

2. Grundlagen

2.1. Plakophilin 4

2.1.1. Aufbau

Armadillo Repeat Proteine sind charakterisiert durch eine zentrale Domäne, die sich aus einer variablen Anzahl von arm (Armadillo) repeats zusammensetzt. Diese Wiederholungen von bis zu 45 Aminosäuren wurden ursprünglich als Bestandteil eines Gens von *Drosophila melanogaster* identifiziert, welches in der wingless (wnt) Signalkette involviert ist (Peifer, 1995; Peifer et al., 1994b; Peifer et al., 1990). Bei Mutation dieses Gens zeigte sich bei den Fliegen eine Fehlanordnung des Borstenwuchses auf den einzelnen Segmenten des Körpers.

Bekannte Proteine der Armadillo Familie in höheren Organismen sind unter anderem Plakoglobin (γ -Catenin), β -Catenin, B6P/ Plakophilin und p120. Sie erfüllen unterschiedlichste Funktionen wie z.B. die Stabilisierung von Zellkontakten, Kontrolle in der Embryogenese, Tumorprogression, Kernimport und Signaltransduktion (Hulsken et al., 1994; Kussel et al., 1995; Torok et al., 1995)

Plakophilin 4 (p0071, PKP4) wurde 1996 erstmals als ein weiteres Mitglied der Armadillo Protein Familie entdeckt und charakterisiert (Hatzfeld und Nachtshiem, 1996). Plakophilin 4 hat ein Molekulargewicht von 135 kDa und besteht aus 1211 Aminosäuren, welche sich in drei Domänen unterteilen lassen. Die zentrale, 480 Aminosäuren umfassende Armadillo Repeat Region des Proteins weist einen hohen Verwandtschaftsgrad zu NPRAP (Paffenholz et al., 1997), p120 (Peifer et al., 1994a) und ARVCF auf, während zu anderen Mitgliedern der Familie wie Plakoglobin, β -Catenin, pendulin/ importin (Kussel und Frasch, 1995; Weis, 1995) und APC (Rubinfeld et al., 1993) nur eine geringe Sequenzhomologie besteht.

Die amino-und carboxyterminalen Enden des Plakophilin 4 weisen keinerlei sequenzielle Ähnlichkeiten zu den genannten Mitgliedern der Armadillo Protein Familie auf (Hatzfeld und Nachtshiem, 1996).

Das Plakophilin 4 Gen ist sowohl beim Menschen, wie auch in der Maus auf Chromosom 2 lokalisiert (www.ensembl.org/). Die sequenzielle Homologie der Nukleinsäuren der RNA beider Organismen beträgt 91,04 Prozent, auf Ebene der DNA gleicht sich die Folge der Aminosäuren sogar in bis zu 95,71 Prozent (www.genecards.org).

2.1.2. Funktion

Plakophilin 4 (p0071, PKP4) dient als Komponente verschiedener Zell-Zellverbindungen in einer Vielzahl von Geweben wie Herz, Haut, Skelettmuskel, Lunge, Milz, Gehirn, Uterus, Niere, Leber und Gastrointestinaltrakt (Hatzfeld et al., 2003; Hatzfeld und Nachtsheim, 1996).

Plakophilin 4 weist eine stärkere Sequenzhomologie mit Armadillo Proteinen wie p120, δ -Catenin und ARVCF als zu anderen Plakophilinen auf.

Die Plakophiline 1-3 sind an der Bildung von Zellkontakten über Desmosome beteiligt, wohingegen Proteine wie p120 und β -Catenin ausschließlich in *Adherens Junctions* zu finden sind. Plakophilin 4 hingegen konnte sowohl in Desmosomen wie auch in *Adherens Junctions* nachgewiesen werden (Hatzfeld et al., 2003). Damit ist es neben Plakoglobin das einzige bisher bekannte Protein, welches die Fähigkeit besitzt, zum einen in *Adherens Junctions* Actinfilamente an die klassischen Cadherine zu binden und zum anderen auch Intermediärfilamente an desmosomale Cadherine wie Desmoglein und Desmocollin zu koppeln.

Zudem konnte Plakophilin 4 punktuell auch im Nukleus der Zellen nachgewiesen werden, was die Vermutung nahe legt, dass ihm, ebenso wie Plakoglobin auch Aufgaben der Signaltransduktion und Zellregulation zukommen. Im Überexpressionsexperiment konnte ein Rückgang der Anzahl an Desmosomen gemessen werden, wodurch ein regulatorischer Einfluss von p0071 auf Anzahl und Größe der *Adherens Junctions* und der Desmosomen wahrscheinlich wird (Hatzfeld et al., 2003). In einer weiterführenden Studie wurde bei Überexpression von p0071 in A431 Epithelzellen ein deutlicher Rückgang der Desmosomen beobachtet. Die Intermediärfilamente zogen sich von der Membran zurück, die Desmoplakin- und Plakoglobingehalte nahmen stark ab. Im Gegensatz dazu waren in diesen Zellen vermehrt *Adherens Junctions* ausgebildet, Cadherine wurden verstärkt zur Bildung an die Zellmembran gezogen. Die Tatsache, dass ein erhöhter Plakophilin Gehalt nicht nur die Anzahl und Stabilität der desmosomalen Strukturen beeinflusst, sondern gleichzeitig den Zellzusammenhalt durch Stärkung der *Adherens Junctions* gewährleistet, macht deutlich, dass dem p0071 eine essentielle regulatorische Bedeutung zukommt. Des Weiteren konnte im *in vitro* Experiment eine gestörte Wundheilung in A431 Epithelzellgeweben mit erhöhtem Plakophilinspiegel beobachtet werden. Neben dem Zusammenhalt von Zellen und der Regulation der Adhäsionskontakte kommt es bei hohem exogenen Gehalt an Plakophilin 4 zu einer herabgesetzten Zellmotilität und somit zu einer stark verzögerten Wundheilung (Setzer et al., 2004).

Tabelle 1 gibt einen Überblick über bisher bekannte Interaktionspartner und mögliche Funktionsweisen von Plakophilin 4.

Proteinpartner	Bindungsstelle an Plakophilin 4	Funktion der Verbindung	Quelle
N-Cadherin	Armadillo repeat Region	Zelladhäsion in <i>Adherens Junctions</i>	(Hatzfeld et al., 2003)
E-Cadherin	Armadillo repeat Region	Zelladhäsion in <i>Adherens Junctions</i>	(Hatzfeld et al., 2003; Hatzfeld und Nachtsheim, 1996)
VE-Cadherin	Armadillo repeat Region	Zelladhäsion in <i>Adherens Junctions</i>	(Calkins et al., 2003)
OB-Cadherin	Armadillo repeat Region	Zelladhäsion in <i>Adherens Junctions</i>	(Hatzfeld et al., 2003)
Desmocollin	Amino-terminales Ende	Zelladhäsion in Desmosomen	(Hatzfeld et al., 2003)
Desmoplakin	Amino-terminales Ende	Zelladhäsion in Desmosomen	(Calkins et al., 2003; Hatzfeld et al., 2003)
Plakoglobin	Amino-terminales Ende und Armadillo repeat Region	Formation und Regulation von Desmosomen und <i>Adherens Junctions</i>	(Hatzfeld et al., 2003)
Erbin	Carboxy-terminales Ende	Zellintegrität in Epithelzellen	(Jaulin-Bastard et al., 2002)
Papin	Carboxy-terminales Ende	Funktion unklar, Onkogenese	(Ohno et al., 2002)

Tabelle 1:
Bisher bekannte Interaktionspartner von Plakophilin 4 und deren mögliche Funktionsweisen

2.2. Zelladhäsion

Spezialisierte Zellverbindungen finden sich an vielen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontaktstellen in allen Geweben. Ihrer Funktion nach lassen sie sich in drei Klassen unterteilen:

Undurchlässige Verbindungen, die Zellen in einer Epithelzellschicht so zusammenhalten, dass selbst kleinste Moleküle nicht zwischen den Schichten diffundieren können. Den sogenannten *Tight Junctions* kommt bei der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion zwischen Epithelien, die Flüssigkeiten unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung trennen, eine wichtige Funktion zu. *Tight junctions* verhindern z.B. im Darm die einfache Diffusion kleiner

Moleküle und ermöglichen so einen selektiven Nährstofftransport über selektive Transportproteine.

Stabile Haftverbindungen zwischen Zellen erfolgen über *Adherens Junctions*, gürtelförmige Kontakte, welche die Aktinfilamente benachbarter Zellen miteinander verknüpfen oder über Desmosomen, punktförmige Adaptationen der Intermediärfilamente zweier Zellen. Diese Adhäsion der Zellen wird durch Mitglieder der Cadherin Familie vermittelt. Während in *Adherens Junctions* vor allem klassische Cadherine (z.B. E- und N-Cadherine) zu finden sind, enthalten Desmosome zwei unterschiedliche, den Cadherinen sequenziell verwandte Proteine, das Desmoglein und Desmocollin. Cadherine sind Glycoproteine und bilden Dimere innerhalb der Zellmembran. Ein Dimer einer Zelle bindet in Form eines Reißverschlusses an ein Dimer einer benachbarten Zelle. Die interzelluläre Domäne der Cadherine interagiert mit einer Vielzahl zytoplasmatischer Proteine (z.B. Catenine), welche die Kopplung an die Aktin- bzw. Intermediärfilamente herstellen.

