4. Ergebnisse

4.1. Echokardiographische Daten

Die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen wurden nach Altersklassen zusammengefasst. Hierbei wurden zum einen die Daten der Gruppe der 48 Wochen alten Mäuse untereinander verglichen. Da der Ultraschall dieser Mäuse im Gegensatz zur Untersuchung der jüngeren Tiere nicht mit dem Vevo 770, sondern mit dem Sonos 5500 durchgeführt wurde, wurden diese Daten getrennt betrachtet.

Die Versuchsgruppen der jüngeren Mäuse wurden nach Altersklassen, Genotyp und Trainingsstand zusammengefasst und miteinander verglichen (**Tabelle 6**).

| Alter | Wildtyp | | PKP4 ^{gt} | |
|------------------|---------|---|--------------------|----|
| | W | m | W | m |
| 8 Wochen (vor | 8 | 4 | 4 | 6 |
| Schwimmtraining) | | | | |
| 16 Wochen (nach | 8 | 4 | 4 | 6 |
| Schwimmtraining) | | | | |
| 48 Wochen | 14 | 6 | 13 | 13 |
| (untrainiert) | | | | |

Tabelle 6: Übersicht über die Anzahl der Tiere in den einzelnen Versuchsgruppen eingeteilt nach Genotyp und Geschlecht.

4.1.1. Untersuchungsergebnisse der untrainierten Tiere

Die Schwimmgruppen, bestehend aus zwölf Wildtypmäusen und zehn PKP4^{gt}-Mäusen, wurden im Alter von acht Wochen vor Beginn der Trainingseinheit vergleichend untersucht. Es deuteten sich tendenziell Veränderungen zwischen den Vergleichsgruppen an, welche jedoch zu diesem Zeitpunkt statistisch noch nicht signifikant waren. Im folgenden sollen hier einige ausgewählte Messwerte dargestellt werden (**Tabelle 6**).

| Parameter | WTuntrainiert | | PKP4 ^{gt} untrainiert | |
|-------------|---------------|----|--------------------------------|----|
| | MW±SE | n | MW±SE | n |
| Gewicht (g) | 22,39 ± 1,108 | 12 | 20,14 ± 1,221 | 10 |
| IVSd (mm) | 0,76 ± 0,008 | 12 | 0,77 ± 0,007 | 10 |
| LVIDd (mm) | 4,15 ± 0,121 | 12 | 3,88 ± 0,109 | 10 |
| LVPWd (mm) | 0,72 ± 0,006 | 12 | 0,71 ± 0,010 | 10 |
| IVSs (mm) | 1,18 ± 0,011 | 12 | 1,18 ± 0,018 | 10 |
| LVIDs (mm) | 2,80 ± 0,13 | 12 | $2,59 \pm 0,098$ | 10 |
| LVPWs (mm) | 1,06 ± 0,006 | 12 | 1,08 ± 0,016 | 10 |
| FS % | 32,56 ± 1,763 | 12 | 33,28 ± 1,916 | 10 |
| EF % | 58,90 ± 2,511 | 12 | 61,35 ± 2,679 | 10 |

Tabelle 7: Echokardiographieergebnisse ausgewählter Linksherzparameter bei 8 Wochen alten Wildtypbzw. transgenen Tieren vor Beginn des Trainings

Die Werte werden angegeben als arithmetischer Mittelwert (MW) ± Standardfehler (SE).

HF: Herzfrequenz, **IVSd/ IVSs:** Durchmesser des interventrikulären Septums in der Diastole/ Systole, **LVIDd/ LVIDs:** linksventrikulärer Durchmesser diastolisch/ systolisch, **LVPWd/ LVPWs:** Durchmesser der posterioren freien Wand des linken Ventrikel in der Diastole/ Systole

