadt, Deutschland
Plastikwaren	TPP, Berlin, Deutschland
Power Pac HC	BioRad, Hercules, USA
Reverse-Phase-Säule (Eksigent nano Ultra)	Eksigent, Dublin, USA
Rotator	Select BioProducts, Edison, USA
Saranfolie	DOW Chemical Company, Midland, USA
Scanner	Canon, Krefeld, Deutschland
Schüttler „Lab-Shaker“	Adolf Kühner AG, Birsfelden, Schweiz
Sequenzierer 3100 Avant Genetic Analyzers	Applied Biosystems, Foster City, USA
Skalpelle	Braun, Kronberg, Deutschland
Sonifikator Sonoplus	Bandelin Electronics, Berlin, Deutschland
Sterilfilter 0,2 µm	Satorius Biotech, Aubagne, Frankreich
Sterilwerkbank Hera Safe	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Superdex 200 prep grade Säule (26 × 60)	GE Healthcare, Fairfield, USA
Taumler Schüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG,
Thermomixer 5436	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Tischzentrifuge Zentrifuge 5415c	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
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
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA

Wasserbäder	GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland
Whatman Papier	GE Healthcare, Fairfield, USA
Zellkulturinkubator	BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Zellscharber	VWR, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge (Zellkultur) Sigma 3K12	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

5.1.2 Chemikalien und Größenstandards

Chemikalien / Größenstandards	Firma
3-MA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Aceton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
ALLN	Peptides International, Louisville, USA
Ammoniumpersulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Bacto Hefe Extrakt	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
Bafilomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Benzonase	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
beta-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
BFA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
BigDye 3.1	Applied Biosystems, Foster City, USA
Bisindolylmaleimide (BIM)	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
CHAPS	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DharmaFECT 1	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Dioxycholinsäure (DOC)	Serva, Heidelberg, Deutschland
dNTP's	Fermentas International Inc., Burlington, Kanada
Doxycyclin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
ECL-Lösung	GE Healthcare GmbH, Solingen, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva, Heidelberg, Deutschland

Generuler 100 bp Ladder	Fermentas International Inc., Burlington, Kanada
Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Glycerin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Glycin	BioRad, Hercules, USA
Gö-6976, PKC α Inhibitor	LC Laboratories, Woburn, USA
Harnstoff	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Heparin (2500 IE/5ml)	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
HEPES (acide)	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
HiDi Formamid	Applied Biosystems, Foster City, USA
iCycler iQ™ Optical Tape	BioRad, Hercules, USA
iCycler iQ™ PCR Plate	BioRad, Hercules, USA
Imidazol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Isopropyl-1-thio-D-galactopyranosid (IPTG)	Promega Corporation, Madison, USA
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ketamin 10%	WDT, Garbsen, Deutschland
Komplett EDTA-freier Protease-Inhibitor (Tabletten)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Lipofectamine	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Malonsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
MG132	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
myc-Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Natriumazid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumorthovanadat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Normales Ziegen Serum	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
NP40/Igepal CA-630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas International Inc., Burlington, Kanada
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PEG 3350	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Pepton	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PKC epsilon Inhibitor Peptid	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Polyethylenimine (PEI)	Cellntec, Bern, Schweiz
Prolong Gold Antifade Reagent mit/ohne DAPI	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Protein A Sepharose	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Protein G Sepharose	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Sephadex	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tissue Tek O.C.T. Compound	Sakura, Northbrook, USA
Toluol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TRIZOL Reagenz	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Trypanblau, 0,4 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid, 30 % (H ₂ O ₂)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Xylazin 2 %	Ceva, Düsseldorf, Deutschland
Xylol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
ZLL	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

5.1.3 Enzyme

Enzym	Firma
Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Dispase Typ II	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
DNase I	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Kollagenase Typ II	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA
Pancreatin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Pfu-DNA-Polymerase	Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande

Proteinkinase K (30 U/mg)	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Restriktionsenzyme	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
RNase H	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
Taq-DNA-Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Trypsin/EDTA - 0,05 % Trypsin (pH 7,2), 0,02 % EDTA in PBS	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

5.1.4 Puffer und Lösungen

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung
1 % Ethidiumbromid	10 mg/ml Ethidiumbromid in ddH ₂ O
1 % Gelatine	1 g/100ml Gelatine in ddH ₂ O, autoklavieren
10x ADS Puffer	34 g Natriumchlorid, 23,8 g HEPES (acide), 600 mg Natriumhydrogencarbonat, 2 g Kaliumchlorid, 5 g Glucose, 500 mg Magnesiumsulfat; auf 500 ml ddH ₂ O auffüllen, pH 7,5 mit NaOH einstellen. Autoklavieren.
30 % Sucrose/PBS Lösung	0,3 g/ml Sucrose in PBS
Antikörperverdünnungs-Lösung	1 % (v/v) BSA, 0,1 % (v/v) TritonX-100, 0,05 % (v/v) Tween 20, 0,5 % NaN ₃ in PBS
APS-Lösung, 10 %	10 g Ammoniumpersulfat in 100 ml H ₂ O
Bakterien-Lysis-Puffer	50 mM Natrium/Kalium Puffer, pH 7.5; 0.5 M NaCl; 5 % Glycerol; 1 mM DTT; 0.1 % (w/v) CHAPS; 0.1 mM PMFS, komplett EDTA-freier Protease Inhibitor; Benzonase
Block-Puffer Immunfluoreszenz	5 % (v/v) BSA, 0,01 % (v/v) Tween in PBS
Ca ²⁺ -freier Puffer	12 mM MgSO ₄ ; 1,2 M NaCl; 54 mM KCl; 400 mM NaHCO ₃ ; 240 mM NaH ₂ PO ₄ ; 5 mM Glukose; 10 mM Taurin in H ₂ O; sterilfiltrieren
Co-IP-Lysis Puffer	20 mM Hepes pH 7,4; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2 mM EGTA; 1 % (v/v) Triton X100; 0,5 % (v/v) NP40 pH 9.0
DEPC-H ₂ O	0,1 % (v/v) DEPC in H ₂ O über Nacht bei 37 °C, autoklavieren
DNA-Größenstandard	1 Vol 100bp DNA Ladder; 1 Vol 10x DNA-Probenpuffer; 8 Vol H ₂ O
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in H ₂ O
Genotypisierung-Lysis-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0; 100 mM NaCl; 0,5 % (w/v) SDS; 0,5 mg/ml Proteinase K
LB-Agar	LB-Medium mit 20 g/l Agar
Luria-Bertani (LB)-Medium	1 % (w/v) Bacto Hefe Extrakt; 1 % (w/v) NaCl, pH 7,0
Magermilch-Lösung, 5 %	5 % (w/v) Magermilchpulver in PBST
Natrium Citrat Lösung	10 mM Natrium Citrat in ddH ₂ O pH 6,0

NP40-Lösung, 0,1 %	0,1 % (v/v) NP40 in PBS
Paraformaldehyd-Lösung, 4 %	4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4, filtrieren
PBS	1,9 mM NaH ₂ PO ₄ ; 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ ; 154 mM NaCl in H ₂ O, pH 7,4, autoklavieren
PBST	0,1 % (v/v) Tween in PBS
Permeabilisierungs-Lösung	0,1 % (v/v) TritonX-100 in PBS
Rekultivierungs-Puffer	10,7 g/L MEM pH 7.4; 2 % P/S; 2,5 % FKS
Reservoir Puffer	22 % (w/v) PEG 3350 und 75 µM Malonsäure pH 7.0
RIPA-Puffer	50 mM Tris-Cl, pH 7,5; 120 mM NaCl; 0,5 % (v/v) NP40; 0,5 % (w/v) Natriumdesoxycholat
Säulen-Wasch-Puffer	20 mM Tris-HCl; 0.5 M NaCl; 50 mM Imidazol; pH 8.0
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS in H ₂ O
SDS-Probenpuffer, 5x	250 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10 % (w/v) SDS; 50 % (w/v) Glycerin; 500 mM DTT in H ₂ O
SOB-Medium	20 g Trypton, 5 g Bacto Hefe Extract, 0,186 g KCl bzw. 2,5 ml 1 M KCl-Lösung, 0,584 g NaCl bzw. 10 ml 1 M NaCl-Lösung ad. 970 ml H ₂ O, pH 7,0
SOC-Medium	9,7 Teile SOB, 0,1 Teil Mg-Mix, 0,2 Teile Glukose
Stripping-Puffer	0,75 g/100ml ddH ₂ O pH 2,5
TAE, 1x	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,2
Transfer-Puffer	25 mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 0,01 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Methanol in H ₂ O
Triton-Löslichkeits-Puffer	20 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,5 mM CaCl ₂ , 1 % (v/v) TritonX-100
Triton-Unlöslichkeits-Puffer	20 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,5 mM CaCl ₂ , 9 M Harnstoff
TritonX-100-Lösung, 10 %	10 % (v/v) TritonX-100 in PBS
TTE-Lösung	90 mM Tris-Base, 30 mM Taurin, 1 mM EDTA
Verdau-Lösung	1x ADS-Puffer; 140 µg/ml Kollagenase Typ II; 20 µg/ml Pankretin

5.1.5 Nukleinsäuren

5.1.5.1 Plasmide

Plasmide	Herkunft
DSP-FLAG	Ein Geschenk von Kathleen J Green
pQLinkH	Scheich <i>et al.</i> , 2007
pTRE2pur-HA	Clontech Laboratories, USA
rtTA	Gossen <i>et al.</i> , 1995

5.1.5.2 Kurz interferierende RNA (siRNA)

siRNA Zielgen	Spezies	Herkunft
GAPDH	Ratte, Maus, Mensch	Applied Biosystems, Foster City, USA
Negative siRNA		Applied Biosystems, Foster City, USA
Plakophilin 2	Maus	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Plakophilin 2	Ratte	Applied Biosystems, Foster City, USA
Plakophilin 2	Mensch	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Protein Kinase C ϵ	Ratte	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

5.1.5.3 Oligonukleotide (Primer)

Oligonukleotide wurden für die Sequenzierungen, Amplifikations- und Mutagenese-PCR-Reaktionen und quantitative real-time PCR eingesetzt. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Biotex, Berlin, Deutschland.

Die gelieferten lyophilisierten Primer wurden mit ddH₂O auf eine Konzentration von 50 μ M eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Für Experimente wurde eine Arbeitsverdünnung von 5 μ M verwendet.

Primer für Genotypisierung	
hsPKP2 for	5'- TCG AGG CAG ACC ACA TGC TG-3'
hsPKP2 rev	5'- TTC TCC GTC AGC GTA AGC AAT-3'
rtTA for	5'- GTG GGA GAT CGA GCA GGC CCT CG-3'
rtTA rev	5'- CTG GGT TGC GTG TTG GAA GAT C-3'
Primer für Real-Time PCR	
<u>Spezies Ratte</u>	
beta-2-Mikrotubulin for	5'-CGT GAT CTT TCT GGT GCT TGT-3'

beta-2-Mikrotubulin rev	5'-CGT AGC AGT TGA GGA AGT TGG-3'
PKP2 for	5'-AAC CGG AAT ATC CAG ACC AAC-3'
PKP2 rev	5'-GGG AAC TCT TGG CAA TTA AGG-3'
Spezies Maus	
18S RNA for	5'-CGG ACA GGA TTG ACA GAT TG-3'
18S RNA rev	5'-CAA ATC GCT CCA CCA ACT AA-3'
β -Catenin for	5'-GTT AAA CTC CTG CAC CCA CCA T-3'
β -Catenin rev	5'-TAG TCG TGG AAT AGC ACC CTG TT-3'
c-myc for	5'-CCG CCG CTG GGA AAC-3'
c-myc rev	5'-TCC TGG CTC GCA GAT TGT AAG-3'
CyclinD1 for	5'-GGT TCC TGT TCA CAA TAC CTC ATG-3'
CyclinD1 rev	5'-ACA GGA CGA TCG CCA TCA G-3'
DSP for	5'-AGA GGT TGA GGG TTC TGC TG-3'
DSP rev	5'-GCA GGC TCT CTC TCT CCT GA-3'
GAPDH for	5'-AGG TTG TCT CCT GCG ACT TCA-3'
GAPDH rev	5'-CCA GGA AAT GAG CTT GAC AAA GTT-3'
JUP for	5'-CGC ATC TCT GAG GAC AAG AAC-3'
JUP rev	5'-TTG ATC GGG ATC ATA CTC TGG-3'
PKP2 for	5'-GGC TCT CCA GAA CCT CAC AG-3'
PKP2 rev	5'-GGG AAA GAT TCC GTG ACA AA-3'
Primer für Mutagenese PCR	
hsPKP2 C693fsX741 for	5'-TCC TTG ATC GCC AAG TGT CCG CAA CTA CAC-3'
hsPKP2 C693fsX741 rev	5'-TAG TTG CGG ACA CTT GGC GAT CAA GGA CAG-3'
hsPKP2 C796M for	5'-TCT GCC ATG TAC ACA TTG AAC-3'
hsPKP2 C796M rev	5'-ATG TGT ACA TGG CAG AGG CTG-3'
hsPKP2 C796R for	5'-GAA ACT ACA GCC TCT GCC CGT TAC ACA TTG-3'
hsPKP2 C796R rev	5'-GTT GTT CAA TGT GTA ACG GGC AGA GGC TG-3'
hsPKP2 I531S for	5'-ACG GAG AAT ATC AGC ATC CCC T-3'
hsPKP2 I531S rev	5'-GGG ATG CTG ATA TTC TCC GTC AG-3'
hsPKP2 K654Q for	5'-GTC GAA GCA GGC AAG TAA AAG AG-3'
hsPKP2 K654Q rev	5'-CTT TTA CTT GCC TGC TTC GAC TGC-3'
hsPKP2 S615F for	5'-CAT AAC CTC TTC TAC CAG CTG GAG-3'
hsPKP2 S615F rev	5'-CTG GTA GAA GAG GTT ATG AAG C-3'
hsPKP2 V587I for	5'-GGA CTC ATT GAC TCA CTG ATC CAT TAT G-3'
hsPKP2 V587I rev	5'-CAT AAT GGA TCA GTG AGT CAA TGA G-3'
Primer für Klonierungs-PCR	
pTRE2-MYC-PKP2-NheI for	5'-GCG TCT CGC GCT AGC GCA TAT GGC AGC CCC CGG CGC CCC AGC TGA GTA C-3'
pTRE2-MYC-PKP2-ClaI rev	5'-GCG TCT CGC ATC GAT CTT TGT CAT TTT CCT CAG TCT TTA AGG GAG-3'
pTRE2-MYC-PKP2-myc for	5'-CGAT ATG GCA TCA ATG CAG AAG CTG ATC TCA GAG GAG GAC CTG CTT-3'

pTRE2-MYC-PKP2-myc rev	5'-CGAT AAG CAG GTC CTC CTC TGA GAT CAG CTT CTG CAT TGA TGC CAT-3'
Primer für PKP2 Sequenzierung	
hPKP2-0F	5'-ATG GCA GCC CCC GGC GCC CCA-3'
hPKP2-56R	5'-GGC CCA GGA CGG TCC GGA TGT-3'
hPKP2-429F	5'-TCC TCT GAG GAGACT GGA GAT-3'
hPKP2-869F	5'-GGC ATC AGA GCT CCT TCC ACA-3'
hPKP2-1047F	5'-GGA GAT GAC TCTGGA GCG AGC-3'
hPKP2-1314F	5'-GGT ACC TCG GCT GCT CCA GGT-3'
hPKP2-1761F	5'-TAT TCA AAA CCG GAA TAT CCA-3'
hPKP2-1978F	5'-GGA GCT CTG CAG AAC CTC ACG-3'
hPKP2-2210F	5'-CAG TCC CGA GTA CTG ACC TTC-3'

5.1.6 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	BioRad, Hercules, USA
ECL Plus Western Blot Detection System	GE Healthcare, Fairfield, USA
Masson Trichrom Färbe Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
NucleoBond PC 500 Endo-free (Maxi-Präparation)	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoSpin Plasmid (Mini-Präparation)	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Superscript II	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Taq-Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

5.1.7 Antikörper

Antikörper Name	Kurzform	Donor	Firma
Primär-Antikörper			
Akt (pan) (C67E7)	AKT	Kannichen	Cell Signaling, Danvers, USA
Alpha-tubulin	α -Tubulin	Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Alpha-actinin	α -Actinin	Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
beta-Catenin	β -catenin	Maus	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Calpain1+2	Calpain	Kannichen	Abcam, Cambridge, Großbritannien
cardiac TroponinT	cTnT	Maus	DSHB, Iowa City, USA
Cleaved Caspase-3	CASP3	Kannichen	Cell Signaling, Danvers, USA
c-Myc	cmyc	Kannichen	Epitomics, Burlingame, USA
Connexin 43	Cx43	Kannichen	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Desmocollin-2	DSC2	Maus	Invitrogen, Carlsbad, USA
Desmoglein-2	DSG2	Maus	Progen, Heidelberg, Deutschland
Desmoplakin	DSP	Kannichen	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Desmoplakin I/II	DSP	Maus	Progen, Heidelberg, Deutschland
FLAG	FLAG	Kannichen	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	GAPDH	Maus	Invitrogen, Carlsbad, USA
Glykogen Synthase Kinase 3 alpha/beta	GSK3 $\alpha\beta$	Maus	Millipore, Billerica, USA
GRP78/BiP	GRP78	Kannichen	Abcam, Cambridge, Großbritannien
HA	HA	Ratte	ROCHE, Basel, Schweiz
c-Myc	c-Myc	Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
N-Cadherin	NCAD	Maus	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
N-Cadherin	NCAD	Kannichen	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Nkx2.5	Nkx	Kannichen	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
phospho AKT (Ser473)	pAkt	Kannichen	Cell Signaling, Danvers, USA
phospho-Connexin 43 (Ser368)	pCx43	Kannichen	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
phospho PERK (Thr981)	pPERK	Kannichen	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Plakoglobin	JUP	Maus	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Plakoglobin	JUP	Kannichen	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Plakophilin-2	PKP2	Maus	Progen, Heidelberg, Deutschland
Protein Kinase C α	PKC α	Kannichen	Cell Signaling, Danvers, USA
Protein Kinase C ϵ	PKC ϵ	Kannichen	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Vimentin	VIM	Kannichen	Abcam, Cambridge, Großbritannien

Sekundär-Antikörper			
Anti-mouse IgG, HRP		Pferd	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-rabbit IgG, HRP		Ziege	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-rat IgG, HRP		Ziege	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-mouse IgG AlexaFluor 488		Ziege	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-rabbit IgG AlexaFluor 488		Ziege	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-mouse IgG AlexaFluor 555		Ziege	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-rabbit IgG AlexaFluor 555		Ziege	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-rat IgG Alexa Fluor 555		Ziege	Cell Signaling, Danvers, USA

5.1.8 Bakterienstämme

Es wurden elektrokompenten *Escherischia coli* (*E.coli*) One Shot DH5 α von der Firma Stratagene verwendet. Für die Analyse der rekombinanten Proteinexpression in Bakterien wurden *E. coli* vom Stamm Rosetta (DE3) (Merck) verwendet.

5.1.9 Zellkultur

5.1.9.1 Eukaryotische Zellen

Zellen	Herkunft	Medium	Zusätze	Quelle
Primäre Zelllinie				
Adulte murine Kardiomyozyten	Maus Stamm: FVB/N	MEM	2,5 (v/v) FKS; 2 % P/S; 10 mM BDM; pH 7,3	eigene Zucht
Neonatale Rattenkardiomyozyten	Ratte Stamm: WistarHAN	DMEM/F12	2 mM Glutamin; 3 mM Na-Pyruvat; 30 mM Ascorbinsäure	Charles River, Wilmington, USA
Sekundäre Zelllinie				
A431	humane epidermoide Karzinom-Zelllinie	DMEM	10 % (v/v) FKS; 4 mM Glutamin; 1x (v/v) P/S; 8 μ l/ml G418	Green KJ
HeLaM2	menschliche Epithelzellen	DMEM+GlutaMAX	10 % (v/v) FKS; 1x (v/v) P/S	Gossen <i>et al.</i> , 1995
HL-1	murine atriale Zelllinie	Claycomb Medium	10 % (v/v) FKS; 4 mM Glutamin; 1x (v/v) P/S; 5 mM Norepinephrin	Claycomb <i>et al.</i> , 1998

5.1.9.2 Nährmedien und Zusätze

Nährmedien / Zusätze	Firma
[³⁵ S]Methionin/Cystein (3,7 Ci/ml)	Perkin-Elmer, Waltham, USA
2,3-Butadienon monoxime	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Claycomb Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Cytosin Arabinosid (AraC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
DMEM/F-12 Medium	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Fibronectin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
FKS (Fetales Kälberserum)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
FKS für HL-1 Zellen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Gelatine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Geneticindsulfat (G418 Sulfat)	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Laminin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
L-Askorbinsäure	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
L-Glutamin 200mM	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
MEM 1018 (10,7 g/L)	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Methionin	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Methionin-freies DMEM	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Natriumpyruvat	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Non Essential Amino Acids (NEAA)	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Norepinephrin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
OptiMEM	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Penicillin/ Streptomycin, 100x	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Pferde Serum (HS)	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Taurin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Trypsin Inhibitor	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

5.1.10 Probandenproben

Für alle verwendeten Probandenproben und klinischen Untersuchungsbefunde wurden, nach Überprüfung und Genehmigung des Protokolls durch die Ethikkommission der Charité Berlin, die schriftlichen Einverständniserklärungen von Probanden und/oder Angehörigen eingeholt.

Die DNA des Index-Patienten IV-1 wurde auf Mutationen in desmosomalen Genen sowie Desmin und TMEM43 durch Sanger Sequenzierung untersucht. Die DNA weiterer Familienmitglieder wurden ausschließlich auf die zuvor identifizierte Mutation im Plakophilin-2 Gene analysiert.

Die in dieser Arbeit verwendeten kardialen Gewebeproben wurden für klinische Zwecke zur Diagnosestellung einer ARVC entnommen und histologisch und pathologisch untersucht. Nach Abschluss klinischer Untersuchungen wurden diese Gewebeproben für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt (nach ausdrücklicher Zustimmung von Patienten und/oder Angehörigen). Als Kontrollgewebe dienten Gewebeproben von Probanden, die keine pathologischen Anzeichen einer kardialen Erkrankung aufwiesen.

5.1.11 Computersoftware

Computersoftware	Firma
Adobe Illustrator CS4	Adobe Systems GmbH, München, Deutschland
Adobe Photoshop CS4	Adobe Systems GmbH, München, Deutschland
BioRad IQ5	BioRad, Hercules, USA
ImageJ	http://rsbweb.nih.gov/ij/
Lasergen SeqBuilder	DNASTAR, Madison, USA
Lasergen SeqMan	DNASTAR, Madison, USA
Leica Application Suite 2.8.1	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica Application Suite AF	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mascot Software Package	Matrix Science, Cambridge, Großbritannien
Nanodrop ND-1000 v3.3	peqLab Biotechnology, Wilmington, USA
Office 2010	Microsoft, Redmond, USA
Typhoon FLA 7000 IR	GE Healthcare, Fairfield, USA

5.2 Methoden

5.2.1 Mikrobiologische Techniken

5.2.1.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurden zunächst 500 µl einer Übernachtskultur (ÜN-Kultur) von E. coli Bakterien vom Stamm DH5α (Stratagene) in 25 ml LB-Medium im Schüttler „Lab-Shaker“ (Adolf Kühner AG) bis zu einer OD > 0,6 hochgezogen. Die Bakterienkonzentration wurde im UV/VIS Photometer (Beckmann) bei 600 nm gemessen. Folgende Schritte wurden im 4 °C Kühlraum mit einer vorgekühlten Zentrifuge durchgeführt: Die Zellen wurden abzentrifugiert (Rotor JA10, 4200 rpm, 20 min) und in 10 ml eiskaltem autoklavierten destilliertem Wasser resuspendiert. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet erneut in 5 ml eiskaltem Wasser resuspendiert und zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1-2 ml eiskaltem Wasser gelöst und zu Aliquots von je 100 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Zellen wurden anschließend auf ihre Transformationseffizienz getestet und bei -80°C gelagert.

