

## **5. Diskussion**

### **5.1. Fragestellung**

In der vorliegenden Studie wurde ein möglicher Effekt einer Plakophilin 4 Defizienz in einer Mauslinie auf die Entwicklung und Funktion des Herzens der Tiere mit zunehmendem Alter aufgrund chronischer Beanspruchung des Herzmuskels und/ oder als Folge erhöhter mechanischer Belastung bei Leistungstraining untersucht. Dies wurde mit Hilfe molekularbiologischer, histologischer und klinischer Untersuchungsmethoden unter folgender Fragestellung erörtert:

- Erfüllt Plakophilin 4 eine essentielle Aufgabe in der strukturellen Entwicklung und dem funktionellen Zusammenhalt des Herzgewebes?
- Zeigen sich klinische und/ oder histologische Veränderungen am Herzen der homozygot Plakophilin 4 defizienten Tiere mit zunehmendem Alter?
- Lassen sich die Veränderungen durch Training bei jüngeren Tieren hervorrufen, bzw. verstärken?

### **5.2. Echokardiographie**

#### **5.2.1. Diagnose der HCM**

Obwohl die hypertrophische Kardiomyopathie die häufigste aller Kardiomyopathien beim Menschen darstellt, wird die Diagnose der Erkrankung häufig durch die Variabilität der klinischen Symptomatik, des klinischen Verlaufs und der ursächlichen genetischen Vielfalt erschwert. Für die Diagnostik kommt somit gegenwärtig der Echokardiographie der größte Stellenwert zu. Neben der Messung der Art und des Ausmaßes der Hypertrophie lässt sich zudem eine mögliche Obstruktion der Ausflussbahn echokardiographisch feststellen.

Die Anwendung des hochfrequenten kardialen Ultraschall im Mausmodell zur Analyse der linksventrikulären Masse wurde bereits von einigen Autoren beschrieben (siehe 2.6) 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. Es konnte in einer umfassenden Studie gezeigt werden, dass die Echokardiographie als Hypertrophie-Screen einzelner Erkrankter innerhalb einer Kolonie transgener Mäuse geeignet ist. Der Ultraschall erwies sich hier als hervorragende nicht-invasive Methode innerhalb einer Population zwischen Wildtypen, heterozygoten Tieren mit milder Hypertrophie und Homozygoten mit stark ausgeprägter Hypertrophie zu unterscheiden.

Durch die nicht-invasive Ultraschalluntersuchung können die Stärken vor allem der Wände des linken Ventrikel gemessen werden. Über die sonographisch ermittelten Werte lassen sich im folgenden zahlreiche Funktionsparameter wie z. B. die Verkürzungsfraction (FS), die Ejektionsfraction (EF), die linksventrikuläre Masse (LV-Masse), das Schlagvolumen (SV) und die endsystolischen und –diastolischen Volumina (EDV; ESV) berechnen.

Die echokardiographische Untersuchung beider Gruppen erfolgte unter Inhalationsnarkose mit Isofluran.

Die Gruppe der einjährigen Tiere wurde mit dem Sonos 5500 untersucht. Das Gerät verfügt über einen 15 MHz Linearschallkopf für die 2D- und die M-Mode Einstellungen. Zur Doppleruntersuchung wurde ein 12 MHz Schallkopf verwendet. Im Gegensatz dazu wurde die Studie an der Gruppe der trainierten Mäuse mit dem Vevo 770 durchgeführt. Da dieses Gerät speziell für die Sonographie von Kleinnagern entwickelt wurde, kommt hier ein 30 MHz Linear- und Sektorschallkopf zum Einsatz. Die unter vergleichbaren Voraussetzungen und unter Verwendung gleicher Einstellungen erhobenen Messwerte sind daher zwar innerhalb der Gruppe, nicht jedoch untereinander vergleichbar.

Da in keiner der untersuchten Gruppen signifikante Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren erkennbar waren, werden die Ergebnisse im folgenden nicht geschlechtsspezifisch betrachtet.