Kommunizierende Verbindungen ermöglichen über kanalbildende Proteine die Passage chemischer oder elektrischer Signale von Zelle zu Zelle. *Gap junctions* bestehen aus Transmembranproteinen, welche die Connexons bilden. Wenn die Connexons in den Plasmamembranen zweier angrenzender Zellen einander gegenüberstehen, bilden sie einen durchgehenden Kanal, der die beiden Zellinnenräume verbindet. Jedes Connexon wiederum besteht aus sechs Untereinheiten, den sogenannten Connexinen, welche über jeweils vier α -Helices in der Zellmembran verankert sind.

2.2.1. Desmosomen

Desmosomen kommen gehäuft in Herzmuskelzellen und in Epithelzellen vor. Hier bilden sie symmetrische Plaques, die mehrere Mikrometer im Durchmesser und ca. 100 nm dick sind. Jede Hälfte der Desmosomen ist abgeleitet von einer benachbarten Zelle, in welcher Intermediärfilamente einen Anker durch die zytoplasmatische Peripherie zu bilden scheinen (Kelly, 1966).

Im Gegensatz zu den klassischen Cadherinen in *Adherens Junctions* bilden die desmosomalen Cadherine heterotypische Interaktionen zur Anheftung der Intermediärfilamente aus. Die Bindung der Cadherine an Desmoplakin und somit an die Intermediärfilamente der Zelle kann über eine Vielzahl verschiedener Proteine vermittelt werden. Als Mitglied der Familie der zytoskelettalen Adhäsionsproteine verbindet Plakoglobin die interzelluläre Domäne der desmosomalen Cadherine mit Desmoplakin. Die Anheftung des Plakoglobin an Desmoplakin erfolgt über die amino-terminale Region des Desmoplakin, welches wiederum über sein carboxy-terminales Ende fest an die Intermediärfilamente adaptiert ist (Stappenbeck et al., 1993; Stappenbeck et al., 1994).

Eine direkte Interaktion zwischen Desmoplakin und den desmosomalen Cadherinen wurde *in vitro* beschrieben (Smith et al., 1998), jedoch war *in vivo* nur eine Anheftung der Proteine mittels Plakoglobin nachvollziehbar (Kowalczyk et al., 1996; Kowalczyk et al., 1997).

Als weitere Komponenten des desmosomalen Plaques wurden die Plakophiline beschrieben. Plakophilin 2 scheint ubiquitär in den Desmosomen zahlreicher Gewebe vorzukommen, wohingegen Plakophilin 1 und 3 vor allem in Epithelien zu finden sind. Ähnlich dem Plakoglobin können die Plakophiline als Bindeglied zwischen Desmoplakin und den desmosomalen Cadherinen fungieren.

Als Mitglied der Armadillo Repeat Familie weist Plakophilin 4 größere Homologie zu Proteinen wie p120, ARVCF und NPRAP/ δ -Catenin auf und ist deshalb mit diesen zu einer Subfamilie zusammengefasst. Diese Proteine sind charakterisiert als Bindeglieder bei der Bildung von Adherens Junctions. Im Gegensatz dazu wird Plakophilin 4 jedoch neben Plakoglobin als einziges bisher bekanntes Protein sowohl in Desmosomen als auch in Adherens Junctions gefunden. In Desmosomen bindet es über seine amino-terminale Region an die desmosomalen Proteine und somit an Desmoplakin.

2.2.2. Adherens Junctions

Adherens Junctions sind ebenso wie die Desmosomen für die Zell-Zell-Adhäsion verantwortlich. Im Gegensatz zu den Desmosomen handelt es sich bei den *Adherens Junctions* um gürtelförmig angeordnete Zellkontakte welche die Actinfilamente benachbarter Zellen indirekt miteinander verbinden.

Bei der Bildung von *Adherens Junctions* handelt es sich um eine Folge strengregulierter Abläufe. Durch Bindung von β -Catenin an das Carboxylende eines der klassischen Cadherine wird der Transport des Cadherins durch den secretory pathway bewirkt. Sobald der Cadherin- β -Catenin-Komplex die Plasmamembran erreicht hat, kann sich cytosolisches α -Catenin über β -Catenin an die Adhäsionsproteine annectieren. α -Catenin wiederum fungiert als Bindeglied des Komplexes an Aktinfilamente der Zelle. Die Anheftung kann entweder direkt oder auf indirektem Wege über die Bindung von Vinculin und VASP erfolgen. Aufgrund hoher sequentieller Homologie zwischen β -Catenin und Plakoglobin stehen diese beiden Proteine im Wettbewerb um die Bindungsstelle am Cadherin. So kann ein hoher Gehalt an exogenem Plakoglobin dazu führen, dass endogenes β -Catenin von den *Adherens Junctions* verdrängt und proteasomal degradiert wird (Salomon et al., 1997).

Ein weiteres Catenin mit der Fähigkeit zur direkten Bindung an die klassischen Cadherine ist p120 (Reynolds et al., 1994). Im Gegensatz zu β -Catenin und Plakoglobin (γ -Catenin) bindet p120 an die juxtamembrane Region des Cadherins, welche eine wichtige Rolle bei der Regulation der Adhäsion spielt. An gleicher Stelle binden auch weitere Proteine der

Armadilloprotein Subfamilie wie ARVCF und NPRAP/ δ -Catenin an Cadherine, jedoch liegen sie in weit geringerer Konzentration vor und ihre Funktion ist noch weitgehend unklar (Kaufmann et al., 2000; Lu et al., 1999; Mariner et al., 2000; Paulson et al., 2000; Waibler et al., 2001).

Als viertes Mitglied der Subfamilie verfügt Plakophilin 4 ebenfalls über die Fähigkeit an die juxtamembrane Domäne der nichtdesmosomalen Cadherine zu binden. In hoher Konzentration steht exogenes Plakophilin 4 mit p120 im Wettbewerb um die Bindungsstelle in Adherens Junctions. Ein hohes Niveau an exogenem Plakophilin 4 fördert den Transport klassischer Cadherine zur Plasmamembran und bewirkt gleichzeitig die Verdrängung desmosomaler Proteine. Somit ist denkbar, dass das Level der Plakophilin 4 Expression nicht nur die intrazelluläre Lokalisation des Proteins bestimmt, sondern auch die Größe und Anzahl der Ausbildung von Desmosomen und *Adherens Junctions* beeinflusst (Hatzfeld et al., 2003).

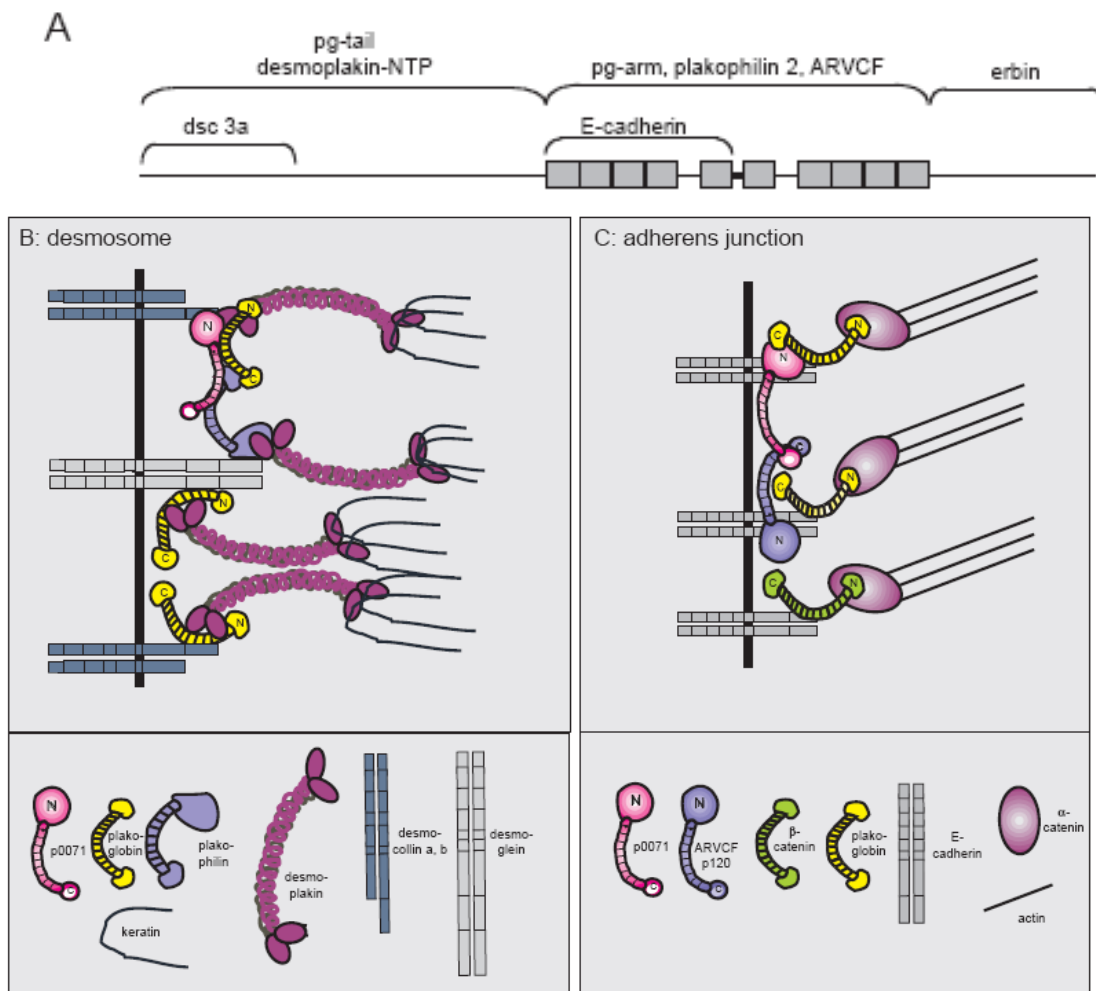


Abbildung 1:
(A) Bindungsstellen der Zellkontaktproteine am p0071 Molekül. **(B,C)** graphische Darstellung der p0071 Interaktionen in Desmosomen **(B)** und Adherens Junctions **(C)**. (Hatzfeld et al., 2003)

2.2.3. Intercalated Discs

Der Zusammenhalt der Kardiomyozyten erfolgt über die Glanzstreifen, die sogenannten *Intercalated Discs* (ICD). Die *Intercalated Discs* setzen sich aus drei separaten Zellverbindungen zusammen; den *Adherens Junctions*, den Desmosomen und den *Gap Junctions*. Alle drei Formen der Zelladhäsion werden in vielen Geweben des Körpers gefunden und sind keinesfalls als eine Besonderheit des Herzmuskels anzusehen.