5.2.1.2 Transformation von Bakterien durch Elektroporation

Elektrokompetente DH5α -Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 1-2 µl eines Ligationsansatzes bzw. 10ng Plasmid-DNA oder einer Mutagenese-PCR wurde zu 25 µl Bakterien pipettiert und der gesamte Ansatz in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (Eppendorf) transferiert. Die Zellen wurden daraufhin im Gene Pulser bei 1,7 kV, 25 µF, 200 µΩ elektroporiert (BioRad) und nach Zugabe von 450 µl SOC Medium 1 h bei 37 °C inkubiert. Durch Ausplattierung von 10 µl bzw. 100 µl des Transformationsansatzes auf entsprechenden antibiotikahaltigen LB-Platten konnten Plasmid tragende Klone selektioniert werden.

5.2.2 Molekularbiologische Techniken

5.2.2.1 DNA

5.2.2.1.1 Isolation von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus 1,5 ml ÜN-Kulturen wurde das Kit NucleoSpin Plasmid (MACHEREY-NAGEL) verwendet. Die sogenannte Mini-Präparation erfolgte nach Anweisung des Herstellers. Die Plasmid-DNA Elution erfolgte mit 30 µl HPLC-H₂O. Zur Plasmid-DNA-Präparation aus 100 ml ÜN-Kultur (Maxi-Präparation) wurde das Kit NucleoBond PC 500 EF (MACHEREY-NAGEL) verwendet. Die DNA-Elution erfolgte mit 200 µl HPLC-H₂O. Die gelöste DNA wurde auf 1 µg/µl konzentriert.

5.2.2.1.2 Isolierung genomischer DNA aus murinen Ohrbiopsien

Für die Genotypisierung von Mäusen wurden den Tieren jeweils Ohrbiopsien entnommen. Die Biopsien wurde über Nacht bei 55 °C unter Schütteln in 55 µl Genotypisierungs-Puffer lysiert und der Verdau am Folgetag durch eine 5 min Inkubation bei 95 °C gestoppt. Der Verdauansatz wurde bei 4000 rpm in der Tischzentrifuge 5415c (Eppendorf) für 5 min zentrifugiert und der Überstand für die Genotypisierungs-PCR verwendet.

5.2.2.2 PCR

Für den PCR-Ansatz wurde folgendes Standardprotokoll verwendet: 1x PCR-Probenpuffer, 5 µM Primer *for*, 5 µM Primer *rev*, 200 µM dNTPs (je Nukleotid), 100-200 ng Ausgangs-DNA, 0,1 µl Taq Polymerase (Quiagen) bzw. Pfu-Polymerase (Stratagene) in 30 µl H₂O. Die Komponenten wurden auf Eis zusammenpipettiert und abschließend die Polymerase zugegeben. Für mehrere PCR-Ansätze wurde ein Mastermix angesetzt, um Pipettierfehler zu vermeiden. Im PCR-Thermocycler (MJ Research) wurde folgendes Standardprogramm angewandt: 1. Prä-Denaturierung: 95 °C (5 min), 2. Denaturierung: 95 °C (30 sec), 3. Primer-Anlagerung T_{an} (30 sec), 4. Elongation: 72 °C (1 min/kb Fragment), 5. 25-35x Wiederholung von Schritt 2-4, 6. Elongation: 72 °C (10 min). T_{an} bezeichnet die spezifische Anlagerungstemperatur in °C der Primer *for* und *rev*, die nach folgender Faustregel errechnet wurde: (Anzahl CG-Nukleotide x 4) + (Anzahl AT-Nukleotide x 2) - 5. Die Reaktionsansätze wurden anschließend mit 3 µl 10x Probenpuffer versetzt und mittels DNA-Gelelektrophorese analysiert. Die längerfristige Lagerung erfolgte bei -20 °C.

5.2.2.2.1 Mutagenese PCR

Mit Hilfe einer *in vitro* Mutagenese PCR erfolgte die Erzeugung gezielter Mutationen in der cDNA des Plakophilin 2 im pTRE2pur-HA Expressionsvektors. Die verwendeten Primer beinhalteten die ein bis drei Basen lange Mutationsstelle in der Mitte der 20-22 bp langen Primer. Um eine fehlerfreie Amplifikation des gesamten Vektors zu erzielen, wurde für die Mutagenese PCR die Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene) eingesetzt.

5.2.2.2 Genotypisierung der transgenen PKP2 Mäuse

Die Genotypisierung der transgenen PKP2 Mäuse erfolgte mittels PCR. Es wurden Primerpaare für das humane Plakophilin 2 und den Transaktivator rtTA verwendet. Die Fragmentlängen betragen für rtTA ca. 220 bp und 300 bp hPKP2. Folgender PCR-Ansatz und PCR-Programm wurde angewandt:

PCR Ansatz		PCR Programm			
Substanz	Volumen μ l		Dauer	Temp.	
ddH_2O	4,9	1.	3 min	94 °C	28 Zyklen
10x Puffer	1	2.	30 sek	95 °C	
dNTPs (2,5 μ M)	1	3.	30 sek	58 °C	
Primer 1 (5 μ M)	1	4.	60 sek	72 °C	
Primer 2 (5 μ M)	1	5.	10 min	72 °C	
Taq-DNA-Polymerase	0,1	6.	∞	4 °C	
+ DNA Verdünnung (1:30)	1				
Gesamtvolumen	10				

5.2.2.3 DNA-Aufreinigung aus PCR-Ansätzen

Das resultierende PCR-Produkt wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach der Anweisung der Firma. Die DNA wurde mit 20 μ l HPLC- H_2O eluiert.

5.2.2.4 DNA-Restriktion mit Endonukleasen

DNA wurde je nach Restriktionsenzym (New England Biolabs) entsprechend den Herstellerangaben in dem geeigneten Puffer geschnitten. Die Plasmid-DNA wurde mit eineinhalbfachem Enzymüberschuss der für die DNA-Menge berechneten Enzymmenge 90 min bei 37 °C restringiert. Die Enzyme wurden bei 65 °C für 10 min inaktiviert und durch gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente entfernt.

5.2.2.5 DNA-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Präparationen, Restriktionsverdau (analytisch) und zur Isolierung von DNA-Fragmenten (präparativ) wurde die DNA in horizontalen Agarosegelen ihrer Größe nach aufgetrennt. Dazu wurde Agarose in 1x TTE-Puffer unter Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 μ g/ml) versetzt. Die Konzentration des Agarosegels hing von der Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente ab und betrug zwischen 0,5 % und 2 %.

Als Laufpuffer wurde 1x TTE-Puffer verwendet. Die mit Ethidiumbromid versetzten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht der Geldokumentation GelDoc 2000 (BioRad) dokumentiert.

5.2.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden durch UV-Licht detektiert, die Banden mit einem Skalpell sauber ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Extraktion Kit (Qiagen) unter Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA wurde in 20-30 µl H₂O eluiert.

5.2.2.7 Phosphatasebehandlung von 5` überhängenden Enden

Um eine Selbstligation bei religierbaren DNA-Enden zu verhindern, wurden diese mit alkalischer Phosphatase aus dem Kälberdarm (Roche) behandelt. Dabei wurde pro 1-20 pmol 5`-überhängender Enden 0,1 U Enzym in einem 50 µl Ansatz eingesetzt. Die Reaktion wurde bei 37 °C für 1 h durchgeführt und durch Zugabe von EDTA für 30 min bei 65 °C inaktiviert. Die DNA durch Phenol/Chloroform Extraktion oder per DNA-Gelelektrophorese aufgereinigt.

5.2.2.8 Ligation

50-200 ng Plasmid DNA wurden mit der dreifachen molaren Menge Insert-DNA in Ligationspuffer mit 1 U T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) in einem Gesamtvolumen von 30 µl ligiert. Sowohl Ligationen mit kohäsiven als auch mit nicht-kohäsiven Enden wurden über Nacht bei 15 °C durchgeführt. Die Ansätze wurden anschließend komplett für die Transformation eingesetzt.

5.2.2.9 Klonierung des Vektors pTRE-2pur-HA PKP2

Die vollständige cDNA des humanen Plakophilin 2b wurde durch PCR aus dem Plakophilin cDNA Klon (NM_001005242) amplifiziert. Die verwendeten Primer fusionierten an das 5`-Ende die Nukleotidsequenzen für das Markierungsprotein (tag) myc (Primer pTRE2-MYC-PKP2-ClaI for und pTRE2-MYC-PKP2-NheI rev). Für die Eliminierung der Ausgangs-cDNA wurde nach Beendigung der PCR Reaktion 1 µl des Restriktionsenzym DpnI hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Das resultierende PCR Produkt wurde mittels PCR Ausreinigungskits isoliert, mit dem Restriktionsenzym ClaI und NheI geschnitten und in den mit ClaI/NheI linearisierten Expressionsvektor pTRE2pur-HA ligiert.

5.2.2.10 DNA-Sequenzierung

Die Bestimmung der cDNA Sequenz erfolgte durch die Didesoxymethode [Sanger *et al.*, 1977]. Die Sequenzierungs-PCR wurde zur Überprüfung der Mutagenese-PCR und für Klonierungsexperimente eingesetzt. Zunächst wurden Sequenzierreaktionen mit BigDye (Applied Biosystems) im Themocycler durchgeführt. BigDye enthielt die für die Sequenzierreaktion notwendigen NTPs, den Puffer und die Polymerase. Die Sequenzierreaktionen wurden durch Zentrifugation, mit 4000 rpm für 7 min bei 10 °C, durch gequollenes Sephadex (Sigma-Aldrich) aufgereinigt und durch Zugabe von 10 µl Hi-Di Formamid (Applied Biosystems) stabilisiert.

Die aus der Sequenzierreaktionen entstandenen unterschiedlich langen, am 3' Ende markierten DNA-Stränge wurden anschließend im Sequenzierer 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) elektrophoretisch getrennt und analysiert.

PCR Ansatz		PCR Programm			
Substanz	Volumen μl		Dauer	Temp.	
DNA Template (200 ng)	X	1.	3 min	94 °C	
BigDye	2	2.	30 sec	94 °C	25 Zyklen
Primer 1 (5 μM)	1	3.	30 sec	50 °C	
ddH_2O	X	4.	3 min	60 °C	
Gesamtvolumen	10	5.	5 min	60 °C	
		6.	∞	4 °C	

5.2.2.11 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die Bestimmung der DNA-Konzentrationen wurde mit dem Spektrometer Nanodrop gemäß der Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die Messung von DNA erfolgte bei 280 nm. Die DNA-Qualität wurde mit dem $\text{OD}_{260/280}$ -Verhältnis bestimmt.

5.2.3 RNA

5.2.3.1 Isolierung und Reinigung totaler RNA-Fractionen

Die Isolierung totaler RNA-Fractionen aus murinem myokardialem Gewebe und adhärenen eukaryotischen Zellen wurde unter RNase-freien Bedingungen nach der TRIzol-Methode durchgeführt. Das TRIzol-Reagenz (Invitrogen) beinhaltet ein modifiziertes Phenol, das sowohl Membranproteine der Zellen als auch intrazelluläre Proteine denaturiert. Das TRIzol bewirkt den Aufschluss der Zellen, die Freisetzung der Nukleinsäuren und schützt gleichzeitig vor dem Abbau der RNA durch die ebenfalls freigesetzten intrazellulären RNAsen.

Zur Isolation der RNA aus murinem kardialem Gewebe wurde das Herz direkt nach der Explantation kurz in eiskühlem DEPC- H_2O gewaschen und mit einem sterilen Skalpell zerkleinert. 100 mg Herzgewebe wurden in ein mit 1 ml vorgekühltem TRIzol-Reagenz befühlten Homogenisatorröhrchen transferiert und mittels des Homogenisator Precellys (peqLab Biotechnology) homogenisiert. Nach anschließender Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5402: 10 min; 14000 rpm; 4 °C) wurde der lösliche Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Für die RNA-Isolation aus adhärenter Zellkultur (6 well Kulturschale) wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 1ml TRIzol versetzt. Nach zwei minütiger Inkubation wurde das TRIzol samt sich ablösender Zellen in einem Reaktionsgefäß gesammelt.

Zur weiteren Verarbeitung und Isolation der RNA wurde dem TRIzol Gemisch ein Fünftel Volumen Chloroform hinzugegeben, kräftig durchmischt und fünf Minuten bei RT inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (4 °C für 15 min bei 14000 rpm) resultierte dreiphasiges Gemisch. Die untere, durch einen im TRIzol -Reagenz enthaltenen Farbstoff rosafarbene Phase enthielt die Zellfragmente. Die weiße, stark viskose Interphase bestand aus den Zellproteinen. Die Nukleinsäuren, inklusive der zu isolierenden RNA, befanden sich in der obersten, wässrigen Phase, die farblos und glasklar war. Diese obere Phase wurde nun vorsichtig abgenommen, in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt und mit gleichem Volumen Isoproterenol versetzt. Nach mehrmaligen Schwenken und 10 min Inkubation wurde das Gemisch zum Fällern der RNA bei 4 °C für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das weiße Pellet in 70 % EtOH aufgenommen. Nach anschließender Zentrifugation bei 4 °C für 5 min bei 9000 rpm wurde der Überstand erneut entfernt, das Pellet für 10 min luftgetrocknet und in 30 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Die Konzentration der isolierten und aufgereinigten RNA wurde mit dem Nano-Drop System (peqLab Biotechnology) bestimmt und die Probe anschließend bei -80 °C gelagert.

5.2.3.2 cDNA Synthese

Die für Transkriptionsanalyse mittels rt-PCR oder quantitativer Real-Time PCR notwendige Umschreibung von Gesamt-RNA in cDNA wurde mit dem Super Script II Reverse Transkriptase Kit (Invitrogen) durchgeführt. Es wurden jeweils 2 µg Gesamt-RNA pro Ansatz umgeschrieben. Das jeweils konzentrationsabhängige Volumen der RNA-Isolation wurde mit DEPC-H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Zunächst wurde ein DNA-Verdau für 30 min durch DNase I (Invitrogen) durchgeführt, um Kontaminationen mit DNA zu eliminieren. Durch Zugabe von 1 µl EDTA wurde der DNA-Verdau gestoppt und nach Angaben des Herstellers weiter verfahren. Die synthetisierte cDNA wurde bis zur unmittelbaren Verwendung auf Eis gekühlt oder zur späteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

5.2.3.3 rtPCR

Die reverse Transkription von RNA in cDNA und anschließende Amplifikation der cDNA wurde nach dem 2-Stufen Verfahren durchgeführt. Dies bedeutet, dass in einem ersten Schritt die cDNA synthetisiert wurde (siehe 5.2.3.2), welche als Ausgangs-cDNA für eine anschließende PCR eingesetzt wurde. Die genomische RNA wurde abschließend durch Zugabe von 1 µl RNase H (Invitrogen) für 20 min bei 37 °C verdaut und der cDNA tragende Gesamtansatz bis zum Einsatz in der PCR bei -20 °C gelagert. Eine PCR-Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

PCR Ansatz		PCR Programm			
Substanz	Volumen μl		Dauer	Temp.	
ddH ₂ O	X	1.	4 min	95°C	28 Zyklen
10x Puffer	1	2.	30 sek	95°C	
dNTPs (2,5 μM)	1	3.	45 sek	60°C	
Primer 1 (10 μM)	1	4.	60 sec	72°C	
Primer 2 (10 μM)	1	5.	10 min	72°C	
Taq-DNA-Polymerase	0,1	6.	∞	4°C	
+ cDNA (10ng)	X				
Gesamtvolumen	10				

Die PCR-Reaktion wurde auf einem 2 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

5.2.3.4 Real-Time PCR

Für die Bestimmung der relativen Genexpression wurde die Methode der Real-Time PCR verwendet. Diese Methode beruht auf der Detektion eines zunehmenden Signals eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR Green), welcher bei der Amplifikation eines cDNA-Templates in die neu synthetisierten PCR-Produkte interkaliert. Aufgrund der exponentiellen Amplifikation der PCR nimmt das Fluoreszenzsignal ebenfalls exponentiell zu. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mittels des IQ5 Real Time Detection System (BioRad). Der Begriff „Real Time“ bezieht sich bei dieser Technik auf das in Echtzeit aufgenommene und dargestellte Fluoreszenzsignal, das nach jedem Amplifikationsschritt des PCR-Programms mit einer speziellen Kamera aufgenommen wird. Der Zeitpunkt, an dem ein Signal den Bereich der Hintergrundsignale verlässt und in der exponentiellen Phase der Amplifikation einen definierten Schwellenwert (engl.: „Threshold“) entscheidend überschreitet, wird als C_T-Wert (engl.: „Cycle of Threshold“) bezeichnet [Mülhardt *et al.*, 2003]. Je früher das Signal einer Probe diesen Schwellenwert erreicht, desto mehr Farbstoff wurde umgesetzt und desto mehr cDNA-Template war vorhanden. Aufgrund dieser Tatsache lässt sich der Unterschied der zu Beginn der PCR in jeder Probe enthaltenen Menge an Ausgangs-cDNA quantifizieren.

Voraussetzung für eine exakte Quantifizierung sind identische Ausgangsbedingungen der PCR in jeder Probe und größte Effizienz der verwendeten Primerpaare, welche durch die Erstellung exponentiellen cDNA-Verdünnungsreihe bestimmt wurden. Durch die exponentielle Amplifikation der cDNA während der PCR müsste bei 100%iger Effizienz der Primer zwischen jeder Verdünnungsstufe ein C_T-Wert Unterschied von 1 resultieren.

Folgender Reaktionsansatz und Programm wurde angewendet:

Real-time PCR Ansatz		Real-time PCR Programm			
Substanz	Volumen μl		Dauer	Temp.	
ddH_2O	5,5	1.	15 min	95°C	
Absolute SYBR Green Mix	12,5	2.	15 sek	95°C	40 Zyklen
Primer 1 (1 μM)	1	3.	30 sek	58°C	
Primer 2 (1 μM)	1	4.	30 sek	72°C	
+ cDNA (100ng)	5	5.	1 min	95°C	
Gesamtvolumen	25	6.	1 min	55°C	
		7.	10 sek	55°C+((n-1) x 1°C)	41 Zyklen

Die Bestimmung der relativen Genexpression erfolgte über eine relative Quantifizierung mittels der $\Delta\Delta C_T$ -Methode [Livak *et al.*, 2001]. Bei der $\Delta\Delta C_T$ -Methode werden die ermittelten C_T -Werte eines Zielgens auf die einer endogenen Kontrolle, eines so genannten „Housekeeping“-Gens, das in allen Proben gleich stark exprimiert wird und im Rahmen des Experimentes nicht reguliert ist, normalisiert. Es wird nun die Differenz des C_T -Wertes des Zielgens ($C_{T;x}$) mit dem C_T -Wert der endogenen Kontrolle ($C_{T;\text{Kontrolle}}$) in einer Probe gebildet: $\Delta C_T = C_{T;x} - C_{T;\text{Kontrolle}}$.

Diese Differenz, ΔC_T , dient als relatives Maß für die Expressionsstärke des Zielgens gegenüber der endogenen Kontrolle. Ist $\Delta C_T < 0$, bedeutet dies, dass das Zielgen einen kleineren C_T -Wert hat als die endogene Kontrolle und somit höher exprimiert ist. Ist hingegen $\Delta C_T > 0$, so ist die endogene Kontrolle stärker exprimiert.

Fasst man nun die ΔC_T -Werte zweier Gruppen (A und B) über den Mittelwert zusammen und bildet erneut die Differenz zwischen den $\Delta C_{T,A}$ und $\Delta C_{T,B}$, erhält man den $\Delta\Delta C_T$ -Wert: $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T,A} - \Delta C_{T,B}$.

Dieser $\Delta\Delta C_T$ gibt nun den relativen Unterschied der auf die endogene Kontrolle normalisierten Expression des Zielgens in Gruppe A, im Vergleich zur Gruppe B an. Es kann daraus ein Faktor, fc (engl.: „fold change“) berechnet werden: $fc = 2^{-\Delta\Delta C_T}$, der diesen Expressionsunterschied wiedergibt. Dabei bedeutet: $fc = 1$ kein Unterschied in der Expression der Gruppen; $fc > 1$ eine höhere Expression in Gruppe A und $fc < 1$ eine geringere Expression in Gruppe A, verglichen zu Gruppe B.

5.2.4 Proteine

5.2.4.1 Erstellen von Paraffinschnitten

Für immunhistologische- und Immunfluoreszenz-Untersuchungen von Gewebeproben wurden diese in Paraffin eingebettet. Diese Paraffineinbettung diente der Fixierung des Gewebes und bewirkte eine gleichzeitige Aufrechterhaltung der Zellmorphologie. Dafür wurden die murinen Herzen nach der Explantation zunächst in 4 % Paraformaldehyd bei 4 °C für mindestens 24 h fixiert, um die Proteine durch eine Vernetzung ihrer Aminosäuren durch Methylenbrücken zu stabilisieren. Die verwendeten humanen Patienten Autopsien wurden mit Formalin fixiert. Aufgrund der stark hydrophoben, wachsähnlichen Eigenschaft des Paraffins ist eine Dehydrierung nach erfolgter Fixierung notwendig. Diese Dehydrierung erfolgte über eine aufsteigende Ethanol-Reihe an deren Ende die Klärung in zwei Toluol-Bädern die Gewebeproben komplett von Wasser und Ethanol befreite. Nach erfolgter Dehydrierung wurden die Gewebeproben in drei Paraffinbäder bei 60 °C eingelegt und anschließend mit frischem, flüssigem Paraffin in einen Block gegossen. Nach vollständigem Erkalten der Paraffinblöcke wurden serielle Schnitte von den darin befindlichen Gewebeproben am Mikrotom RM2155 (Leica) angefertigt. Es wurden jeweils 3 aufeinander folgende, 5µm dicke Schnitte über ein vorgeheiztes Wasserbad (54 °C) auf einen Glas-Objekträger aufgebracht und bei RT getrocknet.

5.2.4.2 Erstellen von Kryoschnitten

Für die Analyse von kardialen Gewebeproben mittels Immunfluoreszenzanalysen wurden des Weiteren Kryoschnitte der Gewebeprobe angefertigt. Die Einbettung hierzu erfolgte in einem speziellen wasserlöslichen Einbettmedium. Diese Methode der Fixierung und Gewebeprozessierung konserviert neben Proteinen und deren Antigen-Epitopen auch die Enzymaktivitäten. Der Erhalt der morphologischen Struktur leidet hingegen unter dieser Methode. Für die Gefriereinbettung wurden die entnommenen murinen Herzen bzw. humanes Patienten Myokard zunächst für eine Stunde in 4 % PFA anfixiert und dann über Nacht bei 4 °C in eine 30 %ige Sucrose/PBS-Lösung umgesetzt.

Durch diesen Schritt diffundieren die Zuckermoleküle in die Zellen und verhindern, dass sich beim Einfrieren Eiskristalle bilden. Anschließend wurde das Gewebe in einer Mischung aus 30 % Sucrose/PBS-Lösung und dem Einbettmedium Tissue Tek O.C.T. (Sakura) im Verhältnis 1:1 für weitere 24 h gehalten, um die Diffusion des extrem zähflüssigen Einbettmediums in das Gewebe zu begünstigen, und um so eine bessere Gewebefixierung zu gewährleisten. Abschließend wurden die Gewebeproben in Kryo-Einbettkassetten (Roth) gelegt und mit Einbettmedium gefüllt. Die gebetteten Gewebeproben wurden schnellstmöglich gefroren, um eine Eiskristallbildung zu minimieren. Die Einbettkassetten wurden hierzu in kurzen Intervallen vorsichtig auf die Oberfläche flüssigen Stickstoffs gehalten und bei -80 °C gelagert. Mittels des Kryostats CM1960 (Leica) wurden die Blöcke in 10 µm dicke serielle Schnitte geschnitten. Jeweils zwei bis drei aufeinander folgende Schnitte wurden auf einen Glasobjekträger aufgetragen. Diese Schnitte wurden im Folgenden für mehrere Stunden an der Luft getrocknet, bevor sie entweder weiter verarbeitet wurden oder zur späteren Verwendung bei -20 °C gelagert wurden.