### **5.2.2. Untersuchung der trainierten Tiere**

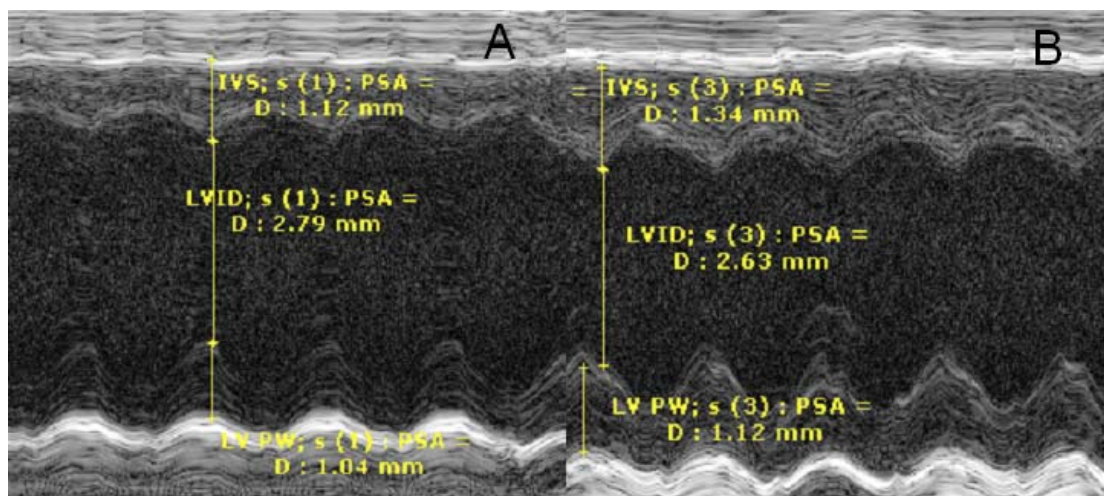
Die Gruppe von Wildtypmäusen und ihren homozygot Plakophilin 4 defizienten Geschwistertieren wurde im Alter von acht Wochen vor Beginn des Trainings vergleichend sonographisch untersucht. Die M-Mode Analyse zeigte keine signifikant unterschiedlichen Werte der linksventrikulären Maße. Sowohl die Stärke des interventrikulären Septums (IVS) wie auch die der freien Wand (LVPW) der linken Kammer waren bei allen untersuchten Mäusen vergleichbar. Ebenso konnten keine signifikanten Differenzen der Füllungsvolumina des linken Ventrikels festgestellt werden. Die sich daraus errechnenden Werte der

Verkürzungsfraction (FS) und der Ejektionsfraction (EF) des linken Herzens unterschieden sich nicht zwischen Wildtyp und PKP4<sup>gt</sup> Mäusen (**Tabelle 7; Abbildung 15**).

Im folgenden wurden die beiden Gruppen einem achtwöchigen Hochleistungstraining unterzogen. Durch Ausdauertraining wird die Druckbelastung und der mechanische Stress auf das Herz erhöht. Im gesunden Organismus wird so eine physiologische Anpassungsreaktion des Herzens hervorgerufen, die sogenannte physiologische Hypertrophie. Leistungssport wird bei genetisch bedingter hypertropher Kardiomyopathie als Trigger der Hypertrophie und als Risikofaktor für den plötzlichen Herztod (SD) beschrieben (Maron et al., 1982; Maron et al., 1996).

Im Anschluss an das achtwöchige Ausdauertraining wurden beide Versuchsgruppen erneut echokardiographisch untersucht, um mögliche Trainingseffekte zu validieren.

Mittels M-Mode Analyse konnte eine massive Hypertrophie des interventrikulären Septums (IVS) in den homozygot mutanten Mäusen festgestellt werden. Durch die Verdickung des Septums ist der Innendurchmesser der linken Kammer tendenziell im Vergleich zu den Wildtypgeschwistern verkleinert. Die freie Wand des linken Ventrikel ist bei beiden Gruppen gleichstark und zeigt keine Auffälligkeiten (**Tabelle 8; Abbildung 16**).



**Abbildung 40:**  
**Vergleichende Darstellung einer M-Modeaufzeichnung des linken Ventrikel im parasternalen Querachsenschnitt einer Wildtypmaus (A) und einer Plakophilin 4 defizienten Maus (B)**

Die Ventrikelverkürzungsfraction (FS), also die mögliche Verkürzung des Herzens von der Diastole zur Systole, angegeben in Prozent, ist in den transgenen Tieren deutlich erhöht. Die Hypertrophie des Herzens ist ein Anpassungsmechanismus an eine erhöhte Belastung des Organs, was zunächst in einer gesteigerten Kontraktionskraft des Muskels resultiert. Erst im weiteren Verlauf kann es als Folge zunehmender Fibrose und anhaltender Druckbelastung dann zu erhöhter Steifigkeit des Herzens und zur Abnahme der Kontraktilität kommen.

Folglich ist auch die Menge des ausgeworfenen Blutes der linken Kammer (EF) zunächst erhöht (**Tabelle 9; Abbildung 17**).

Die deutliche Einengung des linken Ventrikeldurchmessers wird auch an den erniedrigten enddiastolischen, bzw. endsystolischen Volumina (EDV; ESV) deutlich. Das Schlagvolumen (SV) ist nicht verändert, da die Hypertrophie des Herzens zunächst eine Verbesserung der Kontraktionskraft bewirkt, so dass das einströmende Blut in der Systole noch zuverlässig in den Körperkreislauf gepumpt werden kann (**Tabelle 10; Abbildung 18**).