Einzigartig am Zusammenhalt der Kardiomyozyten über *Intercalated Discs* ist jedoch die Lokalisation an den beiden Zellpolen und die duale Funktion, die der Zellkontakt im Herzmuskel erfüllt. Lange Zeit wurde angenommen, dass sich die in den ICDs enthaltenen Desmosomen und *Adherens Junctions* in ihrer molekularen Zusammensetzung nicht von denen in Epithelien unterscheiden. Neuere Studien lassen jedoch vermuten, dass, anders als zwischen epithelialen Zellen, im Myokard desmosomale Proteine auch am Zusammenhalt von *Adherens Junctions* beteiligt sind. Dies konnte anhand von Immunelektronenmikroskopie mit Hilfe spezifischer Antikörper für Desmoplakin, Plakoglobin, Plakophilin 2, Desmocollin 2 und Desmoglein 2 nachgewiesen werden (Franke et al., 2006). Mutationen in Genen, welche für genannte Proteine kodieren, verursachen zum Teil schwerwiegende kardiale Defekte. Unter der Annahme, dass desmosomale Proteine im Herzen nicht nur am strukturellen Zusammenhalt in Desmosomen, sondern auch an *Adherens Junctions* beteiligt sind, ließen sich die oft schweren strukturellen und funktionellen Störungen erklären.

Wie im Epithelgewebe fällt den *Adherens Junctions* und den Desmosomen auch im Herzen die Aufgabe des mechanischen Zusammenhalts der Zellen zu. Die *Gap Junctions* ermöglichen den Ionenaustausch zwischen benachbarten Zellen und erlauben somit die Weiterleitung elektrischer Impulse von Zelle zu Zelle. Durch dieses Zusammenspiel wird die außergewöhnliche Bedeutung eines stabilen Zell-Zusammenhaltes in Kardiomyozyten deutlich. Eine Störung der Ultrastruktur der Zelladhäsionskontakte verhindert die Weiterleitung der Aktionspotentiale über die *Gap Junctions*. Die elektrische Impulsleitung des Herzen ist gestört, es kommt zu Arrhythmien und *re-entry* Phänomenen.

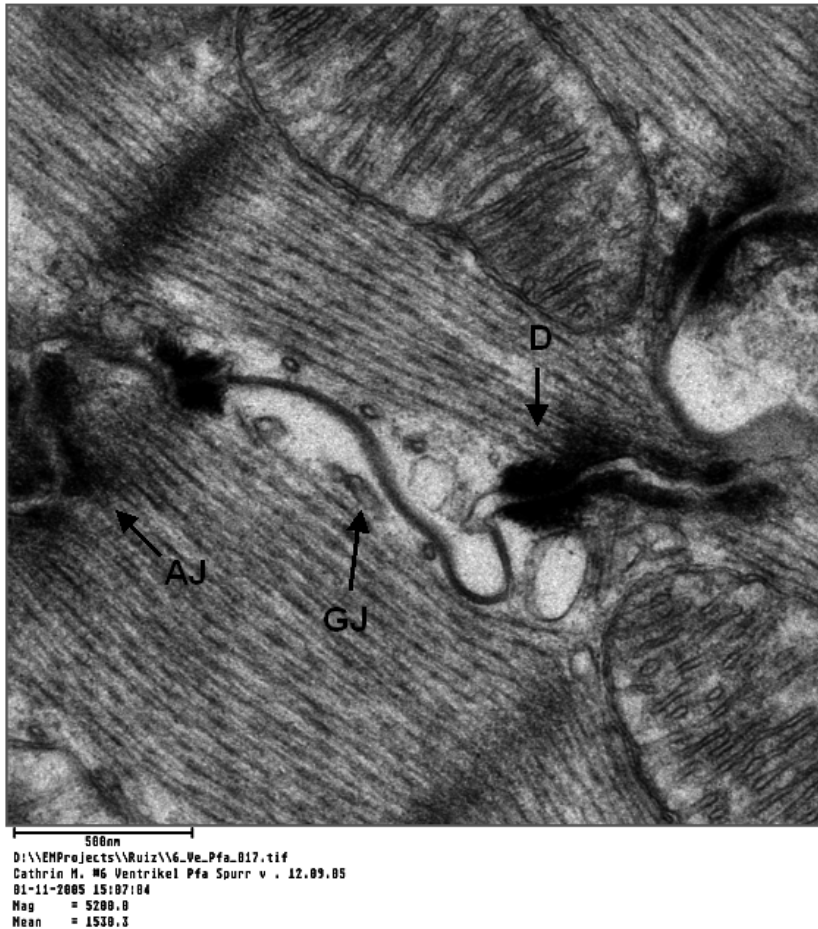


Abbildung 2:
Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Intercalated Disc (Vergrößerung x 500)
D: Desmosom; **AJ:** Adherens Junction; **GJ:** Gap Junction

Demzufolge sind diese drei strukturellen Elemente der *Intercalated Discs* wichtig für den stabilen Zusammenhalt und die Weiterleitung der elektrischen Impulse zwischen Kardiomyozyten und sind somit essentielle Bausteine für die Funktion des Herzens.

Es wurden in der Vergangenheit bereits zahlreiche Maus-Knockoutlinien verschiedenster Proteine, die eine Rolle im Zusammenhalt der *Intercalated Discs* spielen, generiert, wobei alle Linien sich als embryonal letal erwiesen (**Tabelle 2**).

Protein	Phänotyp	Ultrastruktur	Quelle
N-Cadherin	Embryonal letal an E10, Adhäsionsdefekt, gestörte Herzentwicklung	Schwächere Aggregation*	(Radice et al., 1997)
α E-Cadherin	Zerstörung des Trophoblasten	n.b.	(Torres et al., 1997)
β -Catenin	Embryonal letal an E7, keine Formation des Mesoderm	n.b.	(Haegel et al., 1995)
Plakoblobin	Embryonal letal an E10.5 oder E12-16, Herz-/ Hautdefekte	Gestörte Zelladhäsion*	(Bierkamp et al., 1996; Ruiz et al., 1996)
Desmoplakin	Embryonal letal an E6.5, generelle Zelladhäsionsdefekte	n.b.	(Gallicano et al., 1998)
Plakophilin 2	Embryonal letal an E10.5, Herzdefekte	Gestörte Zelladhäsion	(Grossmann et al., 2004)
Vinculin	Embryonal letal an E9.5, Herz- und Gehirndefekte	Normal**	(Xu et al., 1998)
Connexin 40	Überleitungsstörung	n.b.	(Kirchhoff et al., 1998; Simon et al., 1998)
Connexin 43	Todgeburt, Blockade des rechtsventrikulären Ausflusstraktes	Reduktion der elektrischen Koppelung*	(Reaume et al., 1995)
Connexin 45	Kardiovaskuläre Defekte	n.b.	(Kruger et al., 2000; Kumai et al., 2000)
* Herzexplantat von -/- Embryonen ** ES -/- Differenzierung n. b.: nicht bekannt			

Tabelle 2:
Knockout Linien verschiedener Adhäsionsmoleküle, die an der Ausbildung von Intercalated Discs beteiligt sind

2.2.4. Beispiele für Adhäsionsmoleküle des Herzen

2.2.4.1. Plakoglobindefizienz

Als Mitglied der Armadilloproteinfamilie setzt Plakoglobin (γ -Catenin) sich aus einer carboxy- und einer amino-terminalen Domäne zusammen, die über eine 42 Aminosäuren lange Folge von *Arm-repeats* verbunden sind. Plakoglobin dient in vivo sowohl der Verankerung der Cadherine in Desmosomen, wie auch der Adaptation der klassischen Cadherine in *Adherens Junctions*. Somit ist Plakoglobin neben Plakophilin 4 das einzige bisher bekannte Zelladhäsionsmolekül mit der Fähigkeit der Verankerung zytoskelettaler Filamente in Desmosomen und *Adherens Junctions*. Des weiteren kommen ihm weitere wichtige Funktionen im Wnt-Signalweg, bei der Tumorgenese und in der Apoptose zu (Charpentier et al., 2000; Sadot et al., 2000; Simcha et al., 1996).

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Plakoglobin während der embryonalen Entwicklung eine essentielle Komponente in kardialen, jedoch nicht in epithelialen Desmosomen darstellt. Plakoglobin $-/-$ Knockoutmäuse erwiesen sich als embryonal letal an Tag 12-16 aufgrund schwerer histologischer und funktioneller Herzdefekte. In diesen Mäusen sind keine intakten Desmosomen mehr auffindbar. Im Gegensatz dazu ist die Anzahl und Größe der anderen Adhäsionskontakte drastisch erhöht. Die Plakoglobin defizienten Embryonen sind kleiner, die Blutversorgung embryonaler Organe, wie Leber und Plazenta, scheint vermindert. Häufig sind die Herzen der Mutanten rupturiert, so dass Blut ins Perikard austritt, welches dadurch stark anschwillt. Die Untersuchung mit einem hochauflösenden Ultraschallgerät zeigte eine deutlich verminderte Herzfrequenz und Herzkontraktion an Tag 11.5 der Embryonalentwicklung (Ruiz et al., 1996).