5.2.4.3 Masson-Trichrom Färbung

Die Masson-Trichrom Färbung von Paraffin-fixierten Gewebeschnitten wurde mithilfe des Masson-Trichrom Färbekit (Sigma-Aldrich) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Schnitte wurden zunächst bei 60 °C für 30 min auf die Objektträger im Hybridisierungsofen angebacken. Nach Abkühlung der Schnitte wurden sie in einer absteigenden Ethanolreihe (3x Xylol für 5 min, 2x 99 % EtOH für 5 min, 96 % EtOH, 80 % EtOH, 70 % EtOH, 2x H₂O für jeweils 3 min) entparaffinisiert. Für die Masson-Trichrom-Färbung wurden die Schnitte für 4 min in Weigerts-Eisen-Hämatoxylinlösung inkubiert und anschließend 5 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Nach kurzem Spülen in ddH₂O wurden die Schnitte für 2 min mit Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung versetzt und dreimal in ddH₂O geschwenkt. Nach Inkubation zunächst in Phosphorwolframsäure- / Phosphormolybdänsäure-Arbeitslösung für 5 min und anschließend in Anilinblau-Lösung für 50 sek wurden die Schnitte in 1% Essigsäure für 2 min final gefärbt. Es folgte die Dehydrierung des Gewebes (90 % EtOH 1min, 2x 99 % EtOH für je 1 min, 2x Xylol für je 3 min) und die Einbettung mit Eukitt.

5.2.4.4 Immunfluoreszenz Analyse

Für die Antikörperdetektion auf Paraffinschnitten wurden die Gewebeschnitte zunächst entparaffinisiert (siehe 5.2.4.2). Die folgende Antigendemaskierung erfolgte durch ein 20 minütiges Bad in 10 mM Natrium-Citrat Lösung bei 95 °C - 100 °C, wobei die Kochtemperatur durch kurze Heizintervalle in einer Mikrowelle gehalten wurde. Die Schnitte kühlten anschließend bei RT etwa 30 ab. Kryoschnitte wurden hingegen vor der Antikörperdetektion nur 10 min bei RT aufgetaut und für 5 min in ddH₂O inkubiert. Für die Immunfluoreszenz bei adhärenter Zellkultur wurden die Zellen zunächst auf Glasdeckgläschen ausplattiert und die Transfektion bzw. die Behandlung mit Substanzen regulär durchgeführt. 72 h post Transfektion wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen 2x mit PBS gewaschen.

Alle folgenden Schritte waren für Paraffin- und Kryoschnitte sowie adhärente Zellkultur im Wesentlichen identisch. Zunächst erfolgte eine 10 minütige Fixierung der Zellen durch 4 % PFA, gefolgt von einem PBS Waschschrift. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte durch eine zehn minütige Inkubation mit der Permeabilisierungslösung, auf die wiederum ein PBS Waschschrift folgte. Die Zellen wurden nun für mindestens 1 h in Antikörper-Blockier-Lösung bei RT inkubiert, wobei für die adhärente Zellkultur BSA verwendet wurde und für die Kryo- bzw. Paraffinschnitte Serum aus der Spezies aus der der spätere sekundäre Antikörper stammt, um mögliche Kreuzreaktionen zu verhindern.

Nach vollständiger Blockade erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in Antikörper-Lösung über Nacht bei 4 °C in der Zellkulturvertiefung bzw. in einer Feuchtkammer.

Nach mindestens 16 h wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und 1 h mit dem sekundären Antikörper im Dunklen inkubiert, wobei der sekundäre Antikörper wahlweise mit den Fluorochromen Alexa 488 oder Alexa 555 gekoppelt waren. Abschließend wurden die gefärbten Zellen 3x in H₂O gewaschen und mit ProLong DAPI Antifade versiegelt.

Die adhärenen Zellen auf Deckgläschen wurden mit Hilfe von zwei Pinzetten aus der Zellkulturschalenvertiefung geholt und invers auf einen Objektträger eingebettet. Die gefärbten Zellen wurden mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop Leica SP5 ausgewertet.

5.2.4.5 Präparation von Gesamtproteinextrakt

Für die Präparation von Gesamtproteinextrakt aus Gewebe wurden die explantierten Herzen bzw. humanen Gewebebiopsien mit Hilfe eines Skalpells zerkleinert und in 200-400 µl RIPA-Puffer inklusive Phosphatase- und Proteinase-Inhibitoren mittels des Homogenisators Precellys homogenisiert. Das Proteinlysate 30 min bei 4 °C auf dem Rotator (Select BioProducts) durchmischt, um die Proteine aus dem Gewebe zu lösen. Die Proteinisolation aus adhärenen Zellkultur erfolgte nach zweimaligem Waschen mit PBS durch Zugabe von 50-100 µl RIPA-Puffer inklusive Phosphatase- und Proteinase-Inhibitoren unter Ablösen der Zellen durch einen Zellscharber und Überführung in ein neues Reaktionsgefäßes. Die Zellen wurden anschließend für je 9 sek bei 75 % Leistung im Sonifikator Sonoplus (Bandelin Electronics) sonifiziert. Die lysierten Proteine aus dem Gewebeverband bzw. den adhärenen Zellen wurden 15 min bei 14000 rpm (Eppendorf Zentrifuge 5402) bei 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.

5.2.4.6 Triton-Löslichkeits-Assay

Die adhärenen Zellen wurden mithilfe von Trypsin von der Oberfläche gelöst und durch Zentrifugation (5 min bei 3000 rpm) pelletiert. Das Pellet wurde in Triton-Löslichkeits-Puffer inklusive Phosphatase- und Proteinase-Inhibitoren resuspendiert und nach 30 minütiger Inkubation auf Eis erneut für 20 Minuten zentrifugiert (14000 rpm, 4 °C). Der Überstand enthielt die lösliche Fraktion.

Das verbleibende Pellet wurde mit Triton-Löslichkeits-Puffer inklusive Phosphatase- und Proteinase-Inhibitoren für 30 min bei 50 °C inkubiert und entsprach der unlöslichen Fraktion.

5.2.4.7 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry

Die Messung des Proteingehalts erfolgte nach dem Lowry-Prinzip mittels des DC-Protein Assays (BioRad) nach den Angaben des Herstellers. Eine BSA-Verdünnungsreihe diente als Eichgerade. Die Extinktionen der Proteinlysate wurden in einer zehnfachen Verdünnung mit d_0H_2O bei 750 nm photometrisch gemessen und die Proteinmengen bestimmt.

5.2.4.8 Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation mittels myc-Agarose diente der Isolation von überexprimierten myc getaggen Proteinen aus dem Zelllysate adhärenen transient transfizierter Zellen für den Pulse-Chase-Assay. Die verwendeten Zellen wurden mit RIPA-Puffer inklusive Phosphatase- und Proteinase-Inhibitoren lysiert.

Vor Gebrauch der myc-Agarose wurde 60 µl der Agarose zunächst 5x mit 1 ml TBS gewaschen und jeweils für 1 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Beim letzten Waschschrift wurde die Flüssigkeit über der myc-Agarose vollständig entfernt. Die myc-Agarose wurde anschließend mit 250 µl lysierter Proteinlösung (mind. 800 µg) für 3 h bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert und anschließend 1 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und als Gesamtproteinlysate für die Western Blot Kontrolle verwendet. Die pelletierte Agarose wurde mindestens 4x mit 1 ml TBST gewaschen, um unspezifische Bindungen an die Agarose zu beseitigen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Flüssigkeit vorsichtig komplett abgenommen und mit 35 µl SDS-PAGE-Ladepuffer versetzt. Vor dem Einsatz in der SDS-PAGE wurde die Probe aufgekocht, um die spezifisch gebundenen Proteine von der Agarose zu lösen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.2.4.9 Co-Immunopräzipitation

Für die Co-Immunopräzipitation (Co-IP) wurden spezifische Antikörper zunächst mit dem kardialen Proteinlysate inkubiert und anschließend an Protein A bzw. G Sepharose Kügelchen gekoppelt. Für die Co-IP in kardialen murinem Gewebe wurde zunächst das Herz frisch präpariert und ein Drittel des Herzens mit 750 µl Co-IP-Lysis Puffers inklusive Phosphatase- und Proteinase-Inhibitoren im Homogenisator Precellys (5000 rpm für 20 sek) homogenisiert.

Nach anschließender Zentrifugation bei 4 °C für 15 min bei 3000 rpm wurde der Überstand abgenommen und die Proteinbestimmung nach Lowry (siehe 5.2.4.5) durchgeführt.

Vor der Durchführung der Co-IP wurde das Proteinlysate mit Sepharose vorgereinigt, um den hohen IgG Anteil im Gewebe zu minimieren. Hierfür wurden 150 µl Sepharose mit 500 µl Proteinlysate (1,5 mg Protein) bei 4 °C für 3 h auf einem Überkopfschüttler inkubiert und anschließend für 2 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Der Überstand enthielt das vorgereinigte Proteinlysate und wurde mit dem spezifischen Antikörper (ca. 6 µg) über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Um die spezifischen Komplexe aus dem Proteinlysate zu isolieren, wurden 50 µl Protein A (bei monoklonalen Antikörpern) bzw. Protein G (bei polyklonalen Antikörpern) Sepharose dem Proteinlysate hinzugegeben, für 3 h bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert und anschließend für 2 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde als Kontrolle des Gesamtlysats bei -80°C gelagert. Das Pellet beinhaltete die Sepharose und die daran gebundenen Protein-Komplexe. Um unspezifische Bindung zu eliminieren, wurde die Sepharose mindestens 4x mit 1 ml TBST gewaschen. Beim letzten Waschschrift wurde die Flüssigkeit vollständig abgenommen und die Sepharose in 80 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert. Anschließend wurde die Probe wiederum denaturiert und zentrifugiert. Der Überstand enthielt die spezifisch gebundenen Interaktionspartner und wurde vor der Analyse mittels SDS-PAGE bei -80 °C gelagert.

5.2.4.10 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können mit Hilfe von SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Bei der hier angewandten diskontinuierlichen Gel-Elektrophorese handelte es sich um ein Zwei-Gel-System, bestehend aus einem niederprozentigen Sammelgel, in dem die aufgetragenen Proteine in scharfen Banden gesammelt wurden und einem höher prozentigen Trenngel, in dem die Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt wurden. Nachfolgend die Zusammensetzung der verschiedenen verwendeten Gele.

<u>Sammelgel</u>	<u>Komponenten</u>	<u>10 ml (2 Gele)</u>
4 %	H ₂ O _{dd} 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 SDS 10 % Acryl/bis-Acryl 30 % TEMED APS 10 %	6,1 ml 2,5 ml 100 µl 1,3 ml 10 µl 100 µl
<u>Trenngel</u>	<u>Komponenten</u>	<u>20 ml (2 Gele)</u>
7,5 %	H ₂ O _{dd} 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 SDS 10 % Acryl/bis-Acryl 30 % TEMED APS 10 %	9,58 ml 5,00 ml 200 µl 5,00 ml 20 µl 200 µl
10 %	H ₂ O _{dd} 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 SDS 10 % Acryl/bis-Acryl 30 % TEMED APS 10 %	7,91 ml 5,00 ml 200 µl 6,67 ml 20 µl 200 µl
15 %	H ₂ O _{dd} 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 SDS 10 % Acryl/bis-Acryl 30 % TEMED APS 10 %	4,58 ml 5,00 ml 200 µl 10,0 ml 20 µl 200 µl

Es wurden jeweils 25 µg Protein pro Ansatz in jeweils gleichen finalen Endvolumina entnommen und in einem 8er-PCR-Gefäß mit einem Fünftel Volumen Protein-Ladepuffer gemischt. Die Proben wurden anschließend bei 95 °C für fünf Minuten denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Als Größenstandard diente der PAGE-Rule prestained Protein Ladder (Fermentas).

Die Gellaufkammer (BioRad) wurde mit SDS-Laufpuffer gefüllt und zunächst für 25 min bei 50 V und anschließend für vier bis fünf Stunden bei 80 V auftrennen lassen.

5.2.4.11 Western Blot

Um Proteine der Größe nach mit spezifischen Antikörpern zu detektieren, wurden die Proteine nach der SDS-PAGE auf eine Nitrocellulosemembran transferiert („geblottet“). Der Zusammenbau der Apparatur erfolgte im Transferpuffer. Die Nitrocellulosemembran wurde in der gleichen Größe wie das Proteingel auf das Polyacrylamid-Gel gelegt. Gel und Nitrocellulosemembran wurden zwischen zwei Whatman Papiere eingespannt und in eine Blot-Apparatur (BioRad) eingebaut. Der Transfer fand für 1,5 h bei konstanter Stromstärke von 330 mA statt. Die Apparatur unterlag einer permanenten Kühlung. Nach Beendigung des Transfers wurde die Nitrocellulosemembran kurz in PBST gespült. Um unspezifische Bindungsstellen auf der Western Blot Membran zu verhindern, wurde 1 h lang mit 5 % Magermilchpulver in PBST blockiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper unter Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min in PBST wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper für 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Abschließend wurde die Membran erneut gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz nach Herstellerangaben (GE Healthcare). Dabei wurden Filme (Thermo Scientific) für verschiedene Zeiträume zwischen 10 sec und 5 min aufgelegt und im Entwickler (Fuji) detektiert. Die Quantifizierung erfolgte durch Anwendung des NIH Programms. Nach der Detektion wurde die Membran in PBS bei 4 °C aufbewahrt. Für eine erneute Detektion wurde vor allem der Sekundärantikörper durch die Inkubation der Membran in 50 ml Stripping-Puffer entfernt. Anschließend wurde die Membran zweimal mit PBST gewaschen und erneut in 5 % Magermilchpulver in PBST für 1 h blockiert.

5.2.4.12 Pulse-Chase Assay

Der Pulse-Chase-Assay ermöglicht die Nachverfolgung der biochemischen Halbwertszeit eines Proteins. Hierzu wurden die analysierten Proteine mit Hilfe eines [³⁵S]Methionin/Cystein Mixes mit einer spezifischen Aktivität von 3,7 Ci/ml radioaktiv markiert. Epitheliale HeLaM2 Zellen wurden hierzu 48 h zuvor mit dem Plasmid pTRE-BI tight myc-PPK2 Wildtyp bzw. Mutante (p.C796R) transfiziert. Die Zellen wurden zu Beginn des Pulse-Chase Assays zunächst für 2 h in Methionin-freiem DMEM Medium kultiviert und anschließend wurde das radioaktive Methionin/Cystein mit Aktivität von 7,4 MBq/ml für 2 h hinzugegeben (Pulse). Im Weiteren wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in DMEM Medium mit zugesetztem 1 mM Methionin inkubiert (Chase). Die Proteine wurden dann zu unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert. In den Proben, in denen ein Calpain Inhibitor angewandt wurde, befand sich der Inhibitor sowohl im Medium des Pulse-Schrittes als auch im Medium des Chase-Mediums. Das Gesamtproteinlysat wurde mit RIPA Puffer lysiert und anschließend jeweils eine Immunpräzipitation der unterschiedlichen Proben mit myc-Agarose durchgeführt (siehe 5.2.4.7). Die isolierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel danach für 4 h bei 60°C unter Vakuum im Geltdrockner (GelDryer) getrocknet und anschließend die Emission durch Autoradiographie mittels Phosphor Imager Technologie erfasst und ausgewertet.

Eine Phosphor Imager Platte (GE Healthcare) wurde dazu über Nacht bei Raumtemperatur auf das getrocknete Gel aufgelegt und anschließend mit dem Bionalyser Imager (GE Healthcare) gemessen. Die Bandenintensität wurde mit dem NIH Programm quantifiziert.

5.2.4.13 Expression rekombinanter Proteine in E.coli

Die Expression rekombinanter Proteine aus *E. coli* und deren Strukturanalyse wurden von Dr. Anja Schütz im Labor von Prof. Dr. Heinemann am Max-Delbrück-Centrum durchgeführt.

Die cDNA kodierende Sequenz der Armadillo-Wiederholungsdomänen (AS 346-817) des humanen PKP2a Wildtyps und der Mutanten wurde dafür in den pQLinkH kloniert und in *E. coli* Rosetta (DE3) (Merck) transformiert. Nach Erreichen einer Zelldichte von OD₆₀₀ von 2 im Lab-Shaker bei 37 °C wurde die Genexpression mit 0,5 mM Isopropyl-1-thio-D-galactopyranoside (IPTG) über Nacht bei 20°C induziert. Zur Analyse der Proteininduktion wurden jeweils Proben vor, während und nach der Proteinexpression genommen, abzentrifugiert und in 50 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Proben wurden dann mit Hilfe der SDS-PAGE analysiert.

5.2.4.14 Aufreinigung von His7-rekombinanten Proteinen aus E.coli

Für die Aufreinigung der überexprimierten N-terminalen His₇-getaggten Proteine erfolgte zunächst durch Lyse der Zellen durch Bakterien-Lysis-Puffer und anschließender Sonifikation. Das Lysat wurde auf eine mit Nickel (Ni²⁺) geladenen HisTrap Säule (GE Healthcare) gebunden und mit Säulen-Wasch-Puffer gewaschen. Die Säule wurde mit Säulen-Wasch-Puffer inkl. 250 mM Imidazol eluiert. Die Proteine wurden weiter durch Größenausschlusschromatographie auf einer Superdex 200 Säule (GE Healthcare) aufgereinigt.

5.2.4.15 Massenspektrometrische Analyse

Die aufgereinigten Proteine wurden aus dem SDS-Gel herausgeschnitten und durch einen „In-Gel“ Verdau mittels Trypsin in Peptide gespalten. Die resultierenden Peptide wurden anschließend durch eine Stage-tip Mikrosäule [Rappsilber *et al.*, 2007] entsalzt und auf einer eigen entwickelten Reverse Phase Säule (Dr. Maisch) durch einen 1 h Gradienten (Eksigent nano Ultra) separiert. Die separierten Peptide wurden direkt in den Massenspektrometer gesprüht, unter Verwendung eines Proxeon Ion-Quelle mit angeschlossenem LTQ-Orbitrap (Thermo Scientific). Das aufgezeichnete Spektrum wurde mit dem Max-Quant Software Packet [Cox *et al.*, 2008] oder dem Mascot Software Packet (Matrix Science) analysiert.

5.2.4.16 Proteinkristallographie und Strukturanalyse

Die Kristallisation der C752R Variante des PKP2 erfolgte unter Verwendung der „Hanging drop vapor diffusion“ Methode bei 20 °C durch Mischen der gleichen Volumina von Protein (5 mg/ml in 20 mM HEPES–NaOH pH 7.5, 0.1 M NaCl, und 3 mM DTT) und Reservoir-Lösung. Vor der Schockgefrierung durch flüssigen Stickstoff wurde der Kristall in Reservoir-Lösung inkl. 25 % Glycerol überführt.

Die Identifizierung der Kristallstruktur erfolgte unter Verwendung der bereits bekannten Struktur der Armadillodomänen des humanen PKP1 (PDB ID 1xm9) als Vergleichsmodell [Choi *et al.*, 2005].

Die Koordinaten und Strukturaktoren konnten anhand der Protein Data Bank (www.pdb.org, PDB ID code 3TT9) hergeleitet werden.

Strukturvorhersagen der gesamten Armadillodomänen des Wildtyp PKP2a wurden mit dem I-TASSER server [Wu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008] durchgeführt, indem man die Struktur des stabilen Armadillo-Fragmentes der PKP2a C752R Variante gegen die Armadillo-Domänen des bekannten humanen PKP1 verwendete.

5.2.5 Zellkultur

5.2.5.1 Zellkultivierung

Die Kultivierung der verschiedenen eukaryotischen Zelllinien wurde in separaten 75 cm² Zellkulturflaschen (TPP) durchgeführt und erfolgte bei konstanten 37 °C, 5 % CO₂ und 98 % Luftfeuchtigkeit in ihren entsprechenden Kultivierungsmedien. Diese wurden vor der Benutzung mit spezifischen Zusätzen wie FKS, Penicillin/ Streptomycin (P/S) oder L-Glutamin komplementiert. Bei den Zelllinien handelte es sich ausschließlich um adhärente Zelllinien. Medienkomplementierung und Zellkulturarbeit fanden stets bei sterilen Bedingungen unter der Sterilwerkbank (Thermo Fischer) statt. Um eine konstant gute Vitalität der eukaryotischen Zellen zu gewährleisten, wurden tote, gelöste Zellreste mit dem alten Medium abgenommen und die adhärenen Zellen mit 10 ml 1x PBS gewaschen. Für die Passage wurden die Zellen durch proteolytischen Verdau der Adhäsionsproteine mit 2 ml Trypsin/EDTA (Invitrogen) vom Kulturflaschenboden gelöst, mit der Pipette vereinzelt und in frischem Medium aufgenommen. Je nach Zellwachstum und Konfluenz der Zellen wurde die Prozedur alle 3-4 Tage wiederholt. Für experimentelle Untersuchungen wurde die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer (Paul Marienfeld) bestimmt und entsprechend ihrer Wachstumsrate in 24, 12 oder 6 Well-Kulturschalen bzw. 6 cm oder 10 cm Zellkulturschalen (TPP) ausgesät.

5.2.5.2 Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten

Für die Isolation von neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden 50-80 neonatale Ratten pro Ansatz präpariert. Die neonatalen Ratten wurden jeweils unter der Sterilwerkbank dekapitiert. Der Torso wurde mit einer chirurgischen Schere der Länge nach aufgeschnitten und das Herz mittels Dissektionspinzette in eine 10 cm Schale mit eiskaltem PBS überführt. Nach Beendigung aller Herz Präparationen, wurden die Herzen durch Überführen in zwei weitere Schalen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Herzen mit zwei Skalpellens so sehr zerkleinert bis eine homogene Masse entstand. Diese Masse wurde in ein Rundkolben mit Magnetstäbchen überführt, 25 ml Verdau-Lösung zugegeben und der Rundkolben in einem 37 °C warmem Wasserbad befestigt, welches auf einem Magnetrührer stand. Dieser erste kurze Verdau wurde für 5 min bei 700 rpm inkubiert und der Überstand verworfen. Folgend wurden jeweils 25 ml Verdau-Lösung zu dem Gewebe gegeben, 10 min bei 700 rpm im Wasserbad gerührt und der Überstand durch ein Nylon-Sieb in einem mit 3 ml FBS gefüllten neuen 50 ml Reaktionsgefäß auf Eis gesammelt. Dieser Vorgang wurde 6-8 mal wiederholt bis das Gewebe vollständig verdaut war. Die gesammelten Reaktionsgefäße wurden bei 4 °C für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die einzelnen Pellets wurden in komplementiertes DMEM-F12 Medium mit 10 % FKS und P/S (alle Invitrogen) in einem finalen Volumen von 50 ml vereinigt und je 10 ml auf eine 10 cm Zellkulturschale verteilt. Die Schalen wurden für mind. 1 h im Zellkulturinkubator inkubiert. Dieser Schritt diente der Entfernung von Fibroblasten aus der kardialen Gewebe aufgrund der Tatsache, dass die Fibroblasten auf der unbeschichteten Zellkulturschale schneller adhären als die Kardiomyozyten. Anschließend wurde der Kardiomyozyten-enhaltene Zellkulturüberstand jeder Schale in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt und die Schale mehrmals gründlich mit PBS gewaschen, wobei kräftig gegen den Schalenrand mit der Hand geklopft wurde. Das PBS wurde ebenfalls jeweils in das Reaktionsgefäß überführt. Die Reaktionsgefäße wurden zentrifugiert und die Pellets erneut in DMEM-F12 mit 10 % FKS und P/S resuspendiert. Es folgte ein weiteres Ausplattieren auf unbeschichteten Schalen und Inkubation für 1 h im Inkubator, um die Kardiomyozytenkultur abermals von Fibroblasten zu befreien. Nachdem die Überstände gesammelt wurden und die Schalen mit PBS gewaschen wurden, folgte eine Pelletierung der Zellen durch Zentrifugation (1200 rpm, 10 min, RT). Das Zellpellet wurde in 20 ml komplementierten DMEM-F12 mit 5 % Pferdeserum, P/S und Cytosin Arabinosid (AraC) (Sigma-Aldrich) resuspendiert und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellen wurden entweder auf 1 % Gelatine beschichteten Zellkulturschalen oder auf Laminin (Sigma-Aldrich) beschichteten Deckgläschen ausgesät und über Nacht in den Inkubator gestellt. Am Folgetage wurden die Platten mehrmals gründlich durch Klopfen an der Schalenwand mit PBS gewaschen, um nichtadhärente, defekte Zellen und Zellschrott zu entfernen. Die Zellen wurden nach Zugabe von komplementierten DMEM-F12 mit 1 % FBS, P/S und AraC eine weitere Nacht im Inkubator gehalten und am nächsten Tag wurde ein Medienwechsel durchgeführt, welches kein Antibiotikum enthielt, um die Zellen auf die Antibiotika-freie Transfektion am Folgetag vorzubereiten und um sicherzustellen, dass die Kultur keine Kontamination enthält.