FS: Ventrikelverkürzungsfraktion, **EF:** Ejektionsfraktion

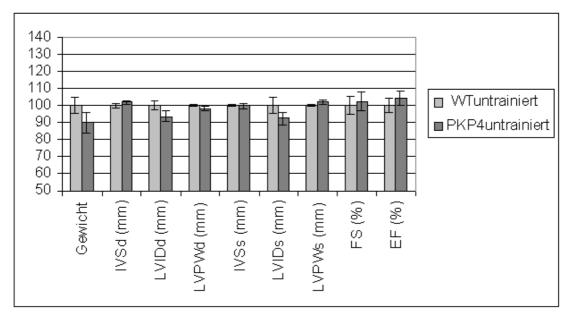


Abbildung 15:

Vergleich der ausgewähltenLinksherzparameter zwischen untrainierten Wildtypmäusen und untrainierten Geschwistertieren im Alter von 8 Wochen

Dargestellt sind neben Gewicht, die Stärken des cardialen Septums (IVS), der freien Wand des linken Ventrikels (LVPW) und des Innendurchmessers des linken Ventrikel (LVID).

4.1.2. Untersuchungsergebnisse der trainierten Tiere

Die Tiere wurden zunächst vor Beginn der Trainingseinheit im Alter von acht Wochen untersucht (**Tabelle 7**; **Abbildung 15**). Nach Absolvieren eines achtwöchigen Schwimmtrainings wurden die Mäuse im Alter von 16 Wochen erneut mit dem Vevo 700 einem Ultraschall unterzogen. Innerhalb der Gruppe der trainierten Tiere im Vergleich der Wildtyptiere mit den Plakophilin 4 defizienten Geschwistertieren ergaben sich signifikante Veränderungen vor allem im Bereich der Linksherzparameter.

Die Untersuchungsergebnisse sind in den folgenden Tabellen zusammenfassend dargestellt.

| | WT | | PKP4 ^{gt} | |
|-------------|--------------|----|--------------------|----|
| Parameter | MW±SE | n | MW±SE | n |
| Gewicht (g) | 25,5 ± 0,603 | 12 | 24,5 ± 0,558 | 10 |
| IVSd (mm) | 0,77 ± 0,010 | 12 | 0.89 ± 0.009 | 10 |
| LVIDd (mm) | 4,38 ± 0,102 | 12 | 4,13 ± 0,128 | 10 |
| LVPWd (mm) | 0,74 ± 0,015 | 12 | 0,75 ± 0,016 | 10 |
| IVSs (mm) | 1,18 ± 0,010 | 12 | 1,36 ± 0,018 | 10 |
| LVIDs (mm) | 3,18 ± 0,108 | 12 | 2,82 ± 0,127 | 10 |
| LVPWs (mm) | 1,09 ± 0,010 | 12 | 1,09 ± 0,011 | 10 |

Tabelle 8:

Echokardiographieergebnisse ausgewählter Linksherzparameter bei 16 Wochen alten trainierten Tieren

Die Werte werden angegeben als arithmetischer Mittelwert (MW) ± Standardfehler (SE).

HF: Herzfrequenz, **IVSd/ IVSs:** Durchmesser des interventrikulären Septums in der Diastole/ Systole, **LVIDd/ LVIDs:** linksventrikulärer Durchmesser diastolisch/ systolisch, **LVPWd/ LVPWs:** Durchmesser der posterioren freien Wand des linken Ventrikel in der Diastole/ Systole

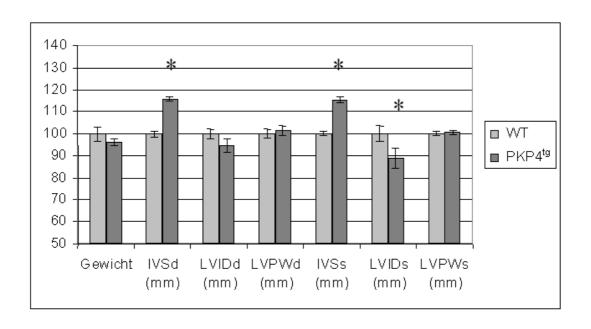


Abbildung 16: Vergleich der Linksherzparameter (Tabelle 8) zwischen trainierten Wildtypmäusen und Plakophilin 4 -/- Tieren im Alter von 16 Wochen

Dargestellt sind neben Gewicht die Stärken des kardialen Septums (IVS), der freien Wand des linken Ventrikels (LVPW) und des Innendurchmessers des linken Ventrikel (LVID). Signifikant unterschiedliche Werte (p-Wert < 0,05) sind mit "*" gekennzeichnet.