Es ist davon auszugehen, dass das Leistungstraining auch bei den Wildtypmäusen eine Anpassungsreaktion des Herzens hervorruft, eine sogenannte physiologische Hypertrophie. In Trainingsstudien an Mäusen und Ratten konnten diese Effekte bereits gezeigt werden (Evangelista et al., 2003; Geenen et al., 1988; Kaplan et al., 1994).

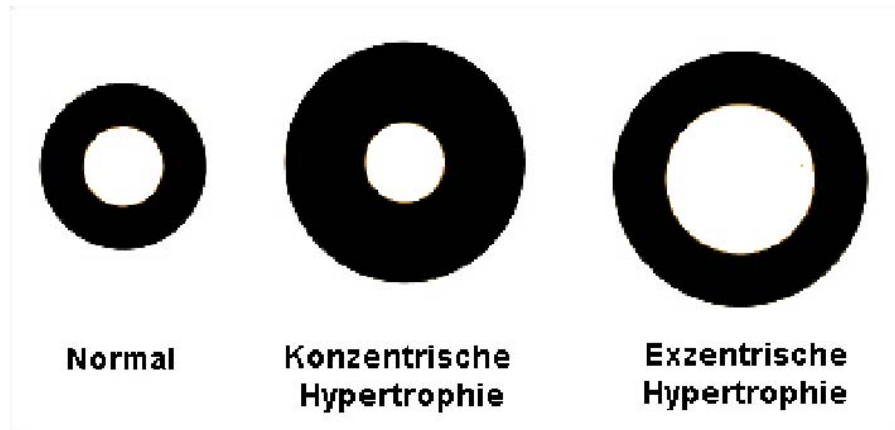
Auch beim Menschen kommt es als Folge einer sportlichen Belastung des Herzens von mehr als 5-6 Stunden/Woche häufig zur sogenannten physiologischen Hypertrophie. Das Verhältnis von enddiastolischem Volumen und Myokardmasse bleibt durch eine parallel laufende Ausprägung hierbei gleich (exzentrische Volumenhypertrophie), wichtige Funktionsparameter wie Verkürzungsfraction (FS), Auswurfraction (EF) und maximale systolische Wandspannung sowie diastolische Funktionsparameter bleiben in der Regel im Normbereich (Dickhuth et al., 1994; Mockel et al., 1996; Nihoyannopoulos et al., 1992).

Da sich die durchgeführte Studie mit der Entstehung einer pathologischen Hypertrophie nach vermehrter kardialer Belastung der mutanten Mäuse befasst, wurden die trainierten Wildtypmäuse als Vergleichsgruppe herangezogen.

### **5.2.3. Untersuchung der alten Tiere**

Die homozygot Plakophilin 4 defizienten Mäuse entwickeln mit zunehmendem Alter eine hypertrophe Kardiomyopathie des linken Ventrikel.

Die echokardiographische Untersuchung ergab ein signifikant verbreitertes interventrikuläres Septum (IVS). Ebenso konnte in diesen Tieren eine deutlich hypertrophierte freie Wand des linken Ventrikel (LVPW) festgestellt werden. Folglich ist die, sich aus diesen Werten ergebende Masse des linken Ventrikel (LV Mass) signifikant höher als bei der Vergleichsgruppe, was sich, bezogen auf das Körpergewicht der Tiere noch verdeutlicht (LV/BW Ratio). Der Innendurchmesser der linken Kammer (LVID) war, verglichen mit den Wildtypgeschwistern stark vergrößert (**Tabelle 11; Abbildung 23**). Die deutliche Hypertrophie des Septums und der freien Kammerwand in Verbindung mit einer Dilatation der Kammer entspricht dem Bild einer exzentrischen hypertrophen Kardiomyopathie



**Abbildung 41:**  
**Formen der Hypertrophie des Herzens**

Im klinischen Verlauf der hypertrophen Kardiomyopathie kommt es als Folge der Hypertrophie der Herzwände zunächst zu einer Verengung des Kammerolumens und zu einer gesteigerten Kontraktilität. Durch die hieraus resultierende erhöhte Druckwirkung auf die Kammerwände steigt wiederum der mechanische Stress. Beim Übergang von der hypertrophen Kardiomyopathie zur Herzinsuffizienz spielen Faktoren wie vermehrte Apoptose und Nekrose, sowie Akkumulation von Kollagenfasern (Fibrose) eine Rolle. Die Abnahme der Ventrikelwanddicke durch Kardiomyozytenverlust und die Vergrößerung des Ventrikelolumens (Dilatation) steigern den Wandstress. Der Mangel an kontraktilen Einheiten und die zunehmende Steifigkeit des Ventrikels durch Fibrose verringern die Auswurfleistung des Herzens immer weiter, bis es im Endstadium zu diastolischer und systolischer Fehlfunktion und somit zur Herzinsuffizienz kommt.