Im Gegensatz zu den Nullmutanten sind heterozygote Plakoglobinmutanten lebensfähig und fertil. Mittels Echokardiographie konnte jedoch bei älteren Tieren, bzw. bei trainierten Tieren im Alter von 16 Wochen eine deutliche Vergrößerung des rechten Ventrikels und Atriums festgestellt werden.

Im Elektrokardiogramm zeigten sich bei diesen Tieren vermehrt Arrhythmien und Tachykardien. Diese Befunde lassen einen Stabilitätsverlust der *Intercalated Discs* vor allem bei stärkerer mechanischer Belastung des Myokard in Plakoglobin $+/-$ defizienten Tieren vermuten (Kirchhof et al., unpubliziert).

Humanmedizinische Studien befassen sich mit dem Zusammenhang einer autosomal rezessiven Mutation des Genes für Plakoglobin und einer Erkrankung namens Naxos Disease. Bei dieser Erkrankung handelt es sich um eine erstmals im Jahre 1986 beobachtete arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) in Verbindung mit wolligem Haar und palmoplantarer Keratodermatitis. Mit Einsetzen der mechanischen

Beanspruchung der Hand- und Fußsohlen zeigten sich auffällige Veränderungen der Haut, eine arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie manifestierte sich bei den betroffenen Patienten erst im Jugendlichen- oder Erwachsenenalter.

Bei weit über 90% der untersuchten Individuen konnten Veränderungen im Elektrokardiogramm festgestellt werden. Bei allen Patienten war der rechte Ventrikel betroffen, bei fast der Hälfte der Untersuchten wurde zusätzlich eine Linksherzbeteiligung festgestellt. 90% der Probanden zeigten ventrikuläre Extrasystolen, 35% zusätzlich eine ventrikuläre Tachykardie. Arrhythmien konnten bei 65% der Betroffenen nachgewiesen werden. Viele der erkrankten Patienten verstarben am plötzlichen Herztod, wobei das Todesalter zwischen 17 und 53, im Durchschnitt jedoch bei nur 32 Jahren lag (Protonotarios et al., 2002): Bei der echokardiographischen Untersuchung konnten bei allen Individuen Unregelmäßigkeiten in der Herzfunktion- und Morphologie festgestellt werden. In der Pathologie der untersuchten Herzen zeigte sich deutlich der Ersatz des Myokards durch fibrös-fettiges Gewebe. Es konnte gezeigt werden, dass aufgrund der Mutation für Plakoglobin die Ausbildung der *Adherens Junctions* und der Desmosome, welche für einen stabilen Zellverband unabdingbar sind, nicht ausreichend möglich ist. Als Folge der herabgesetzten Zellstabilität kommt es zu Störungen der Weiterleitung der elektrischen Impulse der myokardialen Kontraktilität über die *Gap Junctions*, was sich in Arrhythmie und Extrasystolen äußert. Durch mangelnde Integrität und Stabilität des Gewebes kommt es besonders in Folge mechanischer Belastung somit zu interzellulären Mikroläsionen und Rupturen.

Ein letal verlaufendes kardiokutanes Syndrom (CWH: Cardiomyopathy and wooly haircoat syndrome) ist auch bei Herefordkälbern in Australien beschrieben. Die Erkrankung wird autosomal rezessiv vererbt und die betroffenen Kälber können bereits bei der Geburt anhand des unverwechselbaren wolligen Haarkleides erkannt werden. Der Tod tritt meist innerhalb der ersten 12 Wochen nach der Geburt ein, meist als Folge plötzlich auftretenden Kammerflimmerns (oft nach physischer Anstrengung) oder einer anhaltenden kongestiven Herzinsuffizienz. Der klinische Phänotyp der CHW scheint dem des humanen kardiokutanen Syndrom der Naxos disease, im Zusammenhang mit Haarveränderungen, kardialen Arrhythmien, elektrokardiographischen Abnormalitäten, sowie eines progressiven Herzversagens und eines plötzlichen Herztodes sehr ähnlich. Die genetische Ursache der Erkrankung ist jedoch bisher noch nicht identifiziert worden (Whittington et al., 1988).

2.2.4.2. *Desmoplakinefizienz*

Desmoplakin ist in Desmosomen an der Fixation der desmosomalen Cadherine an die Intermediärfilamente der Zelle beteiligt. Zudem wurde von Franke et al. (2006) Desmoplakin in den *Intercalated Discs* des Herzens als Baustein, sowohl in Desmosomen wie auch in *Adherens Junctions* nachgewiesen.

Autosomal-dominant und autosomal-rezessive Mutationen im Gen für Desmoplakin konnten für die Entstehung schwerer Herzdefekte verantwortlich gemacht werden. Autosomal-rezessive Mutationen für Desmoplakin wurden in einer arabischen Familie gefunden, deren Mitglieder unter einer arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie (ARVC) mit Pemphigus-ähnlichen Hautdefekten litten (Alcalai et al., 2003). Eine weitere autosomal-rezessiv vererbte Desmoplakinefizienz konnte an einer Familie aus Ecuador als Ursache für eine Kardiomyopathie, einhergehend mit Hautveränderungen an Händen und Füßen und wolligem Haarwuchs, identifiziert werden. Das sogenannte Carvajal Syndrom ist eine, dem durch Plakoglobinefizienz hervorgerufenen Naxos-Disease ähnliche Erkrankung, wobei die Patienten hier eine ARVC mit deutlicher linksventrikulärer Dominanz entwickeln (Norgett et al., 2000). Eine weitere ARVC mit deutlicher Beteiligung des linken Herzens konnte als Folge einer autosomal-dominanten Erbmutation im Gen für Desmoplakin ausfindig gemacht werden (Norman et al., 2005).

2.2.4.3. *Plakophilin 2-Defizienz*

Als ein weiteres Mitglied der Armadilloproteinfamilie ist auch Plakophilin 2 eine wichtige Komponente im Zellzusammenhalt von vor allem *Adherens Junctions*. Auch für dieses Protein konnte kürzlich gezeigt werden, dass ihm, im Gegensatz zur Situation in Epithelien, im Herzen eine duale Lokalisation sowohl in Desmosomen als auch in *Adherens Junctions* zukommt (Franke et al., 2006).

Im Knockoutexperiment erwiesen sich die *-/-* Mutanten an Tag 10.5 der Entwicklung als letal. Ähnlich wie im Plakoglobin Knockout waren histologische Defekte im Aufbau des Herzens, Ruptur der Herzwände und Blutaustritt ins Perikard zu beobachten. Immunhistologische und biochemische Analysen der *-/-* Knockoutmäuse zeigten, dass in den Myozyten Desmoplakin nicht mehr an Zellkontakten beteiligt war. Auch die desmosomalen Cadherine (v.a. Dsg2) konnten kaum noch in den Adhäsionsstrukturen ausfindig gemacht werden. Anhand dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass dem Plakophilin 2 eine essentielle Rolle der Adaptation von Desmoplakin und Dsg2 in der Entwicklung kardialer Zellkontakte zukommt (Grossmann et al., 2004).

Im Anschluss an die Ergebnisse dieser Tierstudie wurde bei 120 humanen ARVC-Patienten ein Mutationsscreen durchgeführt. Bei 32 dieser Erkrankten konnten heterozygote Mutationen im Gen für Plakophilin 2 identifiziert werden. Alle untersuchten ARVC-Patienten litten an einer ARVC einhergehend mit rechtsventrikulärer Tachyarrhythmie, bei hoher Inzidenz zu Synkopen und plötzlichem Herztod (Gerull et al., 2004).

2.3. Plakophilin 4 Defizienz

2.3.1. Gene Trap Methode

Es werden ca. 35.000 Gene für das humane Genom vorhergesagt, es existieren jedoch erst für weniger als 15% dieser Gene Zell- bzw. Tiermodelle. Mit Hilfe von Mausmutanten lassen sich Erkrankungen des Menschen im Tierversuchsmodell erforschen und Heilmethoden entwickeln. Embryonale Stammzellen der Maus lassen sich in der Zellkultur gezielt genetisch manipulieren und kultivieren. Aus den genetisch modifizierten Stammzellen können sich nach Injektion in frühe Embryonen experimentell Mauslinien mit der nunmehr bekannten genetischen Veränderung bilden.

Neben Methoden der Ausschaltung bekannter Gene wie z. B. im Knockout Verfahren hat die ungerichtete Einbringung von Vektoren in das Genom embryonaler Stammzellen in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Die Vorteile des Gene Trap Verfahrens liegen dabei zum einen darin, dass sehr viel größere Zahlen von Genen im Hochdurchsatzverfahren mutiert werden können, zum anderen ist zunächst keinerlei Kenntnis der zu mutierenden Gene notwendig.