5.2.5.3 Isolation adulter Mauskardiomyozyten

Die Isolation von adulten Mauskardiomyozyten wurde in Zusammenarbeit mit dem Studenten Egon Jacobus im Zuge seiner Bachelorarbeit in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Thierfelder etabliert [Jacobus, 2011]. Diese Methode basiert auf der retrograden Aortenperfusion des murinen Herzens. Der Maus wurde hierzu zunächst 100 µl Heparin (2500 IE/ 5 ml) für 15 min intraperitoneal appliziert, um Agglutinationen im Herz während der Entnahme zu verhindern. Die Maus wurde anschließend durch intramuskuläre Injektion von 100 µl 2 % Xylazin und 100 µl 10 % Ketamin narkotisiert und das Herz schnellstmöglich heraus präpariert. Die Aorta wurde in einer Schale mit eiskaltem PBS auf eine Metallkanüle aufgezogen und mithilfe eines Drahtes befestigt bevor das Herz samt Metallkanüle in einer auf 37°C temperierten Perfusions-Apparatur (Hugo-Sachs) befestigt wurde. Das Herz wurde daraufhin mit Ca²⁺-freien Puffer für 10 min perfundiert und anschließend mit 0,12 % Kollagenase Typ 2 Lösung für ca. 12 min verdaut. Danach wurde das Herz aus der Apparatur herausgenommen und der Verdau in Ca²⁺-freien Puffer inkl. 0,5 % BSA und 0,125 mM CaCl₂ abgestoppt. Während dessen wurde mit Pinzetten und einer angeschnittenen 5 ml Pipettenspitze das Herz solange mechanisch zerkleinert bis keine größeren Gewebestücke mehr zu erkennen waren. Die entstandene Zellsuspension wurde durch ein Nylonnetz filtriert und anschließend bei 35 g für 4 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in Ca²⁺-Rekultivierungspuffer inkl. 0,2 mM CaCl₂ resuspendiert und die Zellen für 4 min bei RT sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in 4 aufeinanderfolgenden Schritten die Kalziumkonzentration stetig erhöht (0,35; 0,5; 0,75 und 1 mM). Abschließend wurde die Suspension für 4 min bei 35 g zentrifugiert und die Zellen in MEM 1018 Kultivierungsmedium (Invitrogen) inkl. des Kontraktilitätsinhibitor BDM (Sigma-Aldrich) aufgenommen. Nach der Zellzählung wurden die adulten murinen Kardiomyozyten auf Laminin beschichteten Deckgläschen ausgesät und im Zellkulturschrank kultiviert.

5.2.5.4 Tet-On System

Das Tet-On Expressions-System ist ein binäres transgenes System, das in Abhängigkeit von der Aktivität eines Transkriptions-Aktivators die Induktion eines Transgens erlaubt [Furth *et al.*, 1994; Gossen *et al.*, 1992; Valencik *et al.*, 2001]. Beim Tet-On System reguliert ein Tetracyclin-kontrolliertes Transaktivatorprotein (rtTA), welches aus dem Tet Repressor DNA Bindungsprotein (TetR) des Tc Resistenzoperons von *E. coli* fusioniert mit der starken Transaktivator-domäne von VP16 vom *Herpes simplex* Virus besteht, die Expression eines Zielgens, das unter der transkriptionellen Kontrolle des Tetracyclin-gesteuerten Promotorelements (TRE) steht. Das TRE besteht aus der Tet Operatorsequenz (tetO), die an einen minimalen CMV-Promotor des humanen Zytomegalievirus fusioniert ist. In der Gegenwart von Tetracyclin oder Doxycyclin, bindet rtTA an das TRE und aktiviert die Transkription des Zielgens. In Abwesenheit von Tetracyclin oder Doxycyclin, kann rtTA das TRE nicht binden, woraufhin die Expression des Zielgens blockiert wird. Das Tet-On System hat gegenüber anderen induzierbaren Genexpressionssystemen wie z.B. Cre oder FRT den Vorteil, dass die Aktivierung des Gens reversibel ist.

Als TRE tragendes Plasmid wurde das Plasmid pTRE2pur-HA verwendet und den Transaktivator stellte das Plasmid rtTA dar. Die verwendeten HelaM2- Zellen sind stabil mit diesem Transaktivator transfiziert worden [Gossen *et al.*, 1995].

5.2.5.5 Transfektion

5.2.5.5.1 Transiente Plasmid-DNA Transfektion durch Polyethylenimin (PEI)

Durch transiente Transfektion kann fremde DNA in eukaryotische Zellen eingebracht werden. Ein Teil der DNA dringt während der Zellteilung in den Zellkern ein und wird für einige Tage transkribiert. Die DNA integriert dabei nicht in das Genom und wird daher zerstört, wenn ein Selektionsdruck fehlt.

Das kationische Polymere PEI besitzt keine hydrophoben Reste und ist daher wasserlöslich. Kationische Polymere kondensieren auf der DNA und bilden Polyplexe.

Für die Transfektion wurde die benötigte Menge PEI (Stocklösung 2 mg/ml in ddH₂O) und die gewünschte Menge DNA jeweils in einem definierten Volumen OptiMEM (Invitrogen) gelöst, gut durchmischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Konzentrationen von PEI und DNA wurden so gewählt, dass sich ein Verhältnis von Phosphat_(DNA) zu Stickstoff_(PEI) von 1:2 ergab.

Im Falle einer Co-Transfektion, dies bedeutet die Transfektion von zwei verschiedenen Plasmiden, wurde ein Plasmid-DNA A /Plasmid-DNA B/PEI Verhältnis von 1:1:4 verwendet.

Schale	Oberfläche	DNA	PEI	Medium
24 well	2 cm ²	0,4 µg	0,8 µg	500 µl
12 well	4 cm ²	0,8 µg	1,6 µg	1 ml
6 well	10 cm ²	2 µg	4 µg	2 ml
10 cm	60 cm ²	10 µg	20 µg	10 ml

Das kationische Polymer wurde anschließend zu der DNA-Lösung gegeben, gut durchmischt und 20 min bei RT inkubiert. Der entstandene Komplex wurde anschließend vorsichtig zu den Zellen gegeben, die zuvor frisches Kulturmedium erhalten hatten. Der DNA/Polymer Komplex wurde für 8 h mit den Zellen bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend ein kompletter Medienwechsel durchgeführt.

Bei Transfektion der pTRE2pur-HA PKP2 Konstrukte wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 100 nM Doxycyclin (SIGMA) in das Kulturmedium 8 h nach Transfektion induziert und bei jedem zusätzlichen Medienwechsel erneut dem Medium zugesetzt. 48 h -72 h nach der Transfektion wurde der Nachweis für die entsprechende RNA bzw. für das Protein durchgeführt.

5.2.5.5.2 Transfektion von kurz-interferierender RNA (siRNA)

Der siRNA-Ansatz ist eine Methode zur posttranskriptionalen Unterdrückung der Genexpression, wobei die Ziel-RNA sequenzspezifisch erkannt und abgebaut wird. Diese Methode wurde erstmals in Nematoden *C. elegans* beschrieben [Fire *et al.*, 1998].

Für die siRNA Transfektion wurde das Transfektionsreagenz DhramaFECT 1 (Thermo Fisher) verwendet. Zunächst wurde jeweils 2 µM siRNA bzw. DhramaFECT in definiertem Volumen OptiMEM gelöst und für 5 min bei RT stehen gelassen. Beide Ansätze wurden vereinigt und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der gebildete Komplex zu den Zellen mit frischem Kulturmedium ohne Antibiotikum zugesetzt und über Nacht im Zellkulturinkubator inkubiert. Am Folgetag wurde ein kompletter Medienwechsel inklusive Antibiotikum durchgeführt. Die Analyse der siRNA transfizierten Zellen erfolgte 72 h bis 120 h nach Transfektion.

5.2.5.6 Dispase Assay

Für den Dispase Assay wurden epitheliale A431 Zellen in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät, am Folgetag mit entsprechender siRNA transfiziert und nach 72 h wurde die konfluente Zellkultur zweimal mit PBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit 5 ml Dispase II (2.4 Einheiten/ml (Sigma-Aldrich)) bei 37 °C im Zellkulturinkubator für 1 h. Anschließend wurden die Zellen 10-mal auf einem taumelden Schüttler hin und her gerüttelt und die Zellkulturschale mit Hilfe des Lichtmikroskop Leica DM fotografisch dokumentiert. Die quantitative Bestimmung der entstandenen Zellfragmente wurde mittels der ImageJ Software in mehrfachen Ansätzen bestimmt.

5.2.5.7 Migration Assay

Zur Durchführung des Migration Assays wurden jeweils 70 µl einer aufgereinigten neonatale Rattenkardiomyozyten Suspension (7×10^5 Zellen/ ml) in die zuvor mit Laminin beschichteten zwei Kammern des „Culture Inserts“ im µ-Dish (IBIDI) pipettiert. Nach Adhäsion der Zellen, wurden die Zellen mit entsprechender siRNA transfiziert. 120 h nach siRNA Transfektion wurde das „Culture Insert“ vorsichtig mittels einer sterilen Pinzette entfernt und die Zellkulturschale mit 2 ml Kulturmedium gefüllt. Der ca. 500 µm lange entstandene Spalt wurde mit dem Lichtmikroskop Leica DM fotografisch dokumentiert und der Zeitpunkt 0 h festgelegt. Die Dokumentation erfolgte nach 16 h und 48 h. Die quantitative Bestimmung der einzelnen Spaltbreiten erfolgte durch Anwendung der ImageJ Software.

5.2.5.8 TUNEL-Assay

Der TUNEL-Assay basiert auf der Erkenntnis, dass im Zuge der Apoptose Doppelstrangbrüche in der DNA entstehen. Die dabei auftretenden freien 3'OH Enden der DNA werden mit Hilfe des Enzyms „Terminal deoxynucleotidyl Transferase“ (TdT) markiert. Dieses Enzym fügt den 3'OH Enden eine zufällige Sequenz von Nukleotid Triphosphaten (NTPs) an.

Dabei werden spezielle Digoxigenin gekoppelte Nukleotide verwendet, die durch einen anti-Digoxigenin Antikörper detektiert werden können. Dieser anti-Digoxigenin Antikörper ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein gekoppelt, was eine Detektion in der Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht. Die Apoptose Detektion mittels TUNEL-Assay erfolgte nach den Angaben des Herstellers des ApopTag-Kits (Millipore).

5.2.6 Tierversuche

Für die Tierversuche wurden Mäuse (*Mus musculus*) des Stammes FVB/N verwendet. Falls nicht anders angegeben, wurden Mäuse der transgenen Linien im Alter von 3–6 Monaten analysiert. Die Tierversuche wurden von dem Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (G 0108/06) genehmigt.

5.2.6.1 Generierung transgenen Mäuse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden, die bereits in der Zellkultur getesteten Konstrukte HA-PKP2-WT und das mutierte HA-PKP2-C796R in das Genom von Mäusen integriert. Die Generierung der transgenen Mauslinien wurde durch die Methode der Oozyten-Mikroinjektion am Max-Delbrück-Centrum in Mäusen (FVB/N Hintergrund) durchgeführt. Jeweils 50 ng Plasmid DNA wurden vorab mittels Restriktionsendonuklease Bsal linearisiert und die entsprechende cDNA gereinigt. Die DNA Lösung wurde in den männlichen Vorkern einer Oocyte injiziert. Die manipulierte Oocyte wurde dann in den reproduktiven Trakt einer scheinträchtigen Ammen Maus implantiert. Als Nachkommen wurden Gründertiere mit genetisch einheitlichen Zellen geboren, wovon einige das Transgen in die Keimbahn eingebaut hatten. Die durch Genotypisierung ermittelten Transgen positiven PKP2 Gründertiere wurden mit einer transgenen Tetracyclin-kontrollierten Transaktivatorprotein (rtTA) tragende Mauslinie verpaart. Das rtTA-Konstrukt lag homozygot in den Mäusen vor und unterliegt der Kontrolle des herzspezifischen α -MHC Promotors, sodass die Expression des transgenen PKP2 exklusive im Herzen stattfand. Diese rtTA Maus wurde von Glen Fishman generiert und in multiplen Studien diverser Arbeitsgruppen eingesetzt [Fishman *et al.*, 1994]. Die α -MHC-rtTA Maus liegt ebenfalls im FVB/N Hintergrund vor. Aus der Verpaarung der transgenen PKP2 Mutation (PKP2-C796R) Maus mit einer homozygoten α -MHC-rtTA Maus gehen als Nachkommen Tiere mit den Genotypen PKP2-C796R⁺/ α -MHC-rtTA⁺ und PKP2-C796R⁻/ α -MHC-rtTA⁺ (transgen negative Kontrollen) hervor (Abbildung 33). Die Verpaarung der PKP2 WT Mäusen mit der homozygoten α -MHC-rtTA verhält sich identisch.

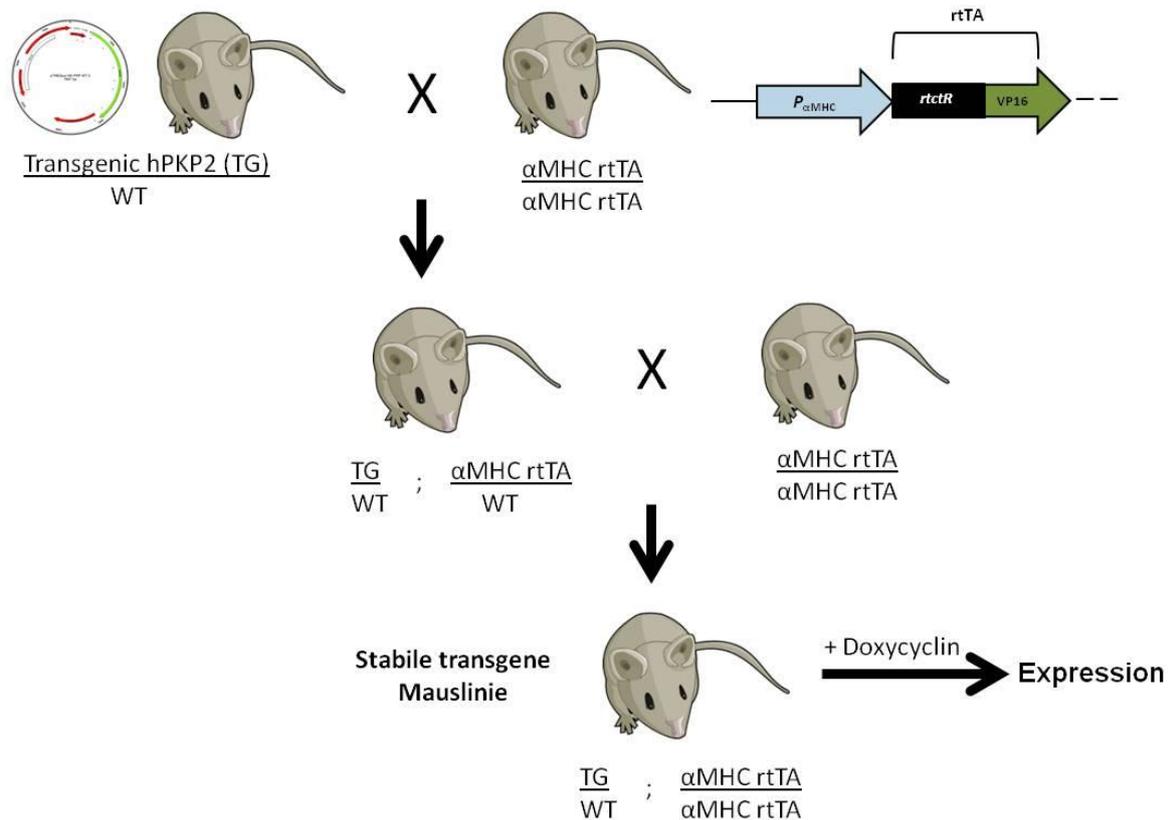


Abbildung 33: Schematisches Verpaarungsschema der transgenen PKP2 Maus

5.2.6.2 Induktion der Zielgen-Expression

Um die herzspezifische Zielgen-Expression in diesen doppelt transgenen Mäusen zu induzieren, wurde über das Trinkwasser Doxycyclin (2 mg/ml Doxycyclin + Sucrose (5 %)) zur Maskierung des leicht bitteren Doxycyclin Geschmacks) über den Versuchszeitraum dauerhaft verabreicht. Die Gabe von Doxycyclin selbst war für die Tiere nicht belastend.

5.2.6.3 Explantation des Herzen aus der Maus

Die 3-6 Monate alte Maus wurde mittels Cervikaldislokation getötet. Der Thorax wurde mit Hilfe einer Dissektionsschere geöffnet und die Rippenbögen mit einer Dissektionsspinzette gespreizt, um das Herz freizulegen. Das Herz konnte dann mit einer Dissektionsschere am Ausflustrakt abgetrennt und entnommen werden. Sofort nach der Entnahme wurde das Herz in 4°C gekühltem PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Unter dem Dissektionsmikroskop wurde das Organ auf Vollständigkeit (kompletter Herzmuskel inklusive beider Vorhöfe), auf Kontamination mit Fremdgewebe, wie zum Beispiel Teile der Lunge, und auf Unversehrtheit geprüft. Die weiteren Präparationsschritte richteten sich nach den Experimenten, die mit den jeweiligen Herzen durchgeführt werden sollen.

5.2.6.4 Echokardiographie

Alle echokardiographischen Untersuchungen wurden von Martin Taube und Stefanie Schelenz Max-Delbrück-Zentrum durchgeführt. Die Messungen als auch die Auswertungen erfolgten verblindet. Die Ultraschalluntersuchungen wurden mit dem Vevo 770® System (Visual Sonic) und mit einem 30 MHz Schallkopf durchgeführt. Zur Einleitung der Narkose wurde die Maus in eine Induktionskammer mit Isofluran (3 vol%) gesetzt. Die anästhesierte Maus wurde in Rückenlage auf eine Wärmeplatte gebracht und mit den Pfoten auf EKG-Elektroden fixiert. Die Messungen erfolgten bei einer Herzfrequenz von 450-550 Schläge/min, und die Körpertemperatur wurde konstant bei 37 °C gehalten. 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 *Frame rate* von 60 Hz wurde im B-Mode die parasternale lange Achse des Herzens dargestellt.

5.2.7 Statistik

Die statistische Signifikanz des Unterschieds der Mittelwerte bei Vergleichen zweier Gruppen wird durch den Student t-Test ermittelt. Dieser wurde zweiseitig mit unbestimmter Varianz durch das Tabellenkalkulationsprogramm Excel berechnet. Die Kennzeichnung der statistischen Signifikanz innerhalb von Diagrammen über den P-Wert erfolgt für alle Darstellungen gleichermaßen: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Die Anwendung des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Test bestätigte die Signifikanzen der einzelnen Experimenten.

6. Literaturverzeichnis

- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 7:248-249.
- Ai X, Zhao W, Pogwizd SM. (2010). Connexin43 knockdown or overexpression modulates cell coupling in control and failing rabbit left ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*. 85:751-762.
- Anastasiadis PZ, Reynolds AB. (2000). The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *Journal of Cell Science*. 113:1319-1334.
- Andrade MA, Petosa C, O'Donoghue SI, Muller CW, Bork P. (2001). Comparison of ARM and HEAT protein repeats. *Journal of molecular biology*. 309:1-18.
- Angst BD, Nilles LA, Green KJ. (1990). Desmoplakin-II Expression Is Not Restricted to Stratified Epithelia. *Journal of Cell Science*. 97:247-257.
- Antoniades L, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, Syrris P, Asimaki A, Panagiotakos D, Zambartas C, Stefanadis C, McKenna WJ, Protonotarios N. (2006). Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by deletions in plakophilin-2 and plakoglobin (Naxos disease) in families from Greece and Cyprus: genotype-phenotype relations, diagnostic features and prognosis. *Eur Heart J*. 27(18):2208-2216.
- Asimaki A, Syrris P, Wichter T, Matthias P, Saffitz JE, McKenna WJ. (2007). A novel dominant mutation in plakoglobin causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*. 81:964-973.
- Asimaki A, Tandri H, Huang H, Halushka MK, Gautam S, Basso C, Thiene G, Tsatsopoulou A, Protonotarios N, McKenna WJ, Calkins H, Saffitz JE. (2009). A new diagnostic test for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 360:1075-1084.
- Asimaki A, Saffitz JE. (2010). The Role of Endomyocardial Biopsy in ARVC: Looking Beyond Histology in Search of New Diagnostic Markers. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 22:111-117.
- Awad MM, Calkins H, Judge DP. (2008). Mechanisms of disease: Molecular genetics of arrhythmogenic Right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 5:258-267.
- Banerjee I, Yekkala K, Borg TK, Baudino TA. (2006). Dynamic interactions between myocytes, fibroblasts, and extracellular matrix. *Ann N Y Acad Sci*. 1080:76-84.
- Bartoli M, Richard I. (2005). Calpains in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol*. 37:2115-2133.
- Basso C, Corrado D, Marcus FI, Nava A, Thiene G. (2009). Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Lancet*. 373:1289-1300.
- Bass-Zubek AE, Hobbs RP, Amargo EV, Garcia NJ, Hsieh SN, Chen X, Wahl JK 3rd, Denning MF, Green KJ. (2008). Plakophilin 2: a critical scaffold for PKC alpha that regulates intercellular junction assembly. *J Cell Biol*. 181:605-613.
- Beffagna G, De Bortoli M, Nava A, Salamon M, Lorenzon A, Zaccolo M, Mancuso L, Sigalotti L, Bauce B, Occhi G, Basso C, Lanfranchi G, Towbin JA, Thiene G, Danieli GA, Rampazzo A. (2007). Missense mutations in desmocolin-2 N-terminus, associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, affect intracellular localization of desmocolin-2 in vitro. *BMC Med Genet*. 8:65.
- Behrens J et al. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382:638-642.
- Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R. (1996). A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature*. 382(6588):225-230.
- Bian JS, Wang HX, Zhang WM, Wong TM. (1998). Effects of kappa-opioid receptor stimulation in the heart and the involvement of protein kinase C. *Br J Pharmacol*. 124:600-606.