In der zugrundeliegenden Studie sind durch die Dilatation des linken Ventrikel sowohl das enddiastolische (EDV) wie auch das endsystolische Volumen (ESV) des Herzens erhöht (**Tabelle 12; Abbildung 24**). Das Schlagvolumen (SV) des Herzen bezeichnet die Menge an Blut, die die linke Herzkammer bei jedem Schlag in den Körperkreislauf pumpt. Es berechnet sich aus dem diastolisch größten Volumen (EDV) der linken Kammer abzüglich des systolisch kleinsten Volumens (ESV). Das Schlagvolumen (SV) ist bei den untersuchten PKP4<sup>9t</sup> Tieren erhöht. Bei der hypertrophen Kardiomyopathie handelt es sich in erster Linie um eine diastolische Funktionsstörung. Bei den einjährigen Tieren ist der linke Ventrikel bereits dilatiert und die Füllungsvolumina in Diastole wie auch in der Systole sind erhöht, jedoch befinden sich die Mäuse noch nicht im Herzversagen. Das Herz kontrahiert noch immer stark genug um einen Großteil der einströmenden Blutmenge in der Systole in den Körperkreislauf zu befördern.

Als Maß für die Kontraktionskraft des Herzens lässt sich die Ventrikelverkürzungsfraction (FS) errechnen. Fractional shortening (FS) bezeichnet die Verkürzung des Herzens während

des Pumpvorgangs. Berechnet wird sie aus dem größten und dem kleinsten Durchmesser der linken Herzkammer und als relativer Wert in Prozent angegeben.

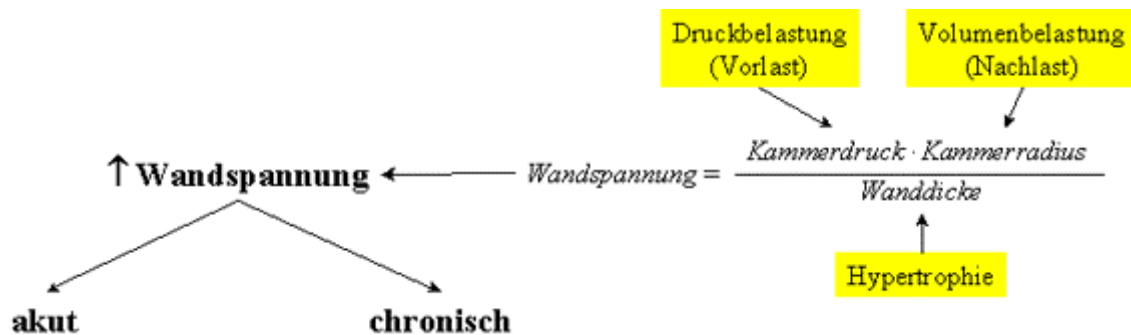
In der untersuchten Mauspopulation der transgenen Tiere ist die FS deutlich gegenüber den Vergleichstieren erniedrigt (**Tabelle 12; Abbildung 24**). Die Kontraktionskraft des hypertrophierten Herzen ist also verringert. Anfangs stellt die Hypertrophie einen positiven Anpassungsmechanismus an die chronische Stressbelastung des Herzen dar, der die, durch Überbelastung entstehende Wandspannung, kompensiert und die Aufrechterhaltung der Herzfunktion unter erschwerten Bedingungen gewährleistet. Langfristig bewirkt die erhöhte mechanische Belastung jedoch den Zelltod der Kardiomyozyten und die Einlagerung kollagener Fasern. Als Folge der zunehmenden Fibrose kommt es zu einer erhöhten Ventrikelsteifigkeit und somit zur Abnahme der Relaxations- und Kontraktionskraft des Herzens.