Im hier verwendeten Gene Trap Verfahren beinhaltet der eingesetzte Vektor eine Splice-Akzeptor-Sequenz und kodierende Sequenzen für LacZ und Neomycin (β geo). Integriert ein solcher Vektor in ein Intron eines aktiven Gens, dann wird posttranskriptional ein Fusionsprotein des getroffenen Gens gebildet. Dadurch steht der eingebrachte Vektor nunmehr unter der regulatorischen Kontrolle des „getrappten“ Gens. Mit Hilfe der LacZ/Neomycin Fusionskassette (β -Geo) ist es möglich, Klone mit Integration in kodierenden Sequenzen zu selektieren. Gleichzeitig führt der Einbau des Vektors zur Mutation des Gens, da das gebildete Fusionsprotein am Polyadenylierungssignal beendet wird. Die Integration der LacZ-Sequenz führt zur Bildung von β -Galaktosidase. Die endogene Expression des LacZ-Reportergens lässt sich so im histologischen Präparat durch Färbung der β -Galaktosidase nachweisen.

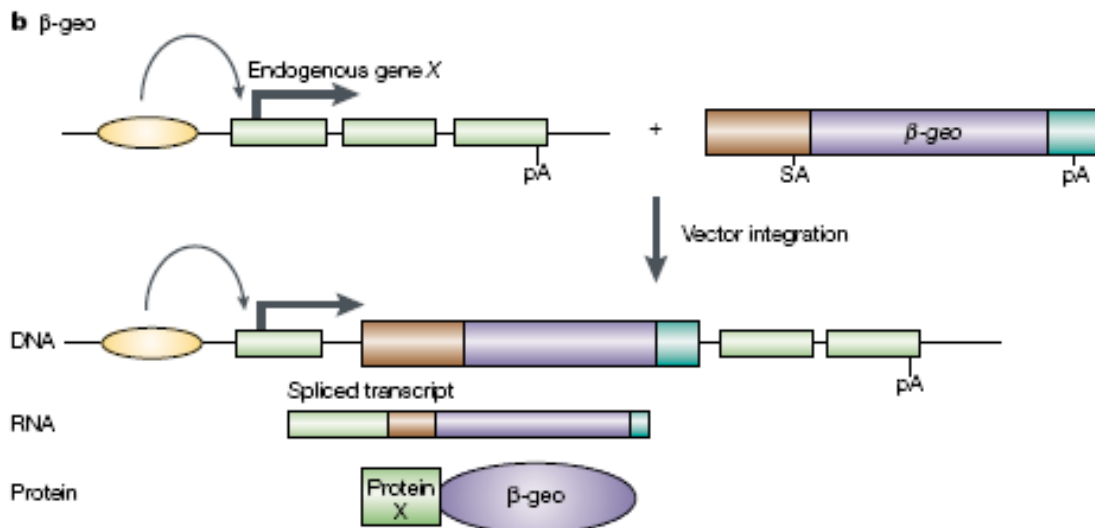


Abbildung 3:

Beispiel für einen Gene Trap Vektor. Der pGT4.5 Gene Trap Vektor enthält einen splice Akzeptor (SA) direkt gekoppelt an ein promotorloses LacZ Gen, gefolgt von der Neomycinresistenz-Sequenz, welche zusammenfassend als β -Geo bezeichnet sind. Die Integration in ein Intron führt zur Bildung eines Fusionstranskripts bestehend aus Gen X und der LacZ/Neomycin-Sequenz (β -Geo), bzw. zur Synthese des entsprechenden Fusionsproteins (Stanford et al., 2001).

Anschließend lassen sich die getroffenen Gene identifizieren, indem der integrierte Vektor als Startpunkt für eine 5'RACE (rapid amplification of cDNA ends) PCR verwendet wird. RACE Produkte enthalten die Sequenzinformation der davor liegenden 5'Exons und lassen sich direkt sequenzieren. Das im Rahmen des Deutschen Humanen Genom Projektes (DHGP) gegründete Gene Trap Konsortium hat sich zur Aufgabe gemacht, eine frei zugängliche Ressource von mutierten ES-Zellklonen für den akademischen Sektor zu schaffen. Ein wichtiges Ziel des Humangenomprojektes ist die Identifikation der Gene, die an der Entstehung menschlicher Erkrankungen beteiligt sind. Im Rahmen des Projektes wurden bereits Gene mit bekannter Relevanz zu menschlichen Krankheiten durch Insertion eines Gene Trap Vektors mutiert. Mit den Stammzelllinien, die eine Mutation in einem dieser Gene tragen, stehen der Forschung damit potentielle Modellsysteme für eine funktionale Untersuchung der Rolle der beteiligten Faktoren an der Entstehung bzw. am Verlauf einer bestimmten Erkrankung zur Verfügung.

Ergänzend dazu bietet die Phänotypisierung von Mausmodellen mit Mutation bekannter Gene die Möglichkeit der Aufdeckung weiterer Zusammenhänge einer humanen Erkrankung und ihrer genetischen Ursache.

2.3.2. Vorausgegangene Arbeiten im Rahmen des Projekts

Im Rahmen des Gene Trap Projektes wurden bisher, ausgehend von der Bank an mutierten ES über 90 unterschiedliche Mauslinien daraus etabliert.

In ca. 60% der Mutanten wurden Phänotypen entweder während der Embryonalentwicklung oder im erwachsenen Alter beobachtet bzw. beschrieben.

Eine dieser generierten Mauslinien weist eine Insertion im Plakophilin 4 Gen auf. Das Plakophilin ist als Adhäsionsprotein sowohl in *Adherens Junctions* als auch in Desmosomen in einer Vielzahl von Geweben zu finden. Außerdem wird ihm eine Signalfunktion bei der Stabilisierung des Zytoskeletts zugesprochen. Homozygot-Mutante Plakophilin 4 Mäuse sind lebensfähig und fertil und zeigten zunächst keinen auffälligen Phänotyp.

Mittels RT-PCR konnte das ubiquitäre Vorkommen von Plakophilin 4 RNA in nahezu allen getesteten Organen einer Wildtypmaus gezeigt werden. Deutlich Expression zeigten sich hier vor allem in Geweben von Niere, Leber, Lunge und Gehirn. Des weiteren wurde RNA in Herz, Gastrointestinaltrakt und Geschlechtsorganen nachgewiesen. In den untersuchten Geweben liegt die Plakophilin 4 RNA nur noch in weit geringerer Konzentration als im Wildtyp vor, da es beim Gene Trap Verfahren nicht zwangsläufig zur vollständigen Ausschaltung des Gens kommt (**Abbildung 4**).

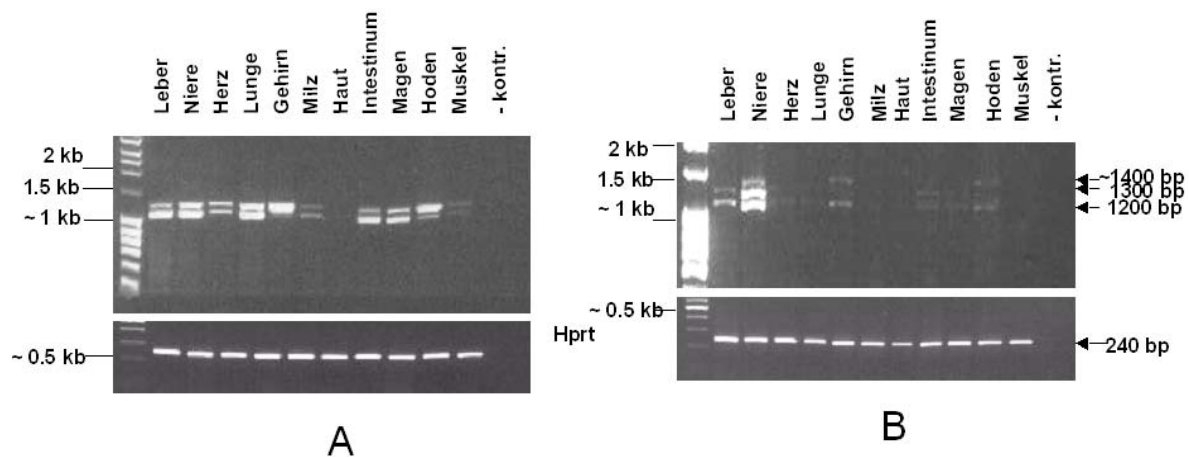


Abbildung 4: RT-PCR verschiedener Organe einer Wildtypmaus (A) und einer homozygoten PKP4^{gt} Mutante (B) (YALCIN and MANEFELD et al., unveröffentlicht)

Die Quantifizierung der RT-PCR Daten zeigte eine deutliche Verminderung der Plakophilin 4 Genexpression im Herzen der p0071 transgenen Maus im Vergleich zum Wildtyp. Eine auffällig verminderte Genexpression lässt sich des weiteren vor allem in Geweben von Lunge und Gehirn erkennen (**Tabelle 3**).

Gewebe	Genexpression im Vergleich zum Wildtyp
Herz	-20
Leber	-2
Niere	1,5
Gehirn	-5
Lunge	-14
Hoden	-3

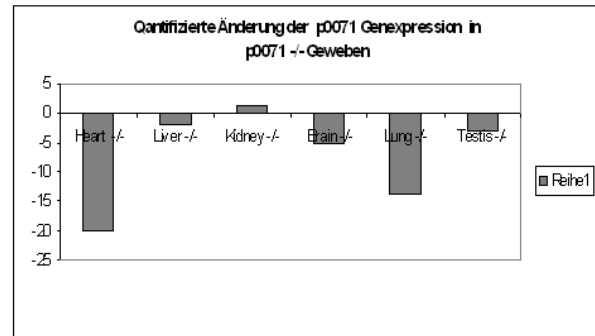


Tabelle 3:
Quantifizierung der RT-PCR Ergebnisse der p0071 Expression verschiedener Gewebe einer homozygot mutanten Maus im Verhältnis zur Expression im Wildtyp (Yalcin and Manefeld et al., unveröffentlicht)

Im Western Blot konnten die Ergebnisse der RT-PCR in Geweben von Herz, Lunge und Niere auf Proteinebene bestätigt werden. Der verwendete Antikörper bindet an das N-terminale Ende des Proteins. Die Analyse der getesteten Organe der Wildtypmaus zeigten das Vorkommen des Plakophilin 4 Proteins in Herz, Lunge und Niere. Im Gegensatz dazu scheint das Protein in der homozygoten Mutante kaum mehr nachweisbar in Geweben von Herz und Lunge. Im Western Blot des Nierengewebes ist in beiden Fällen ein Bande erkennbar, hier liegt Plakophilin 4 sowohl im Wildtyp als auch in der homozygoten Mutante vor (**Abbildung 5**).