- Bodi I, Wang S, Schwartz A, Lakatta EG, DePaoli-Roach AA, Robbins J, Hewett TE, Bibb JA, Westfall MV, Kranias EG, Molkentin JD. (2004). PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med.* 10:248-254.
- Bonne S, van Hengel J, Nollet F, Kools P, van Roy F. (1999). Plakophilin-3, a novel Armadillo-like protein present in nuclei and desmosomes of epithelial cells. *Journal of Cell Science.* 112:2265-2276.
- Borrmann CM, Grund C, Kuhn C, Hofmann I, Pieperhoff S, Franke WW. (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(6):469-485.
- Bowles NE, Ni J, Marcus F, Towbin JA. (2002). The detection of cardiotropic viruses in the myocardium of patients with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 39:892-895.
- Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, Kimball TF, Lorenz JN, Nairn AC, Liggett SB, Bodi I, Wang S, Schwartz A, Lakatta EG, DePaoli-Roach AA, Robbins J, Hewett TE, Bibb JA, Westfall MV, Kranias EG, Molkentin JD. (2004). PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med.* 10(3):248-254.
- Burke AP, Farb A, Tashko G, Virmani R. (1998). Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy and fatty replacement of the right ventricular myocardium: Are they different diseases? *Circulation.* 97:1571-1580.
- Carnahan RH, Rokas A, Gaucher EA, Reynolds AB. (2010). The molecular evolution of the p120-catenin subfamily and its functional associations. *PLoS One.* 5:e15747.
- Carvajal-Huerta L. (1998). Epidermolytic palmoplantar keratoderma with woolly hair and dilated cardiomyopathy. *J Am Acad Dermatol.* 39(3):418-421.
- Chen X, Bonne S, Hatzfeld M, van Roy F, Green KJ. (2002). Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and beta – catenin signaling. *J Biol Chem.* 277:10512-10522.
- Chen X, Shevtsov SP, Hsich E, Cui L, Haq S, Aronovitz M, Kerkelä R, Molkentin JD, Liao R, Salomon RN, Patten R, Force T. (2006). The beta-catenin/T-cell factor/lymphocyte enhancer factor signaling pathway is required for normal and stress-induced cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biol.* 26:4462-4473.
- Chidgey M. (2002). Desmosomes and disease: an update. *Histology and Histopathology* 17:1179-1192.
- Chitaev NA et al. (1996). The binding of plakoglobin to desmosomal cadherins: Patterns of binding sites and Topogenic potential. *Journal of Cell Biology.* 133:359-369.
- Choi HJ, Weis WI. (2005). Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1. *J Mol Bio.* 346:367-376.
- Chu AF, Zado E, Marchlinski FE. (2010). Atrial arrhythmias in patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia and ventricular tachycardia. *Am J Cardiol.* 106:720-722.
- Claycomb WC, Lanson NA Jr, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ Jr. (1998). HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:2979-2984.
- Coonar AS, Protonotarios N, Tsatsopoulou A, Needham EWA, Houlston RS, Cliff S. (1998). Gene and woolly hair (naxos disease) maps to 17q21. *Circulation.* 97:2049-2058.
- Cong J, Goll DE, Peterson AM, Kapprell HP. (1989). The role of autolysis in activity of the Ca²⁺-dependent proteinases (mu-calpain and m-calpain). *J Biol Chem.* 264:10096-10103.
- Corrado D, Basso C, Schiavon M, Thiene G. (1998). Screening for hypertrophic cardiomyopathy in young athletes. *N Engl J Med.* 339:364-369.
- Corrado D, Fontaine G, Marcus FI, McKenna WJ, Nava A, Thiene G, Wichter T (2000). Arrhythmogenic right of the european society of cardiology and of the scientific council on cardiomyopathies of the world heart federation. *Circulation.* 101:E101-106.

- Corrado D, Basso C, Pilichou K, Thiene G. (2011). Molecular biology and clinical management of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Heart*. 97:530-539.
- Cowin P, Franke WW, Grund, Kapprell HP. (1985). The Desmosome-Intermediate Filament complex. In G.M.Edelman & J.P. Thiery (Eds.), *The cell in contact: Adhesion and Junctions as morphogenetic determinants*. New York: Wiley and Sons. 427-460.
- Cowin P, Kapprell HP, Franke WW. (1985). The Complement of Desmosomal Plaque Proteins in Different Cell-Types. *Journal of Cell Biology*. 101:1442-1454.
- Cox J, Mann M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature biotechnology*. 26:1367-1372.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 378:785-789.
- Dalla Volta S, Battaglia G, Zerbini E. (1961). Auricularization of right ventricular pressure curve. *Am Heart J*. 61:25-33.
- den Haan AD, Tan BY, Zikusoka MN, Lladó LI, Jain R, Daly A, Tichnell C, James C, Amat-Alarcon N, Abraham T, Russell SD, Bluemke DA, Calkins H, Dalal D, Judge DP. (2009). Comprehensive desmosome mutation analysis in north americans with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*. 5:428-435.
- Doble BW, Ping P, Kardami E. (2000). The epsilon subtype of protein kinase C is required for cardiomyocyte connexin-43 phosphorylation. *Circ Res*. 86:293-301.
- Doble BW, Ping P, Fandrich RR, Cattini PA, Kardami E. (2001). Protein kinase C-epsilon mediates phorbol ester-induced phosphorylation of connexin-43. *Cell Commun Adhes*. 8:253-256.
- Domian IJ, Chiravuri M, van der Meer P, Feinberg AW, Shi X, Shao Y, Wu SM, Parker KK, Chien KR. (2009). Generation of functional ventricular heart muscle from mouse ventricular progenitor cells. *Science*. 326(5951):426-429
- Dunn CA, Su V, Lau AF, Lampe PD. (2012). Activation of akt, not connexin 43 protein ubiquitination, regulates gap junction stability. *J Biol Chem*. 287:2600-2607.
- Dunn WA Jr. (1994). Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol*. 4:139-143.
- Eastman Q, Grosschedl R. (1999). Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Current Opinion in Cell Biology*. 11:233-240.
- Eshkind L, Tian Q, Schmidt A, Franke WW, Windoffer R, Leube RE. (2002). Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early embryonic development and proliferation of embryonal stem cells. *Eur J Cell Biol*. 81(11):592-598.
- Fabritz L, Hoogendijk MG, Scicluna BP, van Amersfoort SC, Fortmueller L, Wolf S, Laakmann S, Kreienkamp N, Piccini I, Breithardt G, Noppinger PR, Witt H, Ebnet K, Wichter T, Levkau B, Franke WW, Pieperhoff S, de Bakker JM, Coronel R, Kirchhof P. (2011). Load-reducing therapy prevents development of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in plakoglobin-deficient mice. *J Am Coll Cardiol*. 57:740-750.
- Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, Nika H, Mills GB, Kobayashi R, Hunter T, Lu Z. (2007). Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem*. 282:11221-11229.
- Fidler LM, Wilson GJ, Liu F, Cui X, Scherer SW, Taylor GP, Hamilton RM. (2009). Abnormal connexin43 in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by plakophilin-2 mutations. *J Cell Mol Med*. 13:4219-4228.
- Fischer R, Reinehr R, Lu TP, Schönicke A, Warskulat U, Dienes HP, Häussinger D. (2005). Intercellular communication via gap junctions in activated rat hepatic stellate cells. *Gastroenterology*. 128(2):433-448.
- Fontaine G, Fontaliran F, Hébert JL, Chemla D, Zenati O, Lecarpentier Y, Frank R. (1999). Arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *Annu Rev Med*. 50:17-35.

- Franco SJ, Huttenlocher A. (2005). Regulating cell migration: Calpains make the cut. *J. Cell Sci.* 118:3829-3838.
- Frank R, Fontaine G, Vedel J, Mialet G, Sol C, Guiraudon G. (1978). Electrocardiology of 4 cases of right ventricular dysplasia inducing arrhythmia. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 71:963-972.
- Franke WW, Moll R. (1987). Cytoskeletal Components of Lymphoid Organs. 1. Synthesis of Cytokeratin-8 and Cytokeratin-18 and Desmin in Subpopulations of Extra follicular Reticulum Cells of Human Lymph-Nodes, Tonsils, and Spleen. *Differentiation.* 36:145-163.
- Franke WW et al. (1989). Molecular-Cloning and Amino-Acid Sequence of Human Plakoglobin, the Common Junctional Plaque Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 86:4027-4031.
- Franke WW, Schumacher H, Borrmann CM, Grund C, Winter-Simanowski S, Schlechter T, Pieperhoff S, Hofmann I. (2007). The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates - III: assembly and disintegration of intercalated disks in rat cardiomyocytes growing in culture. *Eur J Cell Biol.* 86(3):127-142.
- Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 399:597-601.
- Furth PA, St Onge L, Böger H, Gruss P, Gossen M, Kistner A, Bujard H, Hennighausen L. (1994). Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc Natl AcadSci U S A.* 91:9302-9306.
- Galvez AS, Diwan A, Odley AM, Hahn HS, Osinska H, Melendez JG, Robbins J, Lynch RA, Marreez Y, Dorn GW 2nd. (2007). Cardiomyocyte degeneration with calpain deficiency reveals a critical role in protein homeostasis. *Circ Res.* 100:1071-1078.
- Garcia-Gras E, Lombardi R, Giocondo MJ, Willerson JT, Schneider MD, Khoury DS, Marian AJ. (2006). Suppression of canonical Wnt/beta-catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 116:2012-2021.
- Garrod DR, Merritt AJ, Nie ZX. (2002). Desmosomal cadherins. *Current Opinion in Cell Biology.* 14:537-545.
- Garrod DR, Berika MY, Bardsley WF, Holmes D, Tabernero L. (2005). Hyper-adhesion in desmosomes: Its regulation in wound healing and possible relationship to cadherin crystal structure. *J Cell Sci.* 118:5743-5754.
- Garrod D, Chidgey M. (2008). Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta.* 1778:572-587.
- Gehmlich K, Lambiase PD, Asimaki A, Ciaccio EJ, Ehler E, Syrris P, Saffitz JE, McKenna WJ. (2011). A novel desmocollin-2 mutation reveals insights into the molecular link between desmosomes and gap junctions. *Heart Rhythm.* 8:711-718.
- Gehmlich K, Syrris P, Peskett E, Evans A, Ehler E, Asimaki A, Anastasakis A, Tsatsopoulou A, Vouliotis AI, Stefanadis C, Saffitz JE, Protonotarios N, McKenna WJ. (2011). Mechanistic insights into arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by desmocollin-2 mutations. *Cardiovasc Res.* 90:77-87.
- Gehmlich K, Syrris P, Reimann M, Asimaki A, Ehler E, Evans A, Quarta G, Pantazis A, Saffitz JE, McKenna WJ. (2011). Molecular changes in the heart of a severe case of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by a desmoglein-2 null allele. *Cardiovasc Pathol.*
- George CH, Kendall JM, Evans WH. (1999). Intracellular trafficking pathways in the assembly of connexins into gap junctions. *J Biol Chem.* 274(13):8678-8685.
- Gerull B, Heuser A, Wichter T, Paul M, Basson CT, McDermott DA, Lerman BB, Markowitz SM, Ellinor PT, MacRae CA, Peters S, Grossmann KS, Drenckhahn J, Michely B, Sasse-Klaassen S, Birchmeier W, Dietz R, Breithardt G, Schulze-Bahr E, Thierfelder L. (2004). Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet.* 36:1162-1164.

- Getsios S, Huen AC, Green KJ. (2004). Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 25:271-281.
- Glading A, Lauffenburger DA, Wells A. (2002). Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends Cell Biol.* 12:46-54.
- Glickman MH, Ciechanover A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 82(2):373-428.
- Godsel LM, Hsieh SN, Amargo EV, Bass AE, Pascoe-McGillicuddy LT, Huen AC, Thorne ME, Gaudry CA, ParkJK, Myung K, Goldman RD, Chew TL, Green KJ. (2005). Desmoplakin assembly dynamics in four dimensions: multiple phases differentially regulated by intermediate filaments and actin. *J Cell Biol.* 171:1045-1059.
- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. (2003). The calpain system. *Physiol Rev.* 83:731-801.
- Goll DE, Netti G, Mares SW, Thompson VF. (2008). Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *J Anim Sci.* 86:E19-35.
- Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. (1996). Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu RevBiochem.* 65:475-502.
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Müller G, Hillen W, Bujard H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science.* 268:1766-1769.
- Green KJ, Goldman RD, Chisholm RL. (1988). Isolation of cDNAs Encoding Desmosomal Plaque Proteins – Evidence That Bovine Desmoplakin-I and Desmoplakin-II are Derived from 2 Messenger-Rnas and A Single Gene. *ProcNatl Acad Sci U S A.* 85:2613-2617.
- Green KJ, Simpson CL. (2007). Desmosomes: new perspectives on a classic. *J Invest Dermatol.* 127:2499-2515.
- Grossmann KS, Grund C, Huelsken J, Behrend M, Erdmann B, Franke WW, Birchmeier W. (2004). Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation. *J Cell Biol.* 167:149-160.
- Grossmann KS. (2005). Bedeutung von Plakophilin 2 für die Bildung von Zellverbindungen zwischen Herzmuskelzellen und die Morphogenese des Herzens. *Dissertation.*
- Hall C, Li S, Li H, Creason V, Wahl JK 3rd. (2009). Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy plakophilin-2 mutations disrupt desmosome assembly and stability. *Cell Commun Adhes.* 16:15-27.
- Haq S, Michael A, Andreucci M, Bhattacharya K, Dotto P, Walters B, Woodgett J, Kilter H, Force T. (2003). Stabilization of beta-catenin by a Wnt-independent mechanism regulates cardiomyocyte growth. *ProcNatl Acad Sci U S A.* 100:4610-4615.
- Hatzfeld M, Green KJ, Sauter H. (2003). Targeting of p0071 to desmosomes and adherens junctions is mediated by different protein domains. *Journal of Cell Science.* 116:1219-1233.
- Hatzfeld M, Kristjansson GI, Plessmann U, Weber K. (1994). Band-6 Protein, A Major Constituent of Desmosomes from Stratified Epithelia, Is A Novel Member of the Armadillo Multigene Family. *Journal of Cell Science.* 107:2259-2270.
- Hatzfeld M. (2007). Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochimica et biophysica acta.* 1773:69-77.
- Hecht A, Litterst CM, Huber O, Kemler R. (1999). Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro. *J. Biol. Chem.* 274:18017-18025.
- Hedberg C, Melberg A, Kuhl A, Jenne D, Oldfors A. (2012). Autosomal dominant myofibrillar myopathy with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy 7 is caused by a DES mutation. *Eur J Hum Genet.*
- Hegde RS, Ploegh HL. (2010). Quality and quantity control at the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol.* 22:437-446.

- Heidkamp MC, Iyengar R, Szotek EL, Cribbs LL, Samarel AM. (2007). Protein kinase Cepsilon-dependent MARCKS phosphorylation in neonatal and adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 42:422-431.
- Herren T, Gerber PA, Duru F. (2009). Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: A not so rare "disease of the desmosome" with multiple clinical presentations. *Clin Res Cardiol.* 98:141-158.
- Heuser A, Plovie ER, Ellinor PT, Grossmann KS, Shin JT, Wichter T, Basson CT, Lerman BB, Sasse-Klaassen S, Thierfelder L, MacRae CA, Gerull B. (2006). Mutant desmocollin-2 causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet.* 79:1081-1088.
- Hofmann I, Mertens C, Brettel M, Nimmrich V, Schnölzer M, Herrmann H. (2000). Interaction of plakophilins with desmoplakin and intermediate filament proteins: an in vitro analysis. *J Cell Sci.* 113:2471-2483.
- Holthöfer B, Windoffer R, Troyanovsky S, Leube RE. (2007). Structure and function of desmosomes. *Int Rev Cytol.* 264:65-163.
- Hornberger TA, Armstrong DD, Koh TJ, Burkholder TJ, Esser KA. (2005). Intracellular signaling specificity response to uniaxial vs. multiaxial stretch: implications for mechanotransduction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288:C185-194.
- Hu J, Speisky H, Cotgreave IA. (1995). The inhibitory effects of boldine, glaucine, and probucol on TPA-Induced down regulation of gap junction function. Relationships to intracellular peroxides, protein kinase C translocation, and connexin 43 phosphorylation. *Biochem Pharmacol.* 50(10):1635-1643.
- Huang H, Asimaki A, Lo D, McKenna W, Saffitz J. (2008). Disparate effects of different mutations in plakoglobin cell mechanical behavior. *Cell Motil Cytoskeleton.* 65:964-978.
- Huber AH, Nelson WJ, Weis WI. (1997). Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell.* 90:871-882.
- Imanaga I. (2010). Pathological remodeling of cardiac gap junction connexin 43-With special reference to arrhythmogenesis. *Pathophysiology.* 17:73-81.
- Jacubus-Ambuludi EJ. (2011). Isolation and characterization of desmoplakin deficient adult murine cardiomyocytes. Bachelor Arbeit.
- Jacoby D, McKenna WJ. (2012). Genetics of inherited cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 33(3):296-304.
- Joshi-Mukherjee R, Coombs W, Musa H, Oxford E, Taffet S, Delmar M. (2008). Characterization of the Molecular phenotype of two arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)-related plakophilin-2 (PKP2) mutations. *Heart Rhythm.* 5:1715-1723.
- Kaidanovich-Beilin O, Woodgett JR. (2011). GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models. *Front Mol Neurosci.* 4:40.
- Kaplan SR, Gard JJ, Protonotarios N, Tsatsopoulou A, Spiliopoulou C, Anastasakis A, Squarcioni CP, McKenna WJ, Thiene G, Basso C, Brousse N, Fontaine G, Saffitz JE. (2004). Remodeling of myocyte gap junctions in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy due to a deletion in plakoglobin (Naxos disease). *Heart Rhythm.* 1(1):3-11.
- Kapflinger JD, Landstrom AP, Salisbury BA, Callis TE, Pollevick GD, Tester DJ, Cox MG, Bhuiyan Z, Bikker H, Wiesfeld AC, Hauer RN, van Tintelen JP, Jongbloed JD, Calkins H, Judge DP, Wilde AA, Ackerman MJ. (2011). Distinguishing arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia-associated mutations from background genetic noise. *J Am Coll Cardiol.* 57:2317-2327.
- Kartenbeck J, Franke WW, Moser JG, Stoffels U. (1983). Specific Attachment of Desmin Filaments to Desmosomal Plaques in Cardiac Myocytes. *Embo Journal.* 2:735-742.
- Kartenbeck J, Schwachheimer K, Moll R, Franke WW. (1984). Attachment of Vimentin Filaments to Desmosomal Plaques in Human Meningioma Cells and Arachnoidal Tissue. *Journal of Cell Biology.* 98:1072-1081.

- Kawamura K. (1994). cDNA Cloning and Expression of A Novel Human Desmocollin. *Journal of Biological Chemistry*. 269:26295-26302.
- Kennerdell JR, Carthew RW. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell*. 95(7):1017-1026.
- Klauke B, Kossmann S, Gaertner A, Brand K, Stork I, Brodehl A, Dieding M, Walhorn V, Anselmetti D, Gerdes D, Bohms B, Schulz U, Zu Knyphausen E, Vorgerd M, Gummert J, Milting H. (2010). De novo desmin-mutation N116S is associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Hum Mol Genet*. 19(23):4595-4607.
- Klein G, Schaefer A, Hilfiker-Kleiner D, Oppermann D, Shukla P, Quint A, Podewski E, Hilfiker A, Schröder F, Leitges M, Drexler H. (2005). Increased collagen deposition and diastolic dysfunction but preserved myocardial hypertrophy after pressure overload in mice lacking PKCepsilon. *Circ Res*. 96(7):748-755.
- Klotz LO, Patak P, Ale-Agha N, Buchczyk DP, Abdelmohsen K, Gerber PA, von Montfort C, Sies H. (2002). 2-Methyl-1,4-naphthoquinone, vitamin K(3), decreases gap-junctional intercellular communication via activation of the epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinase cascade. *Cancer Res*. 62(17):4922-4928.
- Koch PJ, Goldschmidt MD, Zimbelmann R, Troyanovsky R, Franke WW. (1992). Complexity and Expression Patterns of the Desmosomal Cadherins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:353-357.
- Kowalczyk AP. (1997). The amino-terminal domain of desmoplakin binds to plakoglobin and clusters desmosomal cadherin-plakoglobin complexes. *Journal of Cell Biology*. 139:773-784.
- Kowalczyk AP. (1999). The head domain of plakophilin-1 binds to desmoplakin and enhances its recruitment to desmosomes - Implications for cutaneous disease. *Journal of Biological Chemistry*. 274:18145-18148.
- Krusche CA, Holthöfer B, Hofe V, van de Sandt AM, Eshkind L, Bockamp E, Merx MW, Kant S, Windoffer R, Leube RE. (2011). Desmoglein 2 mutant mice develop cardiac fibrosis and dilation. *Basic Res Cardiol*. 106:617-633.
- Krutovskikh V, Yamasaki H. (1997). The role of gap junctional intercellular communication (GJIC) disorders in experimental and human carcinogenesis. *Histol Histopathol*. 12(3):761-768.
- Kumar NM, Gilula NB. (1996). The gap junction communication channel. *Cell*. 84(3):381-388.
- Kuruc N, Franke WW. (1988). Transient Coexpression of Desmin and Cytokeratin-8 and Cytokeratin-18 in Developing Myocardial-Cells of Some Vertebrate Species. *Differentiation*. 38:177-193.
- Laird DW, Castillo M, Kasprzak L. (1995). Gap junction turnover, intracellular trafficking, and phosphorylation of connexin43 in brefeldin A-treated rat mammary tumor cells. *J Cell Biol*. 131(5):1193-1203.
- Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, Kurata WE, Johnson RG, Lau AF. (2000). Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J Cell Biol*. 149:1503-1512.
- Lask A, Abraham DJ. (1994). TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J*. 18(7):816-827.
- Lemay DG, Hwang DH. (2006). Genome-wide identification of peroxisome proliferator response elements using integrated computational genomics. *J Lipid Res*. 47(7):1583-1587.
- Leung CL, Green KJ, Liem RKH. (2002). Plakins: a family of versatile cytolinker proteins. *Trends in Cell Biology*. 12:37-45.
- Li D, Liu Y, Maruyama M, Zhu W, Chen H, Zhang W, Reuter S, Lin SF, Haneline LS, Field LJ, Chen PS, Shou W. (2011). Restrictive loss of plakoglobin in cardiomyocytes leads to arrhythmogenic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet*. 20(23):4582-4596.
- Li J, Swope D, Raess N, Cheng L, Muller EJ, Radice GL. (2011). Cardiac tissue-restricted deletion of plakoglobin results in progressive cardiomyopathy and activation of beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol*. 31:1134-1144.