#### **5.2.4. Vergleich untrainierter einjähriger Mäuse mit trainierten jungen Tieren**

In der durchgeführten tierexperimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass Tiere mit einer Deletion im Gen für Plakophilin 4 sowohl im Alter, wie auch als Folge eines Ausdauertrainings eine linksventrikuläre hypertrophe Kardiomyopathie entwickeln. Nach einem achtwöchigen Schwimmtraining wurde sonographisch bei den 16 Wochen alten Mäusen eine Hypertrophie des interventrikulären Septums unter Einengung des linksventrikulären Volumens nachgewiesen. Die durch das Leistungstraining gesteigerte Herzaktivität erhöht den mechanischen Stress auf den Herzmuskel, wodurch eine Kaskade adaptiver Veränderungen in Gang gesetzt wird. Zunächst kommt es zu einer verlangsamten Kontraktion der einzelnen Muskelfasern, um den Energiehaushalt des Muskels konstant zu halten. Ergänzend erhöht sich die Zahl der Mitochondrien, die Sarkomere verbreitern sich, die Kardiomyozyten hypertrophieren. Je nach Spezies und Art der Hypertrophie werden zahlreiche kontraktile und zytoskelettale Proteine wie Desmin und Tritin vermehrt gebildet, um die Kontraktilität zu optimieren. Anzahl und Verteilung der kardialen Ionenkanäle verändern sich, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase im Sarkoplasmatischen Retikulum ist gestört.

Auf eine Erhöhung des Kammer- bzw. Aortendrucks (Nachlast) wie auch des enddiastolischen Volumens (Vorlast) reagiert das Herz im Sinne einer Kompensation zunächst mit einer Hypertrophie, so dass die Wandspannung gemäß der LaPlace-Formel annähernd konstant bleibt (**Abbildung 42**).

Im Stadium der konzentrischen Linksherzhypertrophie kann der linke Ventrikel somit trotz erhöhter Druckbelastung innerhalb des Ventrikels ein normales Schlagvolumen fördern.



**Abbildung 42:**  
**Formel nach LaPlace**

Zunächst ist das Herz mit Hilfe dieser Adaptationsmechanismen in der Lage die erhöhte Belastung zu kompensieren. Im weiteren Verlauf kommt es durch die erhöhte Wandspannung zu druckinduzierter Apoptose der Myozyten und zur vermehrten Einlagerung von Kollagen. Die reparative Fibrose des Gewebes und die große Anzahl kontraktile Proteine versteifen die Muskulatur, was in einer geringeren Gewebeelastizität und einem erniedrigten Relaxationsvermögen des Ventrikels resultiert. Durch den verkleinerten ventrikulären Innenraum als Folge der Hypertrophie und durch Störung der passiven Compliance des Myokard erhöht sich nun wiederum der enddiastolische Druck auf die Muskulatur. Hypertrophie der Myozyten, Apoptose und reparative Fibrose werden verstärkt.

Bei einem weiteren Anstieg der Nachlast reicht die Kontraktionskraft des Herzmuskels nicht mehr aus, um den Ventrikel vollständig zu entleeren, während eine exzessiv erhöhte Vorlast zu einer Überdehnung der Herzmuskelfasern jenseits ihrer optimalen Länge führt. Die Kammer dilatiert, was eine Erhöhung der Wandspannung zur Folge hat (**Abbildung 42**).

Bei anhaltender Belastung des Myokard durch steigenden Druck und mechanischen Stress geht die kompensierte Hypertrophie in eine dekomensierte Form über.

Durch echokardiographische Untersuchung der einjährigen Mäuse konnte gezeigt werden, dass Plakophilin 4 defiziente Tiere auch als Folge kardialer chronischer Belastung an einer hypertrophen Kardiomyopathie erkranken. Bei diesen Tieren wurde eine exzentrische Hypertrophie des interventrikulären Septums und der freien Wand des linken Herzens nachgewiesen. Der linke Ventrikel ist als Folge einer dekomensierten Hypertrophie deutlich dilatiert (**Tabelle 11**; **Abbildung 23**). Das Herz ist nicht mehr in der Lage, die aus der verminderten Relaxationsfähigkeit des Muskels resultierende diastolische Funktionsstörung zu kompensieren. Als Folge der starken Fibrose, der gesteigerten Gewebesteife und der Volumenüberlastung des Ventrikel in der Diastole kommt es zur Dilatation der hypertrophierten Wände. Die dekomensierte kardiale Hypertrophie ist charakterisiert durch

die progressive Vergrößerung der ventrikulären Kavität und resultiert als Folge diastolischer und systolischer Funktionsstörung und Arrhythmien im Herzversagen.

Arrhythmien sind bei der hypertrophen Kardiomyopathie die häufigste Ursache des plötzlichen Herztodes. In der untersuchten Mauslinie in der Gruppe der einjährigen Tiere wurden jedoch keine elektrokardiographischen Unregelmäßigkeiten gemessen.