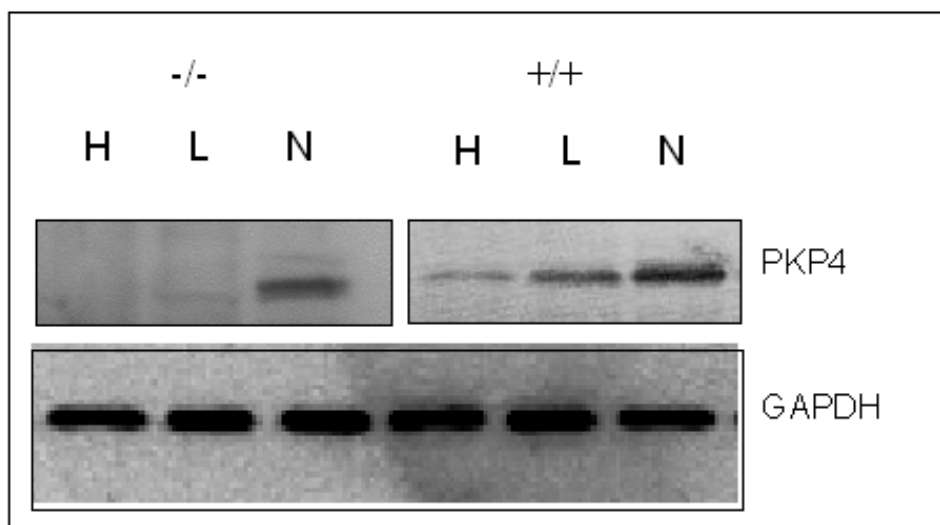


Abbildung 5:
Western Blot Analyse in Herz (H), Lunge (L) und Niere (N) einer Wildtyp-, bzw. einer homozygot mutanten Maus (Yalcin and Manefeld et al., unveröffentlicht).

Um weitere Erkenntnisse über die Verteilung des Gens bzw. des Proteins *in situ* im Laufe der embryonalen Entwicklung zu bekommen, wurden histologische Untersuchungen angefertigt. Hierzu wurden zunächst Embryonen an Tag 10.5 der Embryonalentwicklung entnommen und als *whole mount* Präparat fixiert. Die LacZ Färbung ließ vor allem eine starke Expression des Fusionstranskripts in Herz, Gehirn und Rückenmark erkennen (**Abbildung 6**).

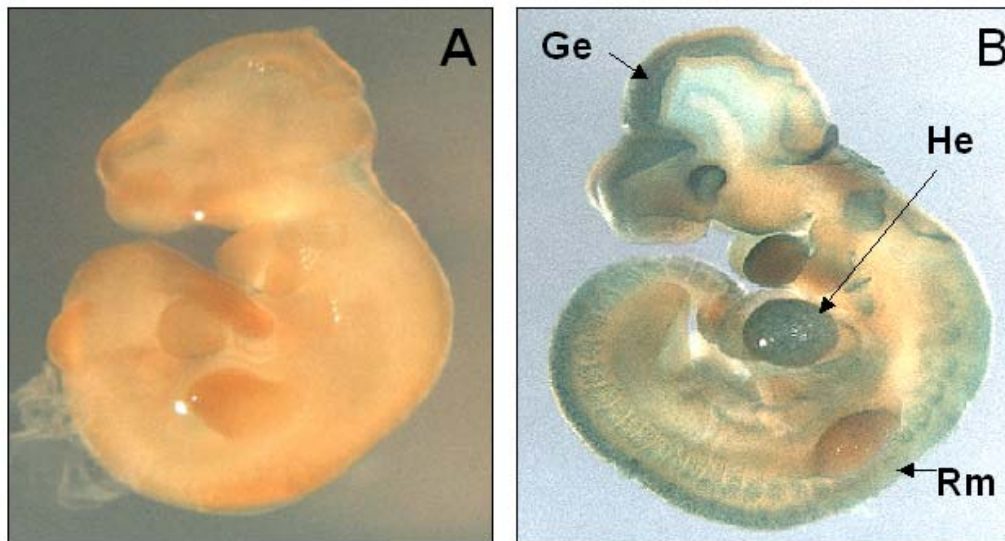


Abbildung 6:
LacZ Färbung eines Wildtyp Embryos (A), bzw. eines homozygot Plakophilin defizienten Embryos (B) an Tag 10.5 der embryonalen Entwicklung (Yalcin and Manefeld et al., unveröffentlicht)
He: Herz; **Ge:** Gehirn; **Rm:** Rückenmark

Um die Expression von Plakophilin 4 in verschiedenen embryonalen Organen histologisch zu untersuchen, wurde ein *in situ* Präparat eines Wildtypembryos angefertigt. Die *in situ* Hybridisierung des 14.5 Tage alten Embryo wies vergleichbar dem β -Gal gefärbten Präparat deutliche Signale in Herz und Gehirn auf. Zudem zeigte sich eine auffällige Färbung der Gonaden, die epitheliale Auskleidung z.B. der Zungenanlage und des olfaktorischen Gewebes liessen ein starkes Signal erkennen (**Abbildung 7**).

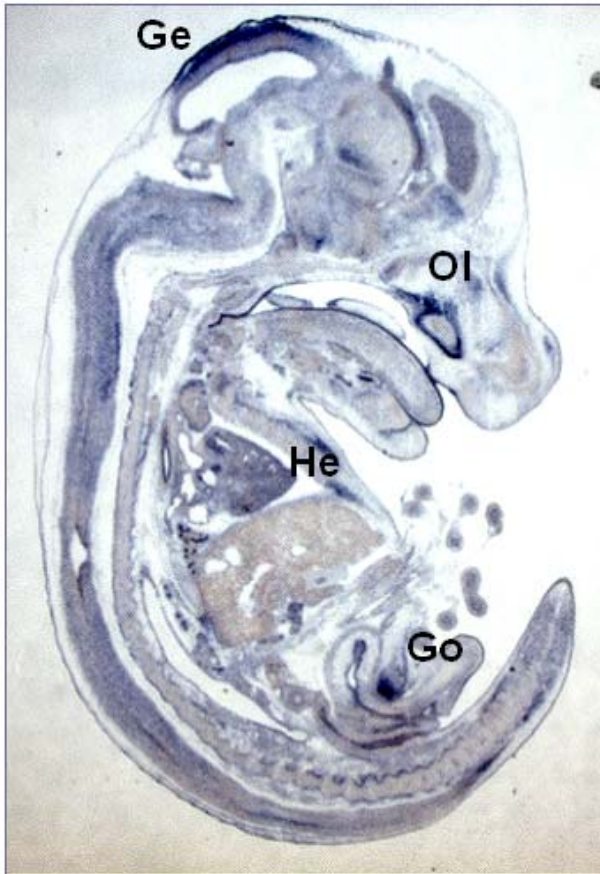


Abbildung 7:
In situ Hybridisierung eines Wildtypembryos an Tag 14.5 der Entwicklung
Ge: Gehirn; **Ol:** olfaktorisches Gewebe; **He:** Herz; **Go:** Gonaden

Die Plakophilin 4 defizienten Mutanten sind lebensfähig und fertil und wiesen zunächst keinen offensichtlichen Phänotyp auf. In den vorhergehenden molekularbiologischen und histologischen Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Plakophilin 4 Expression sowohl auf Transkript- wie auch auf Proteinebene in zahlreichen Organen der Mutante stark vermindert ist. Die 20fach verringerte Expression des Adhäsionsmoleküls im Herzen im Vergleich zum Wildtyp, macht strukturelle Veränderungen am Herzgewebe und an der Zellstabilität der Kardiomyozyten wahrscheinlich. Eine Vielzahl kardiologischer Veränderungen, die auf genetische Ursachen zurückzuführen sind, werden erst nach langer chronischer Beanspruchung im hohem Alter oder durch erhöhte Belastung wie zum Beispiel im Hochleistungssport diagnostizierbar.

2.4. Hypertrophe Kardiomyopathien

Laut Definition ist eine Kardiomyopathie eine myokardiale Herzkrankheit unbekannter oder bekannter Ätiologie, bei der ein stark vergrößertes Herz mit charakteristischen Veränderungen im Vordergrund des Krankheitsbildes steht.

Die Gruppe der Kardiomyopathien wird unter strukturell-hämodynamischen Aspekten in vier Formen unterteilt (Goodwin, 1970)

- Dilatative (kongestive) (DCM),
- Hypertrophe (HCM),
- Obliterative (OCM) und
- Restriktive-konstriktive (RKCM) Kardiomyopathie

2.4.1. Hypertrophe Kardiomyopathien

Die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) wird als primär von der Herzmuskulatur ausgehende Kardiomyopathie klassifiziert (Richardson et al., 1996).