Die Gruppe der 16 Wochen alten Plakophilin 4 defizienten Mausmutanten wiesen im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern nach der achtwöchigen Trainingsphase eine signifikante Zunahme der interventrikulären Septums (IVSd: $0,77\pm0,010$, bzw. IVSs: $1,18\pm0,010$ bei Wildtypen und IVSd: $0,89\pm0,009$, bzw. IVSs: $1,39\pm0,018$ bei transgenen Tieren) auf. Der Innendurchmesser des linken Ventrikel war bei den transgenen Mäusen verringert (LVIDd: $4,38\pm0,102$ diastolisch, bzw. LVIDs: $3,18\pm0,108$ systolisch bei den Wildtypmäusen und LVIDd: $4,13\pm0,128$, bzw. LVIDs: $2,82\pm0,127$ bei transgenen Wurfgeschwistern). Die Stärke der posterioren freien Wand des linken Ventrikel wies keine signifikante Veränderung im Vergleich der Tiergruppen auf (**Tabelle 8**; **Abbildung 16**).

| | WT | | PKP4 ^{gt} | |
|------------|------------------------|----|---------------------|----|
| Parameter | MW±SE | n | MW±SE | n |
| FS % | 27,68 ± 1,445 | 12 | 32,11 ± 1,227 | 10 |
| EF % | 52,46 ± 2,115 | 12 | 59,41 ± 2,136 | 10 |
| LV Vol d | 91311,28 ± 5233,015 | 12 | 81319,69 ± 5926,580 | 10 |
| LV Vol s | 43538,55 ± 3599,010 | 12 | 33874,73 ± 3910,150 | 10 |
| LV Mass | 106,44 ± 5,983 | 12 | 110,42 ± 6,608 | 10 |
| IVS/LV P\d | 1,03 ± 0,021 | 12 | 1,19 ± 0,035 | 10 |
| IVS/LV P\s | 1,08 ± 0,015 | 12 | 1,25 ± 0,032 | 10 |
| RWT d | 0,17 ± 0,005 | 12 | 0,18 ± 0,006 | 10 |
| RWT s | 0.34 ± 0.013 | 12 | 0.39 ± 0.017 | 10 |
| PWTH % | 46,50 ± 2,109 | 12 | 44,92 ± 3,310 | 10 |

Tabelle 9:

Echokardiographieergebnisse ausgewählter Linksherzparameter bei 16 Wochen alten trainierten Tieren

Die Werte werden angegeben als arithmetischer Mittelwert (MW) ± Standardfehler (SE).

FS: Ventrikelverkürzungsfraktion, EF: Ejektionsfraktion, LV Vol d/ LV Vol s: linksventrikuläres diastolisches/ systolisches Volumen, LV Mass: errechnete Masse des linken Ventrikels, IVS/ LV P d/ IVS/ LV P s: Quotient des interventrikulären Septums geteilt durch die Stärke der posterioren freien Wand, RWT d/ RWTs: relative Wandstärke, PWTH: prozentuale Stärkenzunahme der posterioren Wand von Diastole zu Systole

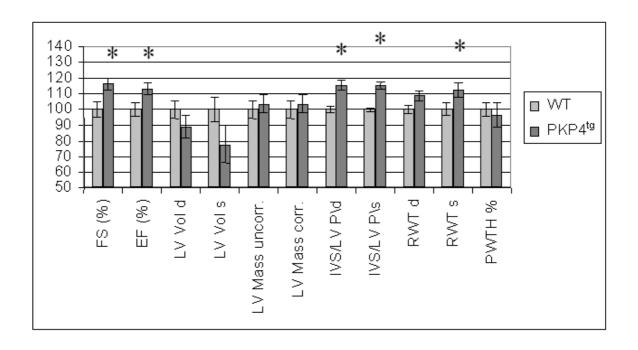


Abbildung 17: Vergleich ausgewählter Linksherzparameter (Tabelle 9) zwischen trainierten Wildtypmäusen und Plakophilin 4 -/- Tieren im Alter von 16 Wochen