### 5.3. Histologische Untersuchungen

Ergänzend zur klinischen Untersuchung mittels Echokardiographie konnte die deutliche Fibrose des Herzgewebes bei diesen Tieren auch histologisch und ultrastrukturell nachgewiesen werden. Die histologischen Gewebeschnitte wurden mit Sirius Red angefärbt, so dass sich kollagene Fasern rot darstellen. Anschließend wurden die Präparate mit Adobe Photoshop anhand der Pixelzahl quantitativ ausgewertet. Die Herzen der PKP4 defizienten Tiere wiesen einen 4,5 fach höheren Anteil an fibrotischem Gewebe verglichen mit ihren Geschwistern auf.

Die elektronenmikroskopische Analyse der Gewebeproben einjähriger Plakophilin 4 defizienter Mäuse verglichen mit ihren Wildtypgeschwistern zeigte deutliche Anzeichen pathologischer Prozesse auf ultrastruktureller Ebene.

Die zelluläre Architektur der Myozyten wies überwiegend nicht die gradlinige Anordnung des gesunden Myokards auf. Einzelne Myofibrillen verbreiterten und verschmälerten sich, sie divergierten in ihrem Verlauf und schienen stellenweise nicht mehr fest verankert (**Abbildung 26, Abbildung 31**). Die Fehlanordnung der Myozyten wurde in 95% menschlichen Herzen von, an einer HCM verstorbenen Patienten beobachtet. Dabei scheint das Ausmaß der Desorganisation des Myokards nicht mit der Stärke der Hypertrophie zu korrelieren.

Im Gegensatz dazu scheint das Ausmaß der interstitiellen reparativen Fibrose direkten Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des Herzens zu besitzen (Sabbah et al., 2000).

An zahlreichen Stellen wurden in den untersuchten Präparaten der mutanten Mäuse größere Ansammlungen quergestreifter kollagener Fasern gefunden (**Abbildung 30**). Die Fibrose stellt eine Art Ersatzgewebe zugrunde gegangener Kardiomyozyten dar. Die reparative Substitution funktioneller Herzmuskelzellen durch fibrotische Fasern hat eine vermehrte Muskelversteifung, eine verringerte Relaxationsfähigkeit und eine erschwerte Nährstoffversorgung des vitalen Gewebes zur Folge. Somit bedingen sich fibrotische und apoptotische Vorgänge im hypertrophierten Herzen in einer Art Teufelskreis. Durch die geringere Nährstoffzufuhr vitaler Zellen und der vermehrten Ischämie und Hypoxie des Gewebes werden Genexpressionsprogramme der Apoptose aktiviert. In den Bereichen, in denen die Kardiomyozyten durch Apoptose zugrunde gegangen sind, bildet sich fibrotisches



Ersatzgewebe, welches seinerseits wiederum die Versorgung weiterer Myozyten erschwert (Sabbah et al., 2000).

Als weitere mögliche Induktoren der Apoptose kardialer Zellen wurden eine erhöhte zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, die Formation freier  $\text{O}_2$ -Radikale und deutlich erhöhte Angiotensin II- und Norepinephringehalte verantwortlich gemacht (Communal et al., 1998; Gottlieb et al., 1994; Goussev et al., 1998; Kajstura et al., 1997; Tanaka et al., 1994).

In einer ultrastrukturellen und immunhistochemischen Untersuchung der linken Ventrikel von herzinsuffizienten Hunden wurde als Zeichen der Apoptose die Akkumulation des nuklearen Chromatin, die starke Einfaltung der Kern- und Zellmembran und die Disorganisation der Zellorganellen im Sarkolemma beschrieben (Sharov et al., 1998). Auch in der vorliegenden Arbeit waren in den mutanten Mäusen Nuklei mit teils stark invaginierter Kernmembran zu finden (**Abbildung 29**). Eine deutliche Erweiterung des Sarkolemma mit vermehrt stattfindender Pinozytose war ebenfalls nur in den Plakophilin 4 defizienten Tieren zu beobachten (**Abbildung 33**).

Die beschriebenen myokardialen Veränderungen im hypertrophierten Herzen einschließlich seiner Gefäße haben eine Ischämie und Hypoxie des Gewebes zur Folge. Der Herzmuskel fällt bei verstärkter Belastung somit in ein Energiedefizit. Die Hypertrophie stellt eine Adaptation zur Ökonomisierung des Energiestoffwechsels dar. Das adulte Herz produziert unter normalen Bedingungen ATP durch Oxidation langkettiger Fettsäuren in den Mitochondrien. Im Zuge der Hypertrophie kommt es aufgrund der Hypoxie zu einer Unterdrückung der Fettsäureoxidation. Zur Energiegewinnung wird nun wie im fötalen Herzen vermehrt Glukose eingesetzt. Dies kann als Adaptation gewertet werden, da der Sauerstoffverbrauch zur ATP-Gewinnung reduziert wird. Als Folge von Hypoxie und Energiedefizit des Gewebes wird ein verändertes Genexpressionsprogramm aktiviert, wodurch die Neubildung von Mitochondrien gefördert wird.