- Livak KJ. (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, da Graca Cabreira-Hansen M, Bell A, Fromm RR, Willerson JT, Marian AJ. (2010). Nuclear plakoglobin is essential for differentiation of cardiac progenitor cells to adipocytes in arrhythmogenic rightventricular cardiomyopathy. *Circ Res*. 109(12):1342-1353.
- Marcus FI, Fontaine GH, Guiraudon G, Frank R, Laurenceau JL, Malergue C, Grosogoeat Y. (1982). Rightventricular dysplasia: a report of 24 adult cases. *Circulation*. 65:384-398.
- Marcus FI, Fontaine G. (1995). Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: A review. *Pacing Clin Electrophysiol*. 18:1298-1314.
- Marcus FI, McKenna WJ, Sherrill D, Basso C, Baucé B, Bluemke DA, Calkins H, Corrado D, Cox MG, DauberJP, Fontaine G, Gear K, Hauer R, Nava A, Picard MH, Protonotarios N, Saffitz JE, Sanborn DM, Steinberg JS, Tandri H, Thiene G, Towbin JA, Tsatsopoulou A, Wichter T, Zareba W. (2010). Diagnosis of arrhythmogenic rightventricular cardiomyopathy/dysplasia: proposed modification of the Task Force Criteria. *Eur Heart J*. 31:806-814.
- McGrath JA. (1999). Hereditary diseases of desmosomes. *Journal of Dermatological Science*. 20:85-91.
- Merner ND, Hodgkinson KA, Haywood AF, Connors S, French VM, Drenckhahn JD, Kupprion C, Ramadanova K, Thierfelder L, McKenna W, Gallagher B, Morris-Larkin L, Bassett AS, Parfrey PS, Young TL. (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., Kuhn, C. & 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.
- Mertens C, et al. (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.
- Merner ND, Hodgkinson KA, Haywood AF, Connors S, French VM, Drenckhahn JD, Kupprion C, Ramadanova K, Thierfelder L, McKenna W, Gallagher B, Morris-Larkin L, Bassett AS, Parfrey PS, Young TL. (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(4):809-821.
- Michaelson JE, Huang H. (2012). Cell-Cell Junctional Proteins in Cardiovascular Mechanotransduction. *Ann Biomed Eng*. 40(3):568-577.
- Minamino T, Komuro I, Kitakaze M. (2010). Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circ Res*. 107:1071-1082.
- Molnár A, Borbély A, Czuriga D, Ivetta SM, Szilágyi S, Hertelendi Z, Pásztor ET, Balogh A, Galajda Z, Szerafin T, Jaquet K, Papp Z, Edes I, Tóth A. (2009). Protein kinase C contributes to the maintenance of contractile force in human ventricular cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 284(2):1031-1039.
- Montgomery DE, Rundell VL, Goldspink PH, Urboniene D, Geenen DL, de Tombe PP, Buttrick PM. (2005). Protein kinase C epsilon induces systolic cardiac failure marked by exhausted inotropic reserve and intact Frank-Starling mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 289(5):H1881-1888.
- Mülhardt, C. (2003). *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 4. ed. München: Elsevier GmbH.
- Müller J, Ritt DA, Copeland TD, Morrison DK. (2003). Functional analysis of C-TAK1 substrate binding and identification of PKP2 as a new C-TAK1 substrate. *Embo Journal*. 22:4431-4442.
- Musil LS, Goodenough DA. (1991). Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol*. 115(5):1357-1374.
- Nagata M, Hiroe M, Ishiyama S, Nishikawa T, Sakomura Y, Kasanuki H, Toyosaki T, Marumo F. (2000). Apoptotic cell death in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a comparative study with idiopathic sustained ventricular tachycardia. *Jpn Heart J*. 41:733-741.

- Nava A, Bauce B, Basso C, Muriago M, Rampazzo A, Villanova C, Daliento L, Buja G, Corrado D, Danieli GA, Thiene G. (2000). Clinical profile and long-term follow-up of 37 families with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 36(7):2226-2233.
- Newton PM, Messing RO. (2010). The substrates and binding partners of protein kinase C epsilon. *Biochem J.* 427:189-196.
- Ng PC, Henikoff S. (2003). SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 31:3812-3814.
- Nishizuka Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science.* 258(5082):607-614.
- Noorman M, van der Heyden MA, van Veen TA, Cox MG, Hauer RN, de Bakker JM, van Rijen HV. (2009). Cardiac cell-cell junctions in health and disease: Electrical versus mechanical coupling. *J Mol Cell Cardiol.* 47:2331.
- Noren NK, Liu BP, Burridge K, Kreft B. (2000). p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol.* 150:567-580.
- Norgett EE, Hatsell SJ, Carvajal-Huerta L, Cabezas JC, Common J, Purkis PE, Whittock N, Leigh IM, Stevens HP, Kelsell DP. (2000). Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma. *Hum Mol Genet.* 9(18):2761-2766.
- Norman M, Simpson M, Mogensen J, Shaw A, Hughes S, Syrris P, Sen-Chowdhry S, Rowland E, Crosby A, McKenna WJ. (2005). Novel mutation in desmoplakin causes arrhythmogenic left ventricular cardiomyopathy. *Circulation.* 112(5):636-642.
- Nuber UA, Schafer S, Schmidt A, Koch PJ, Franke WW. (1995). The Widespread Human Desmocollin Dsc2 and Tissue-Specific Patterns of Synthesis of Various Desmocollin Subtypes. *European Journal of Cell Biology.* 66:69-74.
- O'Keefe EJ, Erickson HP, Bennett V. (1989). Desmoplakin-I and Desmoplakin-II - Purification and Characterization. *Journal of Biological Chemistry.* 264:8310-8318.
- Otten E, Asimaki A, Maass A, van Langen IM, van der Wal A, de Jonge N, van den Berg MP, Saffitz JE, Wilde AA, Jongbloed JD, van Tintelen JP. (2010). Desmin mutations as a cause of right ventricular heart failure affect the intercalated disks. *Heart Rhythm.* 7:1058-1064.
- Oxford EM, Musa H, Maass K, Coombs W, Taffet SM, Delmar M. (2007). Connexin43 remodeling caused by inhibition of plakophilin-2 expression in cardiac cells. *Circ Res.* 101:703-711.
- Paffenholz R, Kuhn C, Grund C, Stehr S, Franke WW. (1999). The arm-repeat protein NPRAP (neurojungin) is a constituent of the plaques of the outer limiting zone in the retina, defining a novel type of adhering junction. *Experimental Cell Research.* 250:452-464.
- Palatinus JA, Rhett JM, Gourdie RG (2011). Enhanced PKC ϵ mediated phosphorylation of connexin43 at serine 368 by a carboxyl-terminal mimetic peptide is dependent on injury. *Channels (Austin).* 5:236-240.
- Peifer M, Wieschaus E. (1990). The segment polarity gene armadillo encodes a functionally modular protein that is the Drosophila homolog of human plakoglobin. *Cell.* 63(6):1167-1176.
- Peifer M, Berg S, Reynolds AB. (1994). A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell.* 76:789-791.
- Perez-Moreno M, Fuchs E. (2006). Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *DevCell.* 11:601-612.
- Perrin BJ, Huttenlocher A. (2002). Calpain. *Int J Biochem Cell Biol.* 34:722-725.
- Pieperhoff S, Schumacher H, Franke WW. (2008). The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. V. The importance of plakophilin-2 demonstrated by small interference RNA mediated knockdown in cultured rat cardiomyocytes. *Eur J Cell Biol.* 87:399-411.

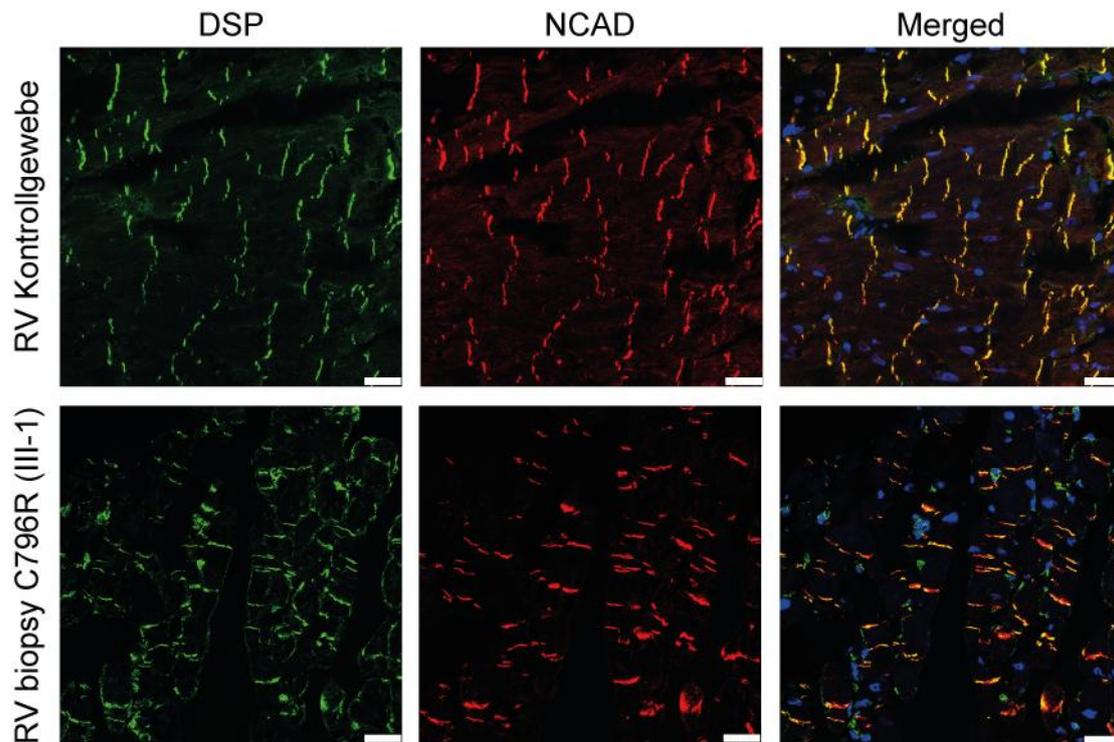
- Pilichou K, Nava A, Basso C, Beffagna G, Bauce B, Lorenzon A, Frigo G, Vettori A, Valente M, Towbin J, Thiene G, Danieli GA, Rampazzo A. (2006). Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation*. 113:1171-1179.
- Pilichou K, Remme CA, Basso C, Campian ME, Rizzo S, Barnett P, Scicluna BP, Bauce B, van den Hoff MJ, deBakker JM, Tan HL, Valente M, Nava A, Wilde AA, Moorman AF, Thiene G, Bezzina CR. (2009). Myocyte necrosis underlies progressive myocardial dystrophy in mouse *dsg2*-related arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Exp Med*. 206:1787-1802.
- Pokutta S, Drees F, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI. (2008). Biochemical and structural analysis of alpha-catenin in cell-cell contacts. *Biochem Soc Trans*. 36:141-147.
- Portbury AL, Willis MS, Patterson C. (2011). Tearin' up my heart: proteolysis in the cardiac sarcomere. *J Biol Chem*. 286:9929-9934.
- Priori SG, Napolitano C, Grillo M. (2001). Concealed arrhythmogenic syndromes: the hidden substrate of idiopathic ventricular fibrillation? *Cardiovasc Res*. 50:218-223.
- Protonotarios N, Tsatsopoulou A. (2006). Naxos disease: Cardiocutaneous syndrome due to cell adhesion defect. *Orphanet J Rare Dis*. 1:4.
- Rampazzo A, Nava A, Malacrida S, Beffagna G, Bauce B, Rossi V, Zimbello R, Simionati B, Basso C, Thiene G, Towbin JA, Danieli GA. (2002). Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes adominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*. 71:1200-1206.
- Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. (2007). Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature protocols*. 2:1896-1906.
- Reynolds AB, Herbert L, Cleveland JL, Berg ST, Gaut JR. (1992). P120, A Novel Substrate of Protein Tyrosine Kinase Receptors and of P60V-Src Is Related to Cadherin-Binding Factors Beta-Catenin, Plakoglobin and Armadillo. *Oncogene*. 7:2439-2445.
- Saguner AM, Brunckhorst C, Duru F. (2011). Die Arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie/Kardiomyopathie. *Cardiovascular Medicine*. 14(11):303-314.
- Salameh A, Wustmann A, Karl S, Blanke K, Apel D, Rojas-Gomez D, Franke H, Mohr FW, Janousek J, Dhein S. (2010). Cyclic mechanical stretch induces cardiomyocyte orientation and polarization of the gap junction protein connexin43. *Circ Res*. 106:1592-1602.
- Sanger F, Nicklein S, Coulson AR. (1977). DNA sequencing chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 74:5463-5467.
- Sato PY, Musa H, Coombs W, Guerrero-Serna G, Patiño GA, Taffet SM, Isom LL, 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.
- Sato PY, Coombs W, Lin X, Nekrasove O, Green K, Isom LL, Taffet S, Delmar M. (2011). Interactions Between Ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin 43 at the Cardiac Intercalated Disc. *Circ. Res*. 109(2):193-201.
- Schafer S, Koch PJ, Franke WW. (1994). Identification of the Ubiquitous Human Desmoglein, Dsg2, and the Expression Catalog of the Desmoglein Subfamily of Desmosomal Cadherins. *Experimental Cell Research*. 211:391-399.
- Scheich C, Kummel D, Soumailakakis D, Heinemann U, Bussow K. (2007). Vectors for co-expression of a unrestricted number of proteins. *Nucleic Acids Res*. 35:e43.
- Schmidt A et al. (1997). Plakophilins 1a and 1b: widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components. *Cell and Tissue Research*. 290:481-499.
- Schmidt A et al. (1999). Plakophilin 3 - a novel cell-type-specific desmosomal plaque protein. *Differentiation*. 64:291-236.
- Schreiber KL, Paquet L, Allen BG, Rindt H. (2001). Protein kinase C isoform expression and activity in the mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 281:H2062-2071.

- Severs NJ, Bruce AF, Dupont E, Rothery S. (2008). Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc Res.* 80:9-19.
- Shibamoto S. et al. (1995). Association of P120, A Tyrosine Kinase Substrate, with E-Cadherin/Catenin complexes. *Journal of Cell Biology.* 128:949-957.
- Shou W. (2011). Restrictive loss of plakoglobin in cardiomyocytes leads to arrhythmogenic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet.* 20:4582-4596.
- Souders CA, Bowers SL, Baudino TA. (2009). Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res.* 105(12):1164-1176.
- Simcha I, et al. (1998). Differential nuclear translocation and transactivation potential of beta-catenin and plakoglobin. *Journal of Cell Biology.* 141:1433-1448.
- Singh RB, Dandekar SP, Elimban V, Gupta SK, Dhalla NS. (2004). Role of proteases in the pathophysiology of cardiac disease. *Mol Cell Biochem.* 263:241-256.
- Smith W. (2011). Guidelines for the diagnosis and management of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Heart Lung Circ.* 20(12):757-760.
- Solanas G. et al. (2004). beta-catenin and plakoglobin N- and C-tails determine ligand specificity. *Journal of Biological Chemistry.* 279:49849-49856.
- South AP, Wan H, Stone MG, Dopping-Hepenstal PJ, Purkis PE, Marshall JF, Leigh IM, Eady RA, Hart I R, McGrath JA. (2003). Lack of plakophilin 1 increases keratinocyte migration and reduces desmosome stability. *J Cell Sci.* 116:3303-3014.
- Sporn MB, Roberts AB. (1992). Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol.* 119(5):1017-1021.
- Stappenbeck TS. (1993). Functional-Analysis of Desmoplakin Domains - Specification of the Interaction with Keratin versus Vimentin Intermediate Filament Networks. *Journal of Cell Biology.* 123:691-705.
- Striegl H, Andrade-Navarro MA, Heinemann U. (2010). Armadillo motifs involved in vesicular transport. *PLoS one.* 5:e8991.
- Taylor M, Graw S, Sinagra G, Barnes C, Slavov D, Brun F, Pinamonti B, Salcedo EE, Sauer W, Pyxaras S, Anderson B, Simon B, Bogomolovas J, Labeit S, Granzier H, Mestroni L. (2011). Genetic variation in titin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy-overlap syndromes. *Circulation.* 124(8):876-85.
- Thiene G, Nava A, Corrado D, Rossi L, Pennelli N. (1988). Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people. *N Engl J Med.* 318:129-133.
- Thompson VF, Goll DE. (2000). Purification of mu-calpain, m-calpain, and calpastatin from animal tissues. *Methods Mol Biol.* 144:3-16.
- Tiso N, Stephan DA, Nava A, Bagattin A, Devaney JM, Stanchi F, Larderet G, Brahmabhatt B, rown K, Bauce B, Muriago M, Basso C, Thiene G, Danieli GA, Rampazzo A. (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.
- Trosko JE, Ruch RJ. (1998). Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front Biosci.* 3:d208-236.
- Tsatsopoulou AA, Protonotarios NI, McKenna WJ. (2006). Arrhythmogenic right ventricular dysplasia, a cell adhesion cardiomyopathy: insights into disease pathogenesis from preliminary genotype-phenotype assessment. *Heart.* 92(12):1720-1723.
- Valencik ML, McDonald JA. (2001). Codon optimization markedly improves doxycycline regulated gene expression in the mouse heart. *Transgenic Res.* 10:269-275.
- van der Loop FTL, Schaart G, Langmann H, Ramaekers FCS, Viebahn C. (1995). Rearrangement of Intercellular Junctions and Cytoskeletal Proteins During Rabbit Myocardium Development. *European Journal of Cell Biology.* 68:62-69.

- van Tintelen JP, Entius MM, Bhuiyan ZA, Jongbloed R, Wiesfeld AC, Wilde AA, van der Smagt J, Boven LG, Mannens MM, van Langen IM, Hofstra RM, Otterspoor LC, Doevendans PA, Rodriguez LM, van Gelder IC, Hauer RN. (2006). Plakophilin-2 mutations are the major determinant of familial arrhythmogenic rightventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circulation*. 113:1650-1658.
- Virata MLA, Wagner RM, Parry DAD, Green KJ. (1992). Molecular-Structure of the Human Desmoplakin-I and Desmoplakin-II Amino Terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:544-548.
- Wahl J K et al. (1996). Plakoglobin domains that define its association with the desmosomal cadherins and the classical cadherins: Identification of unique and shared domains. *Journal of Cell Science*. 109:1143-1154.
- Wallis S, Lloyd S, Wise I, Ireland G, Fleming TP, Garrod D. (2000). The alpha isoform of protein kinase C Is involved in signaling the response of desmosomes to wounding in cultured epithelial cells. *Mol Biol Cell*. 11:1077-1092.
- Wang X, Su H, Ranek MJ. (2008). Protein quality control and degradation in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 45:11-27.
- Wang Y, Minshall RD, Schwartz DE, Hu G. (2011). Cyclic stretch induces alveolar epithelial barrier dysfunction via calpain-mediated degradation of p120-catenin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 301:197-206.
- White SM, Constantin PE, Claycomb WC. (2004). Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 286:H823-829.
- Wichter T, Pual M, Breihardt G. (2005). Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*. 56(5):118-125.
- Witcher LL et al. (1996). Desmosomal cadherin binding domains of plakoglobin. *Journal of Biological Chemistry*. 271:10904-10909.
- Wlodarska EK, Wozniak O, Konka M, Rydlewska-Sadowska W, Biederman A, Hoffman P. (2006). Thromboembolic complications in patients with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Eurpace*. 8:596-600.
- Wolf A, Hatzfeld M. (2010). A role of plakophilins in the regulation of translation. *Cell Cycle*. 9:2973-2978.
- Wu S, Skolnick J, Zhang Y. (2007). Ab initio modeling of small proteins by iterative TASSER simulations. *BMC biology*. 5:17.
- Xu T, Yang Z, Vatta M, Rampazzo A, Boffagna G, Pilichou K, Scherer SE, Saffitz J, Kravitz J, Zareba W, Danieli GA, Lorenzon A, Nava A, Baucé B, Thiene G, Basso C, Calkins H, Gear K, Marcus F, Towbin JA; Multidisciplinary Study of Right Ventricular Dysplasia Investigators. (2010). Compound and digenic heterozygosity contributes to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 55(6):587-597.
- Yamada K, Green KG, Samarel AM, Saffitz JE. (2005). Distinct pathways regulate expression of cardiac electrical and mechanical junction proteins in response to stretch. *Circ Res*. 97:346-353.
- Yamaji K, Fujimoto S, Ikeda Y, Masuda K, Nakamura S, Saito Y, Yutani C. (2005). Apoptotic myocardial cell death in the setting of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Acta Cardiol*. 60:465-470.
- Yamamoto T, Ikemoto N. (2002). Spectroscopic monitoring of local conformational changes during the intramolecular domain-domain interaction of the ryanodine receptor. *Biochemistry*. 41(5):1492-1501.
- Yanagawa S, van Leeuwen F, Wodarz A, Klingensmith J, Nusse R. (1995). The disheveled protein is modified by wingless signaling in Drosophila. *Genes Dev*. 9(9):1087-1097.
- Yang Z, Bowles NE, Scherer SE, Taylor MD, Kearney DL, Ge S, Nadvoretzkiy VV, DeFreitas G, Carabello B, Brandon LI, Godsel LM, Green KJ, Saffitz JE, Li H, Danieli GA, Calkins H, Marcus F, Towbin JA. (2006). Desmosomal dysfunction due to mutations in desmoplakin causes arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circ Res*. 99:646-655.

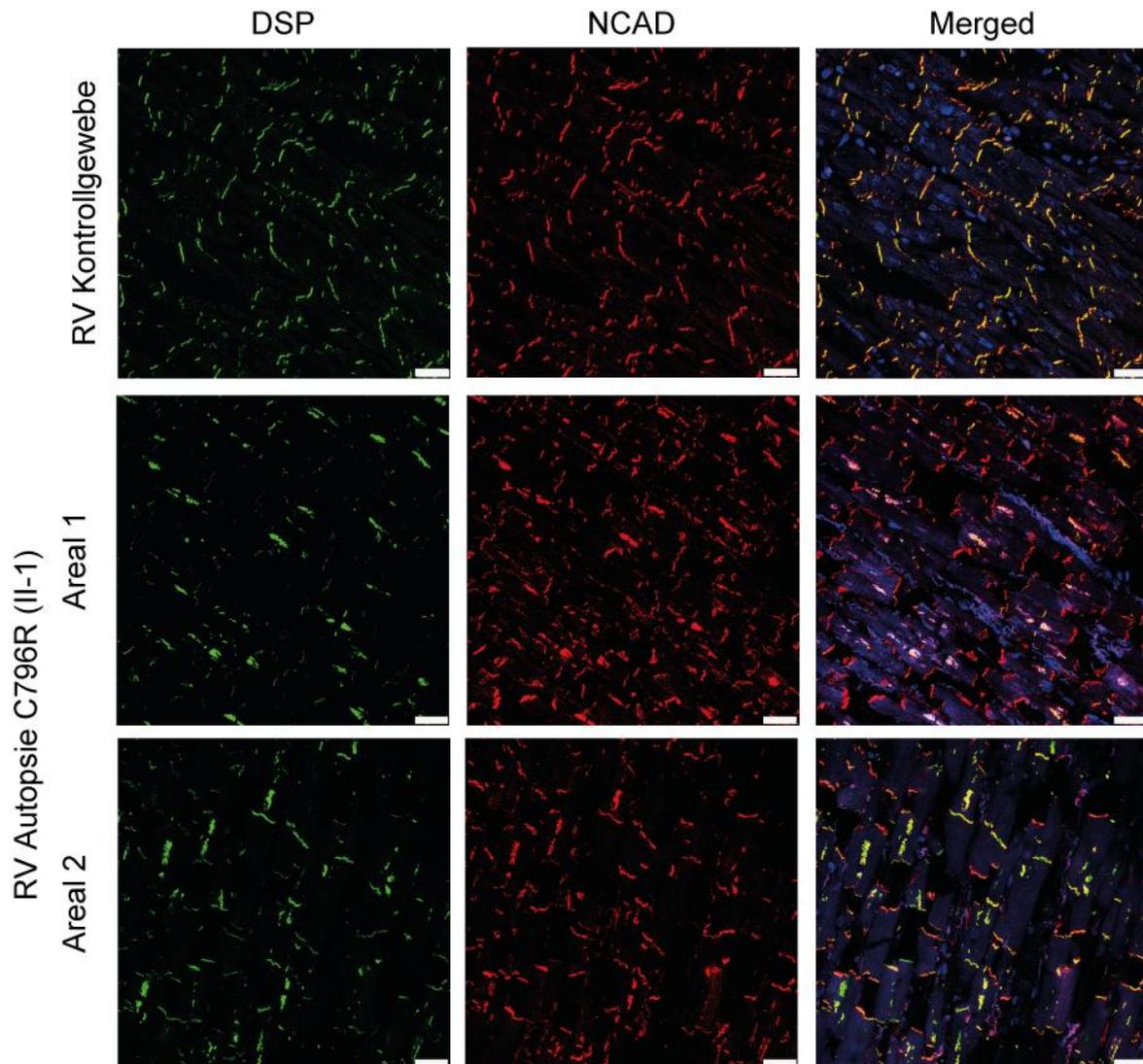
- Yonemura S, Itoh M, Nagafuchi A, Tsukita S. (1995). Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells. *J Cell Sci.* 108:127-142.
- Zhang J, Baines CP, Zong C, Cardwell EM, Wang G, Vondriska TM, Ping P. (2005). Functional proteomic analysis of a three-tier PKCepsilon-Akt-eNOS signaling module in cardiac protection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288:H954-961.
- Zhang Y. (2007). Template-based modeling and free modeling by I-TASSER in CASP7. *Proteins.* 69:108-117.
- Zhang Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics.* 9:40.
- Zhurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze'ev A. (2000). Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin. *Mol Cell Biol.* 20:4238-4252.
- Zheng Q, Li J, Wang X. (2009). Interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in proteinopathies. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 1:127-142.
- Zolk O, Schenke C, Sarikas A. (2006). The ubiquitin-proteasome system: focus on the heart. *Cardiovasc Res.* 70:410-421.