Die hypertrophe Kardiomyopathie ist durch eine ätiologisch unklare pathologische Hypertrophie der Ventrikelmuskulatur charakterisiert, d.h. für die Hypertrophie kann primär keine Druckbelastung verantwortlich gemacht werden. Morphologisch ist die Erkrankung in den meisten Fällen durch eine lokale septal betonte (asymmetrische Septumhypertrophie), seltener durch eine apikale oder auch generalisierte konzentrische Hypertrophie des linken Ventrikels gekennzeichnet. Die Hypertrophie verursacht bei der Mehrzahl der Patienten eine diastolische Funktionsstörung. Hämodynamisch wird die häufigere hypertrophische nichtobstruktive Kardiomyopathie (HNCM) von der in einem Viertel der Fälle beobachteten hypertrophen obstruktiven Kardiomyopathie (HOCM) unterschieden, bei der die Septumhypertrophie einen intrakavitären Druckgradienten verursacht (Braunwald et al., 1963; Kuhn et al., 1983; Yamaguchi et al., 1976). Hinsichtlich des Verlaufs und der Prognose scheinen sich die obstruktive und die nichtobstruktive Form nicht wesentlich zu unterscheiden. Es gibt kein einzelnes, spezifisches pathologisches Merkmal, das für die hypertrophische Kardiomyopathie pathognomonisch ist. Nach Goodwin (1993) charakterisieren sieben strukturelle und funktionelle Abnormitäten die hypertrophische Kardiomyopathie:

- Die massive Hypertrophie des interventrikulären Septums, oft auch der freien Wand des linken Ventrikel, manchmal des rechten Ventrikels;
- Kräftige, rasche Kontraktion des linken Ventrikels
- Ein systolischer, interventrikulärer Druckgradient, meist im Ausflusstrakt (bei der HOCM);
- Eine diastolische Funktionsstörung mit erhöhtem Druck im linken Venrikel und linken Vorhof aufgrund verzögerter Relaxation und erhöhter Steifigkeit bzw. verminderter Compliance des hypertrophierten linken Ventrikels;
- Okkludierende Veränderungen in den kleinen intramuralen Koronararterien und –arteriolen;
- Fokale oder diffuse Fehlanordnung der Myofibrillen und des interstitiellen Bindegewebes;
- Tendenz zum plötzlichen Herztod

Die HCM ist die häufigste hereditäre Herzerkrankung bei Menschen. In der Mehrzahl der Fälle lässt sich eine autosomal-dominant vererbte Mutation in einem der 14 bisher bekannten Krankheitsgene nachweisen. Die genetischen Ursachen, das klinische Bild sowie der klinische Verlauf sind äußerst heterogen. Für die Diagnostik kommt gegenwärtig der nicht-invasiven Untersuchung mittels Echokardiographie der größte Stellenwert zu.

In Abhängigkeit von der Lokalisation, dem Ausmaß der Hypertrophie und in einigen Fällen auch von der Art der genetischen Ursache ist die Prognose sehr unterschiedlich. Der plötzliche Herztod (SD) gilt gerade bei Jugendlichen als größtes Risiko der Erkrankung. Eine systematische Stratifizierung von Patienten mit erhöhtem Risiko für einen SD ist dringend notwendig.

2.4.2. Makroskopie

Makroskopisch ist das Herz vergrößert und kugelförmig, das Herzgewicht ist erhöht. Das interventrikuläre Septum ist hypertrophiert, wobei die maximale Septumverdickung bei der HOCM meist subaortal im Bereich des linksventrikulären Ausflusstraktes gelegen ist. Die Verdickung kann aber auch gleichmäßig das ganze Septum betreffen oder sich nur auf den apikalen oder mittleren Bereich der Zwischenwand beschränken. Zusätzlich kann in manchen Fällen ein Stärkezuwachs der freien Wand des linken Ventrikel, seltener auch der Wand des rechten Ventrikel gefunden werden. Es besteht keine sichere Korrelation zwischen dem Ausmaß der Hypertrophie und der intraventrikulären Obstruktion.

2.4.3. Mikroskopie

Lichtmikroskopisch ist die Erkrankung durch einen Strukturverlust der Myozyten und durch eine interstitielle Fibrose, vor allem des subendokardialen Myokards, gekennzeichnet. Die einzelnen Herzmuskelzellen sind hypertrophiert und in einigen Fällen lassen sich eine Verzweigung und Wirbelbildung der Myozyten beobachten (Scheffold et al., 2005).

Auch in normalen oder druckhypertrophierten Herzen kann eine Fehlanordnung von Myokardfasern gefunden werden. Dabei sind aber nur bis zu 5% der Myozyten betroffen, während bei der hypertrophischen Kardiomyopathie 30-50% oder mehr Myozyten fehlangeordnet sind. Das Ausmaß der Fehlanordnung ist also entscheidend (Maron et al., 1979).

Elektronenmikroskopisch zeigen die Myofibrillen ebenfalls einen ungeordneten Verlauf. Sie sind unterschiedlich dicht und kurz, teilweise auch abnorm schmal. Die Z-Banden sind häufig verbreitert. Die Mitochondrien sind vermehrt und im Sinne einer Mitochondriose verändert. Die Kerne sind teilweise atypisch geformt. Weiter sind in 50% der Fälle abnorme Muskelfaserverzweigungen, die für die hypertrophische Form als charakteristisch gelten, nachweisbar.

Die Strukturveränderungen des Myokards führen dazu, dass bei der Kontraktion die Kraftentfaltung nicht einheitlich ausgerichtet ist und sich teilweise sogar aufhebt. Es kommt dadurch zu einer Drucküberlastung des Myokards und damit zum Fortschreiten der Muskelhypertrophie (Hutchins et al., 1978; Murgu et al., 1980; Wigle et al., 1978). Die systolische Kraftentfaltung zur Förderung eines ausreichenden Schlagvolumens ist nicht reduziert, dagegen ist die Compliance durch die veränderte Myokardstruktur erheblich vermindert.

2.4.4. Ätiologie und genetischer Hintergrund

Mit einer Prävalenz von 0,2% gilt die HCM als häufigste hereditäre Herzerkrankung, wobei beide Formen etwa gleich häufig auftreten. Bei Patienten mit HCM handelt es sich in ca. 60% der Fälle um ein autosomal-dominantes Erbgeschehen mit inkompletter sowie altersabhängiger Penetranz. Bei etwa einem Drittel der Patienten mit HOCM wird eine familiäre Disposition gefunden (Schowengerdt et al., 1995). Bei dieser familiären Form sind Männer und Frauen gleichermaßen betroffen, wohingegen die nicht familiär bedingte Form der HOCM bei Männern bis zu vier mal häufiger als bei Frauen auftritt (Braunwald et al., 1964; Wigle und Silver, 1978).

In der Mehrzahl der erblichen HCM Fälle lässt sich eine Mutation in einem der bisher 14 bekannten Krankheitsgene nachweisen. Bei über der Hälfte der Erkrankten wurde hier eine

Mutation im Gen für die β -Myosin Schwereketten, des myosinbindenden Protein C im Gen für das kardiale Troponin T analysiert. Die verbleibenden 11 bisher identifizierten Gene konnten vereinzelt als Ursache der familiären HCM nachgewiesen werden, wobei allesamt für Proteine des Sarkomers kodieren. Die genetische Variabilität der HCM wird deutlich vor dem Hintergrund, dass diesen 14 Krankheitsgenen wiederum mehr als 200 bisher lokalisierte Mutationen zugrunde liegen.

Neben der Heterogenität der krankheitsverursachenden Gene hat die Art und Lokalisation der Mutation auch einen direkten Einfluss auf Phänotyp und Ausprägung der HCM (Erdmann et al., 2001; Gruver et al., 1999; Kimura et al., 1997).

Die Identifikation weiterer, an der Entstehung der HCM beteiligter Gene ist somit unerlässlich, um bessere Screeningmethoden für v. a. junge Patienten mit symptomloser HCM zu etablieren und um ideale Therapien zu entwickeln, die der Heterogenität der HCM gerecht werden.

2.4.5. Symptome und Verlauf

Die hypertrophische Kardiomyopathie ist eine langsam progressive Myokarderkrankung. Bei der Mehrzahl der Patienten verläuft die Erkrankung mit fehlender bis milder Symptomatik. Bei symptomatischen Patienten kommt es zu belastungsabhängiger Dyspnoe, aber auch zu Angina pectoris, Schwindel, Präsynkopen und Synkopen bis hin zur therapierefraktären Herzinsuffizienz. Die HCM verläuft bei etwa einem Drittel der humanen Patienten progredient, d.h. die Erkrankung mündet in eine schwere diastolische Funktionsstörung des linken Ventrikel bis hin zur terminalen Herzinsuffizienz. Bei älteren Patienten dominieren Symptome der Herzinsuffizienz, die auch nach jahrzehntelang symptomfreiem Krankheitsverlauf plötzlich auftreten können. Bei jungen Erwachsenen stellt die HCM die häufigste Ursache für einen plötzlichen Herztod (SD) dar, wobei hier das Risiko für Patienten mit einer HOCM gegenüber Patienten mit einer HNCM doppelt so hoch ist. Der SD tritt auch bei Patienten ohne oder mit nur milder Symptomatik auf. Die Ursachen sind heterogen und reichen von primärer Tachyarrhythmie über totale AV-Blockierungen mit Herzstillstand bis zu hämodynamisch oder ischämisch getriggerten ventrikulären Arrhythmien (Maron, 1997).