Im Elektronenmikroskop waren dicht gepackte Ansammlungen oft abnorm kleiner oder auffallend großer Mitochondrien zu finden (**Abbildung 28**). Durch die erhöhte Anzahl an Zellkraftwerken wird die Energiegewinnung zunächst gesteigert, um die Funktion des Herzmuskels aufrecht zu erhalten.

In den Proben der untersuchten einjährigen Tiere ließen sich jedoch bereits zahlreiche Mitochondrien finden, deren Cristae sich bereits strukturell in Auflösung befanden (**Abbildung 27**).

Des Weiteren waren zahlreiche aufgeweitete Zell-Zell-Kontaktstellen in den Plakophilin 4 defizienten Tieren auffällig (**Abbildung 32, Abbildung 33**). Der Zusammenhalt der Myozyten erfolgt wie eingangs beschrieben über *Intercalated Discs* unter Beteiligung von Desmosomen, *Adherens Junctions* und *Gap Junctions*. Um die ungestörte elektrische Weiterleitung der Aktionspotentiale von Myozyt zu Myozyt im Herzen zu gewährleisten, ist

eine feste Verbindung der Zellen notwendig. Die Interzellularspalten der mutanten Mäuse hingegen waren stellenweise stark erweitert, die punkt- und gürtelförmigen Adhäsionskontakte der jeweiligen Zellmembranen waren voneinander gelöst.

Da es sich bei Plakophilin 4 um ein Adhäsionsmolekül handelt, das sowohl an der Bildung von Desmosomen wie auch *Adherens Junctions* beteiligt ist, legen diese ultrastrukturellen Befunde die Vermutung nahe, dass bei Abwesenheit des Proteins im Herzen die Zelladhäsionskontakte einer chronischen mechanischen Belastung des Muskels nicht mehr standhalten können. Die Kontaktstellen zwischen den Kardiomyozyten lösen sich, die regelgerechte Kontraktion, Relaxation und Erregungsleitung des Myokard sind gestört und resultieren in einer kardialen Dysfunktion. Als adaptative Folge kommt es zur Muskelhypertrophie.

## 5.4. Schlussfolgerungen

Mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einer homozygoten Defizienz des Gens für Plakophilin 4 bei akuter mechanischer Belastung durch Ausdauertraining sowie bei andauernder chronischer Beanspruchung des Herzens im Alter eine hypertrophe Kardiomyopathie entwickeln. In beiden Gruppen wurde eine deutliche Hypertrophie des interventrikulären Septums nachgewiesen. Die Gruppe der trainierten Tiere zeigte zudem signifikant verringerte linksventrikuläre Diameter, eine verhältnismäßige Verbreiterung der freien Wand des linken Ventrikel deutete sich im Vergleich zu den Wildtypmäusen an. Bei den einjährigen PKP4 defizienten Mäusen war bereits eine ausgeprägte Dilatation des Innendurchmessers der linken Kammer und des linken Vorhofs messbar. Die freie Wand war bei diesen Tieren sowohl systolisch wie auch diastolisch deutlich verdickt.

Die histologischen und ultrastrukturellen Untersuchungen unterstützen die klinischen Befunde der Echokardiographie. In alten PKP4<sup>gt</sup> Mäusen konnte eine starke interstitielle Fibrose des Herzgewebes nachgewiesen werden. Zudem ließen sich elektronenmikroskopisch deutliche Indikatoren einer HCM wie Strukturverlust der Muskelfasern, Mitochondriose, apoptotische Zellkerne und Vermehrung des Sarkoplasmatischen Retikulums darstellen.

In den homozygot mutanten Mäusen fanden sich erweiterte Zellkontakte, sowohl Desmosomen wie auch *Adherens Junctions* der *Intercalated Discs* schienen teils voneinander gelöst.

Plakophilin 4 stellt als Adhäsionsmolekül einen essentiellen Baustein bei der Bildung von Desmosomen und *Adherens Junctions* dar. Die ultrastrukturellen Befunde lassen vermuten, dass bei erhöhter mechanischer Belastung des Herzmuskels die geschädigten

Zelladhäsionskontakte nicht mehr standhalten können und es somit zum „Auseinandereißen“ der Kardiomyozyten kommt.