7. Anhang



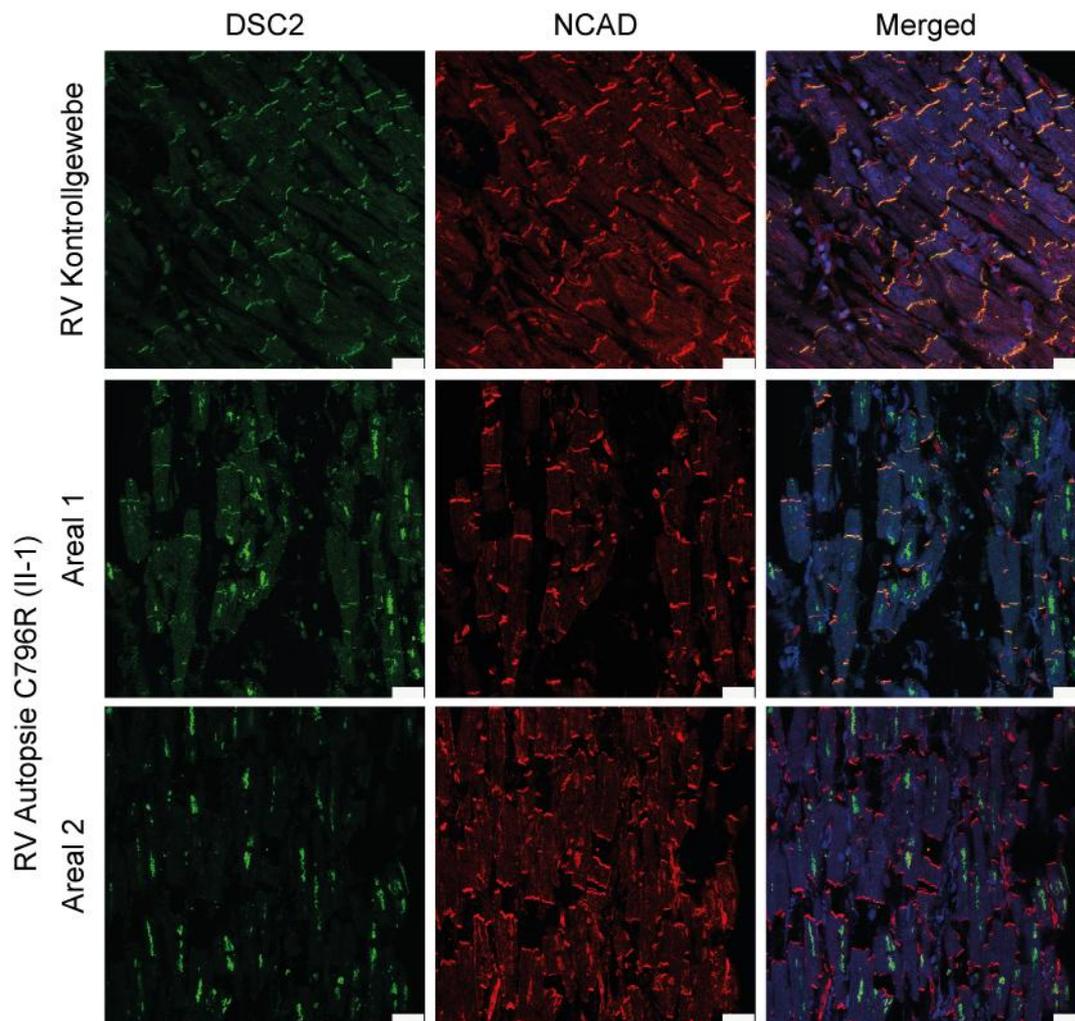
Anhang Abbildung A1: Konfokale Immunofluoreszenz-Färbungen einer kardialen Biopsie von Patient III-1 mit heterozygoter p.C796R PKP2 Mutation

Repräsentativer Gefrierschnitt einer endokardialen Biopsie des Probanden III-1 zeigte eine normale Expression von DSP an den Glanzstreifen der Kardiomyozyten, verglichen mit dem Kontrollgewebe. Das Adhäsionsprotein N-Cadherin diente als interne Qualitätskontrolle und konnte in beiden Proben zu gleichen Anteilen detektiert werden. Maßstab, 25 μm .



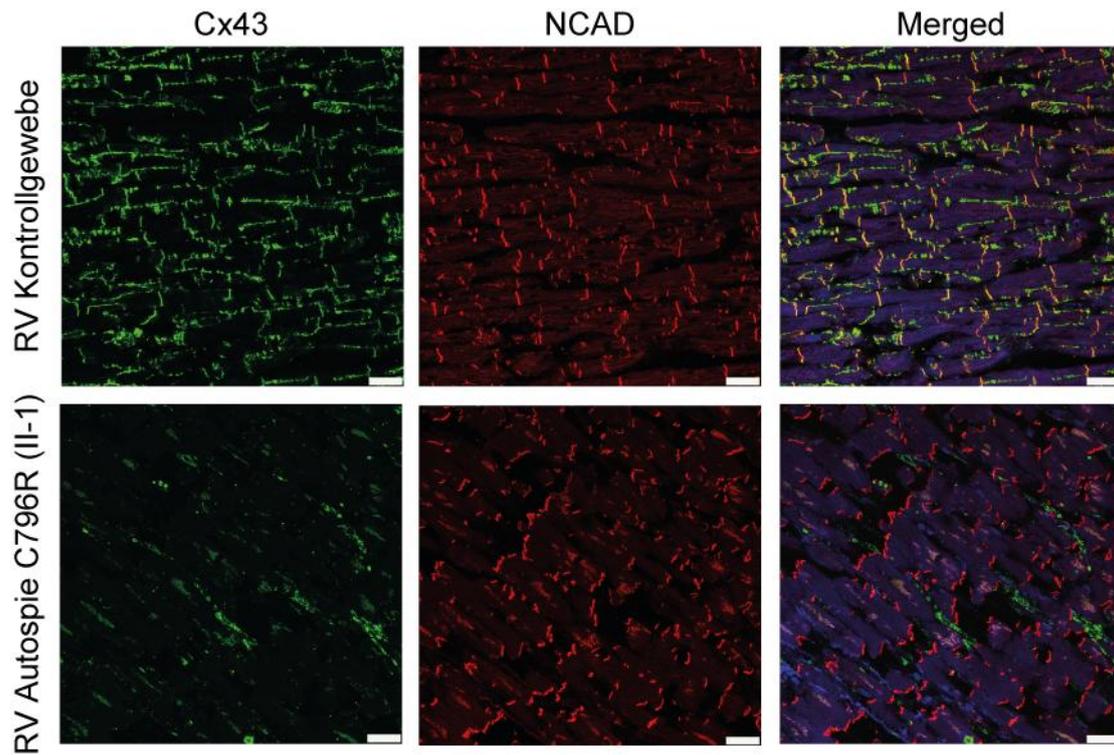
Anhang Abbildung A2: Konfokale Immunofluoreszenz-Färbungen einer kardialen Autopsie des Patienten II-1 mit heterozygoter p.C796R PKP2 Mutation

Repräsentativer Paraffin-Schnitt einer Autopsie des RV des Probanden II-1 demonstrierte einen deutlichen Verlust des DSP Signals an den Glanzstreifen im Areal 1, während N-Cadherin sowohl in der Probe von II-1 als auch im Kontrollgewebe normal exprimiert ist. Im Gegensatz dazu ist keine Veränderung der DSP Expression im Areal 2 des gleichen Ausschnitts nachzuweisen, verglichen mit dem RV Kontrollgewebe. Maßstab, 25 µm.



Anhang Abbildung A3: Konfokale Immunofluoreszenz-Färbungen einer kardialen Autopsie des Patienten II-1 mit heterozygoter p.C796R PKP2 Mutation

Im Gewebe des Patienten II-1 war das Expressionsmuster von DSC2 im Areal 2 im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert, wohingegen keine Veränderung des JUP Signals in Areal 1 des gleichen Schnittes detektiert wurde. Die Expression von N-Cadherin war in allen Proben unverändert. Maßstab, 25 μ m.



Anhang Abbildung A4: Konfokale Immunofluoreszenz-Färbungen einer kardialen Autopsie des Patienten II-1 mit heterozygoter p.C796R PKP2 Mutation

Repräsentativer Paraffin-Schnitt einer Autopsie des RV des Probanden II-1 demonstrierte einen deutlichen Verlust des Cx43 Signals an den Glanzstreifen, während N-Cadherin sowohl in der Probe von II-1 als auch im Kontrollgewebe normal exprimiert war. Maßstab, 25 µm.

(A) PKP2a_wt

MKHHHHHHHG AAGTSLYKKA GENLYFQGSN ADMEMTLERA VSMLEADHML
 PSRISAAATF IQHECFQKSE ARKRVNQLRG ILKLLQLLKV QNEDVQRAVC
 GALRNLVFD NDNKLEVAEL NGVPRLLQVL KQTRDLETCK QITGLLWNLS
 SNDKLNLM I TEALLTLTEN I IIPFSGWPE GDYPKANGLL DFDIFYNVTG
 CLRNMSAGA DGRKAMRRCD GLIDSLVHYV RGTIADYQPD DKATENCVCI
 LHNLSYQLEA ELPEKYSQNI YIQNRNIQTD NNSIGCFGS RSRKVKEQYQ
 DVPMPEEKS PKGVEWLWHS IVIRMYLSLI AKSVRNYTQE ASLGALQNL
 AGSGPMPTSV AQTVVQKESG LQHTRKMLHV GDPSVKKTAI SLLRNLRSNL
 SLQNEIAKET LPDLVSIIPD TVPSTDLLIE TTASACYTLN NIIQNSYQNA
 RDLLNTGGIQ KIMAIASAGDA YASNKASKAA SVLLYSLWAH TELHHAYKKA
 Q

(B) PKP2a_C752R

MKHHHHHHHG AAGTSLYKKA GENLYFQGSN ADMEMTLERA VSMLEADHML
 PSRISAAATF IQHECFQKSE ARKRVNQLRG ILKLLQLLKV QNEDVQRAVC
 GALRNLVFD NDNKLEVAEL NGVPRLLQVL KQTRDLETCK QITGLLWNLS
 SNDKLNLM I TEALLTLTEN I IIPFSGWPE GDYPKANGLL DFDIFYNVTG
 CLRNMSAGA DGRKAMRRCD GLIDSLVHYV RGTIADYQPD DKATENCVCI
 LHNLSYQLEA ELPEKYSQNI YIQNRNIQTD NNSIGCFGS RSRKVKEQYQ
 DVPMPEEKS PKGVEWLWHS IVIRMYLSLI AKSVRNYTQE ASLGALQNL
 AGSGPMPTSV AQTVVQKESG LQHTRKMLHV GDPSVKKTAI SLLRNLRSNL
 SLQNEIAKET LPDLVSIIPD TVPSTDLLIE TTASARYTLN NIIQNSYQNA
 RDLLNTGGIQ KIMAIASAGDA YASNKASKAA SVLLYSLWAH TELHHAYKKA
 Q

(C) PKP2a_S571F

MKHHHHHHHG AAGTSLYKKA GENLYFQGSN ADMEMTLERA VSMLEADHML
 PSRISAAATF IQHECFQKSE ARKRVNQLRG ILKLLQLLKV QNEDVQRAVC
 GALRNLVFD NDNKLEVAEL NGVPRLLQVL KQTRDLETCK QITGLLWNLS
 SNDKLNLM I TEALLTLTEN I IIPFSGWPE GDYPKANGLL DFDIFYNVTG
 CLRNMSAGA DGRKAMRRCD GLIDSLVHYV RGTIADYQPD DKATENCVCI
 LHNLFYQLEA ELPEKYSQNI YIQNRNIQTD NNSIGCFGS RSRKVKEQYQ
 DVPMPEEKS PKGVEWLWHS IVIRMYLSLI AKSVRNYTQE ASLGALQNL
 AGSGPMPTSV AQTVVQKESG LQHTRKMLHV GDPSVKKTAI SLLRNLRSNL
 SLQNEIAKET LPDLVSIIPD TVPSTDLLIE TTASACYTLN NIIQNSYQNA
 RDLLNTGGIQ KIMAIASAGDA YASNKASKAA SVLLYSLWAH TELHHAYKKA
 Q

(D) PKP2a_delAA

MKHHHHHHHG AAGTSLYKKA GENLYFQGSN ADMEMTLERA VSMLEADHML
 PSRISAAATF IQHECFQKSE ARKRVNQLRG ILKLLQLLKV QNEDVQRAVC
 GALRNLVFD NDNKLEVAEL NGVPRLLQVL KQTRDLETCK QITGLLWNLS
 SNDKLNLM I TEALLTLTEN I IIPFSGWPE GDYPKANGLL DFDIFYNVTG
 CLRNMSAGA DGRKAMRRCD GLIDSLVHYV RGTIADYQPD DKATENCVCI
 LHNLSYQLEA ELPEKYSQNI YIQNRNIQTD NNSIGCFGS RSRKVKEQYQ
 DVPMPEEKS PKGVEWLWHS IVIRMYLSLI AKCPQLHTRS ILRSSAEPHG
 RKWTNADISG SDSCPEGKWP AAHPKDAACW

(E) PKP2a_1487S

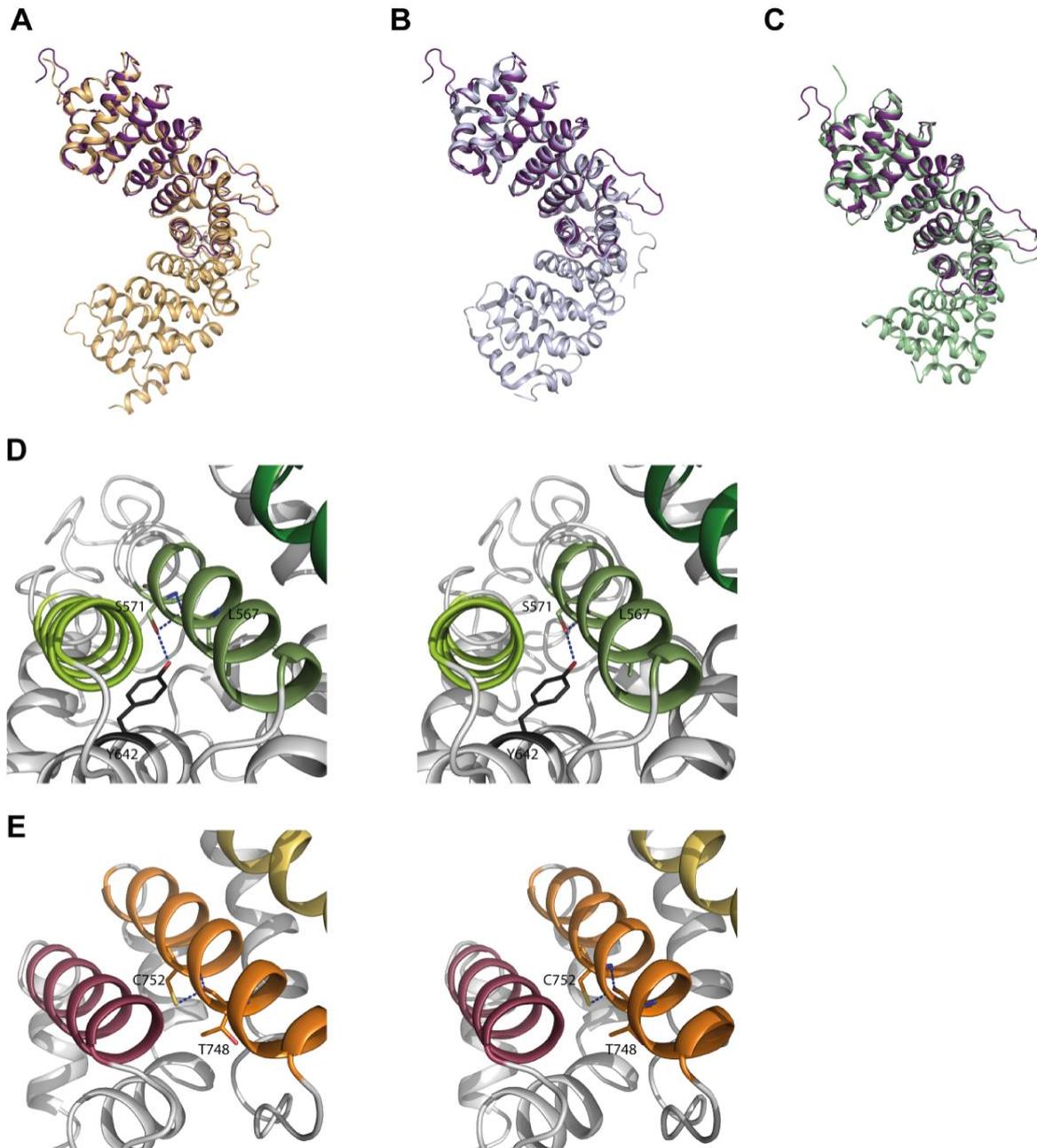
MKHHHHHHHG AAGTSLYKKA GENLYFQGSN ADMEMTLERA VSMLEADHML
 PSRISAAATF IQHECFQKSE ARKRVNQLRG ILKLLQLLKV QNEDVQRAVC
 GALRNLVFD NDNKLEVAEL NGVPRLLQVL KQTRDLETCK QITGLLWNLS
 SNDKLNLM I TEALLTLTEN I IIPFSGWPE GDYPKANGLL DFDIFYNVTG
 CLRNMSAGA DGRKAMRRCD GLIDSLVHYV RGTIADYQPD DKATENCVCI
 LHNLSYQLEA ELPEKYSQNI YIQNRNIQTD NNSIGCFGS RSRKVKEQYQ
 DVPMPEEKS PKGVEWLWHS IVIRMYLSLI AKSVRNYTQE ASLGALQNL
 AGSGPMPTSV AQTVVQKESG LQHTRKMLHV GDPSVKKTAI SLLRNLRSNL
 SLQNEIAKET LPDLVSIIPD TVPSTDLLIE TTASACYTLN NIIQNSYQNA
 RDLLNTGGIQ KIMAIASAGDA YASNKASKAA SVLLYSLWAH TELHHAYKKA
 Q

(F) PKP2a_V543I

MKHHHHHHHG AAGTSLYKKA GENLYFQGSN ADMEMTLERA VSMLEADHML
 PSRISAAATF IQHECFQKSE ARKRVNQLRG ILKLLQLLKV QNEDVQRAVC
 GALRNLVFD NDNKLEVAEL NGVPRLLQVL KQTRDLETCK QITGLLWNLS
 SNDKLNLM I TEALLTLTEN I IIPFSGWPE GDYPKANGLL DFDIFYNVTG
 CLRNMSAGA DGRKAMRRCD GLIDSLIHYV RGTIADYQPD DKATENCVCI
 LHNLSYQLEA ELPEKYSQNI YIQNRNIQTD NNSIGCFGS RSRKVKEQYQ
 DVPMPEEKS PKGVEWLWHS IVIRMYLSLI AKSVRNYTQE ASLGALQNL
 AGSGPMPTSV AQTVVQKESG LQHTRKMLHV GDPSVKKTAI SLLRNLRSNL
 SLQNEIAKET LPDLVSIIPD TVPSTDLLIE TTASACYTLN NIIQNSYQNA
 RDLLNTGGIQ KIMAIASAGDA YASNKASKAA SVLLYSLWAH TELHHAYKKA
 Q

Anhang Abbildung A5: Massenspektrometrische Analyse der aufgereinigten Armadillo Domänen des humanen PKP2 Wildtyps und diverser Varianten.

Die gesamte Domäne wurde als N-terminale His7-tag Fusionsprotein exprimiert und mittels Affinitätsbeads aufgereinigt. Die Proteine unterschieden sich in ihrer Stabilität aufgrund von unterschiedlich tragenden Mutationen. Die massenspektrometrische Analyse wurde zur Identifikation der resultierenden stabilen Fragmente der jeweiligen Proteine verwendet. Die identifizierten Peptidfragmente durch Massenspektrometrie sind in rot hervorgehoben. Mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Anja Schütz (Max-Delbrück-Centrum - AG Heinemann).



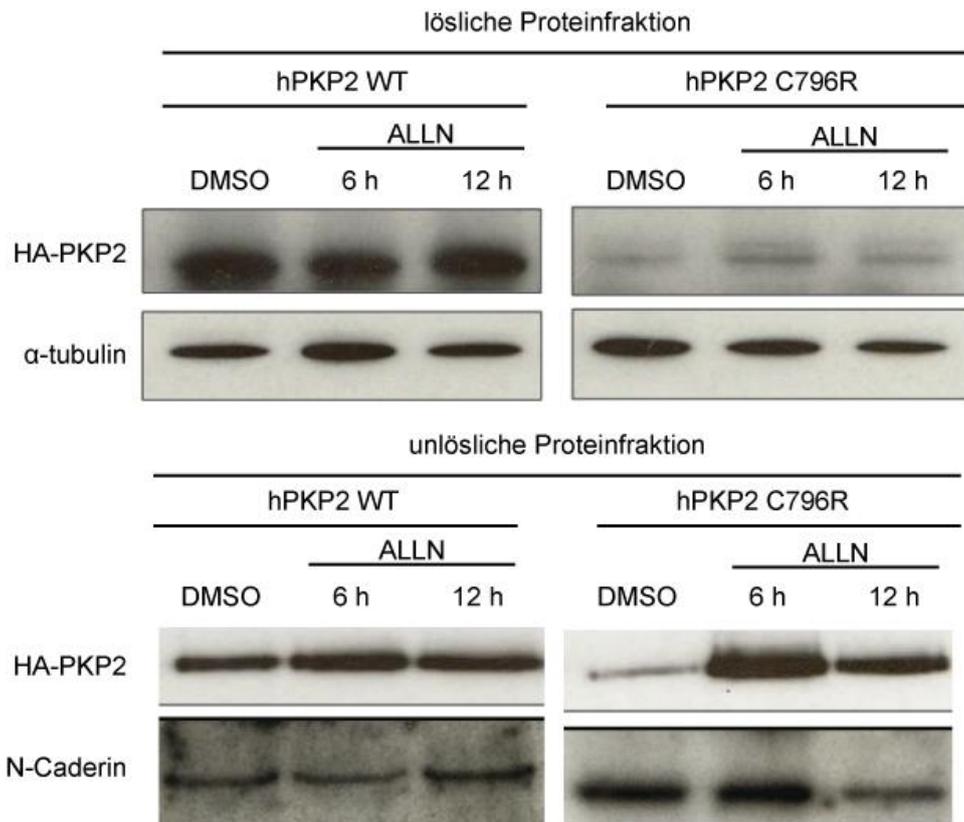
Anhang Abbildung A6: Strukturanalyse des humanen PKP2a

(A-C) Die Überlagerung der Kristallstrukturen ausgewählter Arm-Wiederholungs-Proteine. Die Kristallstruktur der Arm-Wiederholungsdomänen der humanen PKP2a C752R Variation (lila) ist überlagert mit (A) der Struktur des humanen PKP2a WT (orange), (B) humanem PKP1 (hellblau, 1xm9) und (C) humanem p120 Catenin (grün, 3l6y). Die Orientierung ist in allen Abbildungen identisch. (D) Stereo Ansicht der S571 Interaktion innerhalb der 5. Arm-Wiederholungsdomäne. (E) Stereo Ansicht der C752 Interaktion innerhalb der 8. ARM-Wiederholungsdomäne. Mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Anja Schütz (Max-Delbrück-Centrum - AG Heinemann).