Da die HCM auch die häufigste Ursache des SD bei Leistungssportlern während des Trainings oder des Wettkampfes ist, gilt starke körperliche Anstrengung als Trigger für SD bei Patienten mit HCM (Maron et al., 1982; Maron et al., 1996).

2.5. Tiermodelle

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Tiermodelle zur Erforschung molekularer Mechanismen und funktioneller Aspekte der myokardialen Hypertrophie entwickelt.

Der hypertrophen Kardiomyopathie des Menschen liegen in mindestens 30% der Fälle genetische Ursachen zugrunde. Anhand genetisch veränderter Mauslinien konnten wichtige Erkenntnisse über mögliche molekularbiologische Ursachen der hypertrophischen Kardiomyopathie gewonnen werden.

Hierzu wurden sowohl Gen-Überexpressionslinien, wie auch Mutations- und Knockoutpopulationen entwickelt. Eine Auswahl der Gene ist in **Tabelle 4** aufgeführt.

Gen	Phänotyp	Quelle
Gen Überexpression		
Calmodulin	Myokardhypertrophie und Hyperplasie	(Gruver et al., 1999)
<i>α₁-Adrenergic receptor</i>	Myokardhypertrophie	(Milano et al., 1994)
Interleukin β und Interleukin β Rezeptor	Hypertrophie	(Hirota et al., 1995)
Genmutation		
<i>α-cardiac myosin heavy chain</i>	Hypertrophe Kardiomyopathie	(Geisterfer-Lowrance et al., 1996)
Fehlen der <i>β-myosin light chain</i> Bindungsdomäne	Hypertrophe Kardiomyopathie	(Welikson et al., 1999)
Knockout		
<i>Adenine nucleotide translocator</i>	Hypertrophie	(Graham et al., 1997)

Tabelle 4:
Bekannte genetisch manipulierte Tiermodelle zur Erforschung der kardialen Hypertrophie (Hasenfuss, 1998). Hierzu wurden transgene Mauslinien generiert, in denen ein bestimmtes Gen überexprimiert, ausgeschaltet (knockout) oder mutiert wurde.

2.6. Echokardiographie bei der Maus

Die Anwendung des hochfrequenten kardialen Ultraschall im Mausmodell zur Analyse der linksventrikulären Masse wurde 1994 erstmals von Manning et al. beschrieben (Manning et al., 1994). Hoit et al. (1995) wandte die transthorakale Echokardiographie bei Mäusen an, um funktionale Unterschiede des linken Ventrikel zwischen Wildtyp und transgenen Mäusen darzustellen. 1996 untersuchten Tanaka et al. in einer umfangreichen Studie die Anwendung der transthorakalen Echokardiographie zur morphologischen und funktionellen Analyse kardialer Phänotypen in Mausmodellen (Tanaka et al., 1996).

Untersucht wurden transgene und chirurgisch behandelte Tiermodelle mit Defekten vor allem des linken Herzen. Die Analysen lieferten Ergebnisse bezüglich der Sensitivität der Messung der linksventrikulären Wand, der linksventrikulären Masse und Dilatation und Funktion des linken Ventrikel. Des weiteren wurde die Detektion auch asymmetrischer hypertropher Kardiomyopathien im Mausmodell erforscht und die transthorakale Echokardiographie zur Identifikation kardialer Phänotypen in transgenen Mauskolonien betrachtet. In dieser umfassenden Studie wurde erstmals die Echokardiographie als Hypertrophie-Screen einzelner Erkrankter innerhalb einer Kolonie transgene Mäuse angewendet. Der Ultraschall erwies sich als hervorragende nicht-invasive Methode, um innerhalb einer Population zwischen Wildtypen, herterozygoten Tieren mit milder Hypertrophie und Homozygoten mit stark ausgeprägter Hypertrophie zu unterscheiden.

In der Humanmedizin haben sich bestimmte Vorgehensweisen, Parameter und Formeln zur Ermittlung der linksventrikulären Masse und zur Diagnose einer hypertrophen Kardiomyopathie etabliert. Die Bestimmung der LV Masse kann sowohl im 2D-Mode wie auch im M-Mode erfolgen. Obwohl die 2D-Methode als die präzisere gilt, werden die Maße des linken Ventrikel mit Hilfe des M-Mode analysiert, was nicht zuletzt auf die einfachere Anwendung dieser Methode zurückzuführen ist (Paczek et al., 1995; Park et al., 1996). Dabei ist die Schnittebene in Längs- und Querschnitt auf Höhe der Papillarmuskeln definiert. Bei der anschließenden Auswertung werden die Messpunkte gemeinhin nach der leading-edge-Methode der American Society of Echocardiography (ASE) platziert (Sahn et al., 1978). Da die Masse des Herzens durch Parameter wie Körpergröße, Gewicht und Geschlecht beeinflusst wird, sind hier zahlreiche Ansätze bekannt, diese Faktoren einzukalkulieren. In der Medizin wurde die Masse häufig in Verhältnis zur Körperoberfläche gesetzt (de Simone et al., 1992). Neueste Ansätze beziehen sich auf die Länge der Tibia als Bezugskonstante. Trotz deutlicher Verbesserung der Sonographiegeräte in den vergangenen Jahren birgt die transthorakale Echokardiographie eine gewisse Variabilität innerhalb der Messungen. Neuere Methoden zur Bestimmung der linksventrikulären Masse, wie die Computertomographie und die Magnetresonanztomographie zeichnen sich zwar durch

höhere Sensitivität, aber auch durch größeren Aufwand und höhere Kosten aus. Somit ist die Echokardiographie vor allem als Screeningmethode ein herausragendes Mittel zur nicht-invasiven Diagnose einer hypertrophen Kardiomyopathie.

2.7. Schwimmtraining

Die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) wird als primär von der Herzmuskulatur ausgehende Kardiomyopathie klassifiziert. Obwohl bei über 60% der Patienten eine genetische Mutation als Ursache der HCM ausgemacht werden konnte, manifestiert sich die Erkrankung meist erst mit zunehmendem Alter.

Dies lässt vermuten, dass die Schwere und der Verlauf der HCM stark von Faktoren wie chronischer und akuter mechanischer Belastung abhängen. Zudem stellt die HCM die häufigste Ursache des plötzlichen Herztodes bei Sportlern dar. In zahlreichen Studien konnte ein direkter Zusammenhang zwischen Art, Dauer und Intensität des Trainings und der Progredienz der HCM ausgemacht werden. In der zugrundeliegenden Arbeit soll die Entstehung einer kardialen Hypertrophie aufgrund einer Mutation im Plakophilin 4 Gen im Mausmodell untersucht werden. Obwohl vorausgegangene Experimente zeigen, dass die Proteinexpression in den transgenen Mäusen stark verringert ist, ließen die PKP 4 defizienten Tiere zunächst keinen Phänotyp erkennen. In Hinblick auf die Pathogenese zahlreicher kardialer Erkrankungen, welche sich häufig erst mit zunehmendem Alter klinisch manifestieren, wurde eine Gruppe ein Jahr alter Tiere kardiologisch untersucht. Ergänzend dazu wurde eine Gruppe 8 Wochen alter Mäuse einem Schwimmtraining unterzogen, um den mechanische Belastung auf den Herzmuskel zu erhöhen.

Das Trainingsexperiment im Mausmodell wurde erstmals, in Anlehnung an Trainingsstudien mit Ratten 1994 ausführlich beschrieben (Kaplan et al., 1994). Die Wildtypmäuse wurden im Alter von acht Wochen für vier Wochen einem Schwimmtraining unterzogen. Dabei wurde die anfängliche Trainingsintensität von 20 min zweimal täglich kontinuierlich bis auf abschließend 90 min zweimal täglich gesteigert. Um ein „Treiben lassen“ und eine herabgesetzte Aktivität der Tiere zu verhindern erwies sich eine Gruppengröße von mindestens 5 Tieren als geeignet (Wilber, 1959).

Die Wahl der Wassertemperatur einzelner Studien variiert stark, wobei die Mäuse sowohl bei Temperaturen $> 33^{\circ}\text{C}$ als auch $< 25^{\circ}\text{C}$ erhöhtem Stress ausgesetzt sind.

Die anschließende klinische und pathologische Untersuchung der Mäuse ergab ein um 10% erhöhtes Herzgewicht der trainierten Tiere, wobei vor allem die linksventrikuläre Masse erhöht war. Die Tiere zeigten eine deutlich verringerte Herzfrequenz in Ruhe, verglichen mit untrainierten Geschwistertieren. Die diastolische Relaxation und die koronare Belastbarkeit

der trainierten Tiere war signifikant erhöht. Diese Ergebnisse sind denen in Trainingsstudien an humanen Patienten vergleichbar.

Somit stellt das Schwimmtraining im Tierexperiment ein gutes Modell zur Erzeugung kardialen mechanischen Stresses dar. Die Trainingseinheiten werden unter ständiger Beobachtung der Tiere absolviert, sodass die Mäuse ständig sanft zum Weiterschwimmen animiert werden können. Im Vergleich zum Ausdauertraining auf dem Laufband, bei dem die Tiere durch Stromschläge angetrieben werden, sind sie so geringerem Stress ausgesetzt. Im Gegensatz zu Ratten neigen Mäuse während des Schwimmens nicht zu längeren Tauchphasen, so dass kardiale Trainingseffekte nicht wie im Rattenmodell beschrieben durch Hypoxie und Azidose beeinflusst werden (Geenen et al., 1988).

Um im zugrundeliegenden Experiment den Effekt des Trainings als Verstärkung der pathologischen HCM zu validieren, wurden als Vergleichsgruppe Wildtypgeschwisteriere dem selben Training unterzogen.