Die Phänotypisierung der Plakophilin 4 Gene Trap Mauslinie erfolgte anhand klinischer, histologischer und molekularbiologischer Untersuchungen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Mutation im Plakophilin 4 Gen bei Mäusen eine hypertrophe Kardiomyopathie induziert. Somit stellt die beschriebene Mauslinie ein hervorragendes Tiermodell zur weiteren Erforschung pathophysiologischer Aspekte der kardialen Hypertrophie und neuen therapeutischen Ansätzen dar. Obwohl deutliche Unterschiede in der Herzfrequenz, im Vorkommen und den Eigenschaften von Ionenkanälen und in der Größe von Herzen zwischen Mäusen, größeren Säugetieren und dem Menschen bestehen, und eine Übertragung von Forschungsergebnissen von der Maus auf den Menschen nur mit Vorsicht möglich ist, geben die, in dieser Arbeit beobachteten Befunde doch Hinweis darauf, dass eine Plakophilin 4 Defizienz über einen längeren Zeitraum zu funktionellen und morphologischen Veränderungen des Herzens führen kann und dass diese Entwicklung durch Ausdauertraining akzeleriert werden kann. In der Vergangenheit wurden wichtige Erkenntnisse der Human- und Veterinärmedizin anhand muriner Tiermodelle gewonnen. Die hochgradige Konservierung des Genoms von Maus und Mensch ermöglicht die Erforschung genetischer Hintergründe humaner Erkrankungen anhand transgener Mauslinien. In weiterführenden Untersuchungen bleibt zu validieren, ob eine Mutation im Plakophilin 4 Gen auch in humanen Patienten für eine familiäre hypertrophe Kardiomyopathie verantwortlich gemacht werden kann. Vor allem unter dem Aspekt der schwierigen Diagnose der häufig zunächst symptomlosen HCM in der Praxis könnten so mit Hilfe von Genomanalysen Familienangehörige von HCM Patienten einfacher untersucht werden.

## **5.5. Weiterführende Arbeiten**

In der durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einer Deletion bzw. Mutation im Gen für Plakophilin 4 als Folge einer erhöhten oder chronischen Dauerbelastung des Herzmuskels eine hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) entwickeln. Somit stellt diese Mauslinie ein hervorragendes Tiermodell zur Erforschung pathophysiologischer Mechanismen der Erkrankung und möglicher Therapieansätze dar.

Bisher konnten als familiäre Ursachen einer HCM nur Gene identifiziert werden, die für die kontraktilen Proteine und damit das Filamentgleiten essentiell sind. Die Entstehung einer kardialen Hypertrophie aufgrund verminderter Zelladhäsion wurde bereits vermutet, konnte aber in der durchgeführten Studie anhand der Plakophilin 4 transgenen Mauslinie erstmalig gezeigt werden. Die Relevanz der Mutation des Plakophilin 4 Gens im menschlichen

Organismus als Auslöser einer kardialen Hypertrophie ist aufgrund der vorliegenden Arbeit denkbar. Ein Mutationsscreen in Blutproben humaner HCM Patienten könnte Aufschluss über das Vorkommen einer Veränderung des Gens im Menschen geben.

Mittels eines Haplotypenscreens konnte bereits gezeigt werden, dass eine Ungleichverteilung der vier untersuchten Haplotypenblöcke von Plakophilin 4 zwischen HCM Patienten und gesunden Spendern vorliegt. Hierbei werden SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms; Einzelbasenaustausche) des Gens bei den Probanden der Querschnittstudie analysiert. Mehrere SNPs zusammengefasst bilden einen sogenannten Haplotyp. Die Betrachtung solcher Haplotypen in genetischen Assoziationsstudien ist oft effizienter als die Betrachtung einzelner SNPs. Statistische Haplotyp-Rekonstruktionsverfahren ermöglichen die Identifizierung der wahrscheinlichsten Haplotypen. Ein Vergleich der Proben von HCM-Patienten und gesunden Spendern ermöglicht Unterschiede der Haplotypen-Häufigkeiten zwischen den Gruppen festzustellen.

Die Bilder der elektronenmikroskopischen Analyse lassen vermuten, dass durch den Verlust des festen Zusammenhaltes zwischen den Kardiomyozyten der Muskel nicht mehr fähig ist einer erhöhten Belastung standzuhalten. Als kompensatorische Folge kommt es zur Hypertrophie. Erneute elektronenmikroskopische Aufnahmen nach Markierung mit einem Antikörper gegen Plakophilin 4 könnten die genaue Lokalisation des Proteins im Herzen indizieren.

Erkenntnisse über die molekulargenetische Regulation bei Entstehung einer Hypertrophie könnte eine vergleichende Analyse der Herzen von Wildtypmäusen bzw. transgenen Tieren mit Microarrays liefern. Ein möglicherweise verändertes genetisches Expressionsprofil bei Vorliegen einer kardialen Hypertrophie könnte so vergleichend dargestellt werden, was einen genaueren Einblick in die Pathophysiologie der Erkrankung und Hinweise auf therapeutische Ansätze ermöglichen würde.