		H1		H2		H3		
R1	349 --M			TLERAVSMLE	ADHML	PSRISAAATFIQHECFQ		
	243 SGL			TIPKAVQYLS	S-Q-D	EKYQAIGAYYIQHTCFQ		
R2	384 K	SEARKRVNQ	LR	GILKLLQLL	KVQN	EDVQRAVCGALRNLV		
	276 D	ESAKQQVYQ	LG	GICKLVDLL	RSPN	QNVQAAAAGALRNLV		
R3	424 FED	NDNKLEVAE	LN	GVPRLQVLKQ	TRD	LETKKQITGLLNLS		
	316 FRS	TTNKLETRR	QN	GIREAVSLLRR	TGN	AETKQQLTGLLNLS		
R4	467 SNDKL	<u>KNLMITEAL</u>		LTLTENIIPFS	GWPALLD	FDIFYNVTGCLRNS	Δ=EGDYPKANG	
	359 STDEL	<u>KEELIADAL</u>		<u>PVLADRVIIIPFS</u>	GWCAVVD	PEVFFNATGCLRNS	Δ=DGNSNMSRE	
R5	523 SAG	ADGRKAMR	RCDG	LIDSLVHYVRGTIA	DYQPDD	KATENCVCILHNLS		
	415 SAD	<u>-AGRQTMR</u>	NYSG	<u>LIDSLMAYVQNCVA</u>	ASRCDD	<u>KSVENCMCVLHNLS</u>		
insert	572	YQLEAELPEKYSQNIYIQNRNIQTDDNKSIGCFGSRSRKVKEQYQDVPMPPEKSNPKGVEWLWH						
	463	<u>YRLDAEVPTRYRQLEY-NARNAYTEKS-STGCFSNKSDKMMNNNYDCPLPEEETNPKGSGWLYH</u>						
R6	636			SIVIRMYLSLIAKS	V	RNYTQEASLGALQNLTA		
	525			<u>SDAIRTYLNLMGKS</u>	K	<u>KDATLEACAGALQNLTA</u>		
R7	668 GSG	PMPTSVAQTVVQ		KESGLQHTRKML	HVG	DPSVKKTAISLLRNLSR		
	557 SKG	<u>LMSSGMSQLIGL</u>		<u>KEKGLPQIARLL</u>	QSG	<u>NSDVVRSRGASLLSNMSR</u>		
R8	715 NLS	<u>LQNEIAKET</u>		<u>LPDLVSII</u>	PDTVPSD	LLIETTASACYTLNNTIQ		
	604 HPL	<u>LHRVMGNQV</u>		<u>FPEVTRLL</u>	TSHTGNTS	<u>NSEDILSSACYTVRNLMA</u>		
R9	761 NS	<u>YQNARDLL</u>		<u>NTGGIQKIMAISAG</u>	DAYA	<u>SNKASKAASVLLYSLWAHTELHHAYKKAQ</u>		
	650 SQ	<u>PQLAKQYE</u>		<u>SSSMLNNIINLCRS</u>	S--A	<u>SPKAAEAARLLSDMWSSKELQGVLRQQG</u>		
consensus		+ []		I [] [] L		[] [] [] NL		
β-catenin		+ []		G [] LV []		[] A [] []+ LS T A		

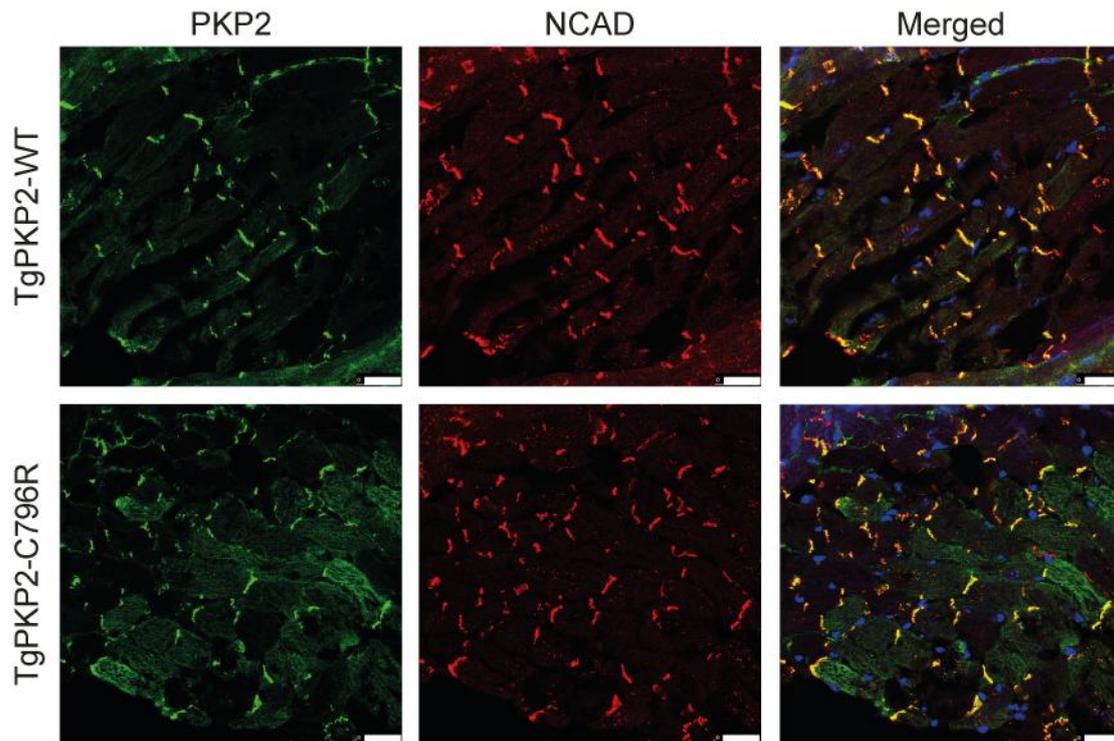
Anhang Abbildung A7: Strukturbasierte Sequenz der Gegenüberstellung von Arm-Wiederholungsdomänen des humanen PKP1 (obere Reihe) und humanen PKP2a (untere Reihe)

Die Sequenzen der Arm-Wiederholungsdomänen wurden anhand der H1-H3 Helices der jeweiligen Wiederholungen gegenübergestellt und die Konservierungen der Sequenzen dargestellt (markierte graue Aminosäurereste). Die Wiederholungsnummern und der korrespondierende Aminosäurebereich sind links vermerkt. Die sekundären Strukturelemente (humanes PKP2a) sind jeweils über der Gegenüberstellung dargestellt. Kursiv verzeichnete Aminosäurereste weichen in der PKP1 Struktur ab. Als Konsensus Positionen gelten solche spezifischen Aminosäurereste, die mindestens in zwei Drittel der Wiederholung übereinstimmen oder jeweils zwei identische Aminosäuren in mindestens vier Wiederholungen aufweisen. Konsensus Positionen mit überwiegend vielen hydrophoben Resten sind als gefüllte Boxen darstellt, die mit geringen hydrophoben Resten als offene Boxen. Die Bereiche mit generell hydrophoben Resten sind durch halbgefüllte Boxen markiert und basische Reste mit einem "+". Als Vergleich ist das Konsensus Arm-Wiederholungsmotiv von β-catenin unten aufgeführt. Konservierte Aminosäurereste, die einen Kontakt zwischen dem Einsatz und den Wiederholungen 5-7 vermitteln, sind unterstrichen. Analytierte Mutationen sind mit * (I487S, S571F, V543I, C752R) oder † (C693fsX741 = delIAA) markiert. Mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Anja Schütz (Max-Delbrück-Centrum - AG Heinemann).



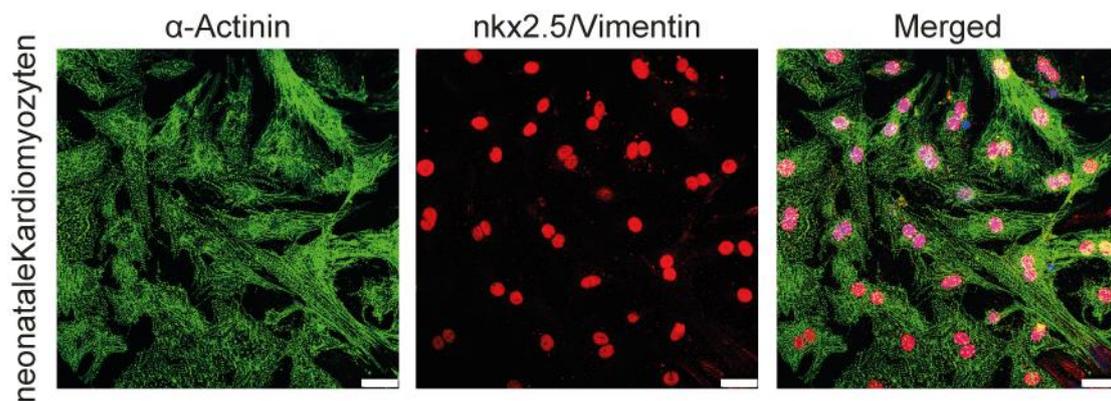
Anhang Abbildung A8: Löslichkeitstest der PKP2-C796R Mutation

Western Blot Analyse der Triton-löslichen und Triton-unlöslichen Proteinfraction von überexprimierenden HA-PKP2-WT und -C796R Proteinen in HeLaM2 Zellen in Abwesenheit (DMSO) bzw. nach zeitabhängiger Behandlung mit dem Calpain Protease Inhibitor ALLN. GAPDH bzw. N-Cadherin dienten als Lade- und Fraktionierungskontrolle. Das mutierte HA-PKP2-C796R Protein konnte nach 6 h Behandlung mit dem Calpain Inhibitor ALLN ausschließlich in der Triton-unlöslichen Proteinfraction stabilisiert werden. Der Calpain Inhibitor hatte keinen Einfluss auf den PKP2-WT.



Anhang Abbildung A9: Proteinexpression im transgenen PKP2 Mausmodell

Repräsentative Immunofluoreszenz Färbungen von kardialen Kryo-Schnitten der TgPKP2-WT und TgPKP2-C796R Linien. Das Expressionsmuster des endogenen PKP2 zeigte im TgPKP2-C796R keine Intensitäts- oder Lokalisationsveränderungen, verglichen mit dem TgPKP2-WT. Maßstab, 25 µm.



Anhang Abbildung A10: Reinheitsgrad der Kardiomyozyten

Repräsentative Immunofluoreszenz Färbungen neonatalen Kardiomyozyten sieben Tage nach Isolation. Die kardialen Proteinmarker α-Actinin (grün) und nkx2.5 (rote Kernfärbung) veranschaulichen den fast 100 %igen Reinheitsgrad der isolierten Kardiomyozyten. Maßstab, 25 µm.

Anhang Tabelle A1: Evolutionäre Konservierung und *in silico* Bewertung von humanen PKP2 Variationen

AA Austausch	Nukleotid Substitution	Änderung der Polarität		H.sapiens	P.troglodytes	M.mullatta	B.taurus	C.familiaris	M.musculus	G.gallus		PolyPhen	PANTHER	SIFT
S140F	419C>T	+		S	S	S	F	S	S	T		B	-	B
V587I	1759G>A	-		V	V	V	V	V	V	V		B	U	D
S615F	1844C>T	+		S	S	S	S	S	S	S		D	D	D
K654Q	1960A>C	-		K	K	K	K	K	K	K		PD	D	D
C796R	2386T>C	+		C	C	C	C	C	C	C		D	D	D

B = Benign (gutartig) / D = Damaged (schadhaft) / U = Unknown (unbekannt) / PD = Potential Damaged (potentiell schadhaft)

Anhang Tabelle A2: Datensammlung und Details des kristallisierten PKP2a-C752R Proteins

PKP2a arm_C752R	
Datensammlung	
Wavelength [Å]	0.91841
Resolution [Å]	35.00 - 1.55
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit-cell parameters [Å]	a = 46.35, b = 63.04, c = 74.95
Measured reflections	136,879 (9,044)
Unique reflections	32,363 (2,304)
R _{meas} [%]	7.1 (58.4)
Completeness [%]	99.4 (98.3)
<I>/<σ(I)>	17.9 (2.9)
Wilson B-factor [Å ²]	20.19
Refinement	
Resolution range [Å]	33.42 - 1.55 (1.59 – 1.55)
R _{cryst}	0.159
R _{free} (test set of 5%)	0.191
No. of non-H atoms	
protein	1892
glycerol	12
water	283
Average isotropic B-factor [Å ²]	
main chain	9.2
side chain	11.9
glycerol	24.5
water	26.1
Rmsd for bond lengths [Å]	0.015
Rmsd for bond angles [°]	1.567
Ramachandran regions	
Most favorable [%]	99.1
Allowed [%]	0.9
Outliers [%]	---

Anhang Tabelle A3: Ergebnisse der Echokardiographie von TgPKP2-C796R nach 12 Wochen

Messparameter	rtTA (n=3)	rtTA/TgPKP2 C796R (n=5)
IVSd [mm]	1,03 ± 0,06	0,96 ± 0,02
LVPWd [mm]	1,04 ± 0,05	0,95 ± 0,02
IVS sys [mm]	1,40 ± 0,02	1,27 ± 0,06
LVPW sys [mm]	1,41 ± 0,03	1,26 ± 0,06 *
LVd [mm]	3,74 ± 0,09	4,08 ± 0,10
LV sys [mm]	2,32 ± 0,12	2,77 ± 0,09 *
FS [%]	38,08 ± 1,68	31,93 ± 2,38
Trace EF [%]	6,44 ± 2,40	60,68 ± 2,50
Stroke Volume [ul]	32,37 ± 1,57	19,60 ± 2,50
Heartrate	369,67 ± 25,51	355,20 ± 44,29
Cardiac output [ml/min]	7,84 ± 0,39	6,53 ± 1,17
LV Mass [mg]	151,46 ± 17,50	154,56 ± 7,57
Heart / Body	6,36 ± 0,68	6,82 ± 0,44
Bodyweight [g]	23,77 ± 0,37	22,74 ± 0,41

* p < 0,05

8. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
α -MHC	alpha-Myosin-Heavy-Chain (Myosinschwerkette)
“-“	negativ
“+“	positiv
A	Adenin
ACM	arrhythmogene Kardiomyopathie
ALLN	Acetyl-Leu-Leu-Norleucinol
AnkG	zytoskelettaler Adapterprotein AnkyrinG
APS	Ammoniumpersulfat
AraC	Cytosin Arabinosid
Arm	Armadillo
ARVC	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
AS	Aminosäure
b2m	beta-2-Mikrotubulin
BDM	2,3-Butadienon monoxime
BFA	Brefeldin A
BIM	Bisindolylmaleimide
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin (Nukleinsäure); Cystein (Aminosäure)
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CAR	Zelladhäsions -Erkennungsstelle
cDNA	Complementary DNA
Ci	Curie
CMV	Cytomegalo-Virus
CPVT	Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia
cTnT	cardiac troponinT
C _T -Wert	Cycle of Threshold (Schwellenwert)
Cx43	Connexin 43
DAG	Second messenger Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dd	Doppelt destilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DOC	Dioxycholinsäure
Dox	Doxycyclin
DSC2	Desmocollin-2
DSG2	Desmoglein-2
DSP	Desmoplakin
DTD	Desmoglein terminale Domäne
DTT	Dithiothreitol

Dvl	dishevelled
E.coli	Escherichia coli
EA	Extrazelluläre Ankerdomäne
EC	Extrazelluläre Domäne
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ejection Fraction; Endotoxin frei
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktors
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
EKG	Echokardiogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
F	Phenylalanin
FKS	Fetales Kälberserum
for	forward (vorwärts)
FRT	Erkennungsstelle der Rekombinase Flippase
FS	Fractional Shortening
G	Guanin
G418 Sulfat	Geneticindsulfat
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GSK3 $\alpha\beta$	Glykogen Synthase Kinase 3 alpha/beta
GSR	Glycin-Serin-Arginin
h	human
H1-H3	Helices in Arm-Wiederholungs-Domäne
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
HS	Horse Serum (Pferdeserum)
I	Isoleucin
IA	intrazellulärer Anker
ICD	implantierbarer Kardioverter- Defibrillator
ICS	interzelluläre Cadherin-ähnliche Sequenz
IDP	innere intrazelluläre Plaque
IF	Intermediärfilamente
IgG	Immunoglobulin G
IP	Immunopräzipitation
IPL	intrazellulär Prolin-reicher Linker
IPTG	Isopropyl-1-thio-D-galactopyranosid
IVS sys	Interventrikuläres Septum systolisch
IVSd	Interventrikuläres Septum diastolisch
JUP	Plakoglobin
K	Lysin
kB	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KO	Knockout
kV	Kilovolt

L	Leucin
LB	Luria-Bertani
LEF	Lymphoid enhancer factor
LTQ	Linear Trap Quadrupole
LV	Linker Ventrikel
LV sys	Linker Ventrikel systolisch
LVd	Linker Ventrikel diastolisch
LVPW sys	left ventricular posterior wall systolic
LVPWd	left ventricular posterior wall diastolisch
m	murin
M	Methionin
MAPK	klassische mitogen- aktivierte Proteinkinase
MEM	Modified Eagle Medium
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NCAD	N-Cadherin
NEAA	Non Essential Amino Acids
OD	Optische Dichte
ODP	äußerer Plaque
p	Phospho
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline tween
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEI	Polyethylenimine
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	Pyrococcus furiosus
PKA	Proteinkinase A
PKB	Protein Kinase B
PKC	Protein Kinase C
PKP2	Plakophilin 2
PM	Plasmamembran
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Q	Glutaminsäure
R	Arginin
R1-R9	Arm-Wiederholungs-Domänen
RA	Rechtes Atrium
rev	Reverse (rückwärts)
RNA	Ribonukleinacid (säure)
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse-Transkriptase PCR
rtTA	Tetracyclin-kontrolliertes Transaktivatorprotein
RUD	Wiederholungsdomäne/ repeated unit domain
RV	Rechter Ventrikel
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard Error of the Mean
siRNA	small interference (kurz interferierende) RNA
SOB	Super Optimal Broth
SOC	Super Optimal Catabolite repression
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TBST	Tris-buffered Saline Tween
TCF	T-cell factor
TdT	Terminal deoxynucleotidyl Transferase
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Temp	Temperatur
tetO	Tet Operatorsequence
TetR	Tet Repressor
TFC	Task-Force-Kriterien
TM	Transmembrandomäne
TMEM43	Transmembrane protein 43
TRE	Tetracyclin-gesteuerten Promotorelement
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTE	Tris/taurine/ETDA
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
U	Units (Einheit)
u.a.	unter anderem
ÜN	Übernachtkultur
UPR	Unfolded Protein Response
UPS	Ubiquitin Proteasom System
UTR	untranslatierte Region
UV/VIS	Ultraviolett/Visuell
V	Valin
VES	Extrasystolen
VGSC	Natriumkanalkomplex
VIM	Vimentin
VUS	Varianten mit unbekannter Signifikanz
Wnt	wingless-Glycoprotein
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel

Maßeinheiten wurden entsprechend der Nomenklatur des SI (Système international) angegeben.

9. Publikationsliste und Kongressbeiträge

Folgende Publikationen sind bisher aus dieser Arbeit hervorgegangen:

Molecular Insights into Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Caused by Plakophilin-2 Missense Mutations

Kirchner E, Schuetz A, Boldt LH, Martens K, Dittmar G, Haverkamp W, Thierfelder L, Heinemann U, Gerull B

Im Revisionsverfahren bei Circulation: Cardiovascular Genetics (Stand: März 2012)

Folgende Kongressbeiträge sind bisher aus dieser Arbeit hervorgegangen:

Molecular characterization of plakophilin-2 mutations suggests the involvement of proteolytic degradation in the disease process of ARVC

Kirchner E, Schuetz A, Heuser A, Heinemann U, Thierfelder L, Gerull B

Annual Scientific Sessions of American Heart Association (AHA) in Orlando, Florida, USA, 2009

Weitere Publikationen:

Stress-induced dilated cardiomyopathy in a knock-in mouse model mimicking human titin-based disease

Gramlich M, Michely B, Krohne C, Heuser A, Erdmann B, Klaassen S, Hudson B, Magarin M, Kirchner E, Todiras M, Granzier H, Labeit S, Thierfelder L, Gerull B. J Mol Cell Cardiol. 2009; 47:352-358.

Weitere Kongressbeiträge:

A founder mutation in desmocollin-2 causes a predominant left ventricular arrhythmogenic cardiomyopathy in homozygous carriers in a Hutterite population

Brenda Gerull, Florian Kirchner, Oliver Strohm, Matthias Friedrich and Henry Duff

Annual Scientific Sessions of American Heart Association (AHA) in Orlando, Florida, USA, 2011

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Ludwig Thierfelder bedanken, der es mir ermöglicht hat, an diesem faszinierenden Thema der ARVC zu forschen. Während meiner Promotionszeit hat er mich stets mit seinem wissenschaftlichen Rat unterstützt.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Brenda Gerull. Durch Ihre offene Art und Ihren Anspruch hat Sie mich immer motiviert und gefördert. Mit ihren wertvollen Ratschlägen und Ideen trug sie maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Frau Professor Dr. Constance Scharff danke ich für die universitäre Betreuung meiner Dissertation und die Übernahme des Gutachtens. Des Weiteren bedanke ich mich für ihre vielen Anregungen im Rahmen des PhD Project Committees des Max-Delbrück Centrums.

Ich bedanke mich darüber hinaus ganz herzlich bei Iska Liebner. Ihre Erfahrung und Hilfsbereitschaft waren immer eine wichtige Stütze für mich.

Vor allem möchte ich meinen Doktorandenkollegen für die vielen anregenden Diskussionen auf dem gemeinsamen Weg danken: Robert, Manuela, Maria, Ute, Timm und Susanne.

Der gesamten Arbeitsgruppe Thierfelder danke ich herzlich für die Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Dieser Dank geht an Arnd, Bea, Florian, Frieda, Jana, Jörg, Maik, Martin, Patrick, Sabine, Steffi B, Steffi S.

Meinen Kooperationspartner Dr. Anja Schütz (AG Heinemann), Dr. Leif-Hendrik Boldt (Klinikum Virchow) und Dr. Boris Jerchow (TCF-MDC) danke ich für die gute und freundliche Zusammenarbeit.

Ganz persönlich möchte ich besonders meinen Eltern, zukünftigen Schwiegereltern, Großeltern, meinem Bruder Daniel und meinen Freunden für ihre unendliche Unterstützung danken.

Der größte private Dank gilt meiner Verlobten Marleen! Deine Liebe war immer Halt und Motivation.

Danke!

11. Erklärung

Die dieser Dissertation zugrunde liegenden Arbeiten wurden am Max-Delbrück-Centrum in Berlin in der Zeit vom 01. Januar 2007 bis zum 30. November 2011 durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 22. Oktober 2012

Florian Kirchner