Dargestellt sind errechnete funktionelle Werte wie die Verkürzungsfraktion (FS = ((LVIDd-LVIDs)/LVIDd)*100) des Herzens und die Ejektionfraktion

Das diastolische/ systolische Volumen des linken Ventrikels (LV Vol d / s) und die Masse des linken Ventrikel (LV Masse = ((IVSd+LVIDd+LVPWd)^3-LVIDd^3*1,055) errechnet anhand der M-Mode Werte. Angezeigt sind außerdem die signifikante Erhöhung des Quotienten aus der Stärke des Septums und der freien Wand des Ventrikel. Abschließend sind Unterschiede der relativen Wanddicke (RWTd: 2*PWth/LVIDd; bzw. RWTs: 2*PWth/LVIDs) und die prozentuale Dickenzunahme der posterioren freien Wand graphisch dargestellt. Signifikant unterschiedliche Werte (p-Wert < 0,05) sind mit "*" gekennzeichnet.

Im Vergleich zu den Wildtyptieren wiesen die Transgenen eine signifikante Erhöhung sowohl der fraktionellen Faserverkürzung (FS: $27,68\% \pm 1,445$ bei Wildtypen und $32,11 \pm 1,227$ bei Plakophilin -/- Tieren) als auch der Ejektionfraktion (EF: $52,46 \pm 2,115$ bei Wildtypen und $59,41 \pm 2,136$ bei den Transgenen) auf. Die Volumina des linken Ventrikel in Diastole und Systole waren bei diesen Tieren deutlich veringert, die Masse des Ventrikel im Gegensatz dazu vermehrt. Der Quotient aus interventrikulärem Septum und freier linksvenrikulärer Wand wies im Vergleich zum Wildtyp einen signifikanten Anstieg auf. Ebenso war die relative Wanddicke in Diastole und Systole bei den transgenen Tieren erhöht. Die prozentuale Zunahme der freien Wand nahm bei dieser Gruppe ab (**Tabelle 9**; **Abbildung 17**).

| | WT | | PKP4 ^{gt} | |
|---------------|---------------|----|--------------------|----|
| Parameter | MW±SE | n | MW±SE | n |
| EDV | 87,59 ± 4,835 | 12 | 76,67 ± 5,692 | 10 |
| ESV | 41,04 ± 3,330 | 12 | 30,90 ± 3,415 | 10 |
| EF nach | 53,53 ± 2,220 | 12 | 60,56 ± 1,793 | 10 |
| Teichholz | | | | |
| SV (EDV-ESV) | 46,56 ± 2,671 | 12 | 45,77 ± 2,520 | 10 |
| LV/BW Ratio | 4,16 ± 0,090 | 12 | 4,49 ± 0,154 | 10 |
| HZV (M-Mode) | 18,04 ± 1,121 | 12 | 17,51 ± 1,121 | 10 |
| Cardiac Index | 0,82 ± 0,05 | 12 | 0,91 ± 0,038 | 10 |

Tabelle 10:

Echokardiographieergebnisse ausgewählter Linksherzparameter bei 16 Wochen alten trainierten Tieren

Die Werte werden angegeben als arithmetischer Mittelwert (MW) ± Standardfehler (SE).

EDV: enddiastolisches Volumen, **ESV**: endsystolisches Volumen, **EF**: Ejektionsfraktion errechnet nach Teichholz, **SV**: Schlagvolumen errechnet aus EDV und ESV, **LV/ BW Ratio**: Masse des linken Ventrikel im Verhältnis zum Körpergewicht, **HZV**: Herzzeitvolumen, **Cardiac Index**: Herzminutenvolumen im Verhältnis zum Körpergewicht

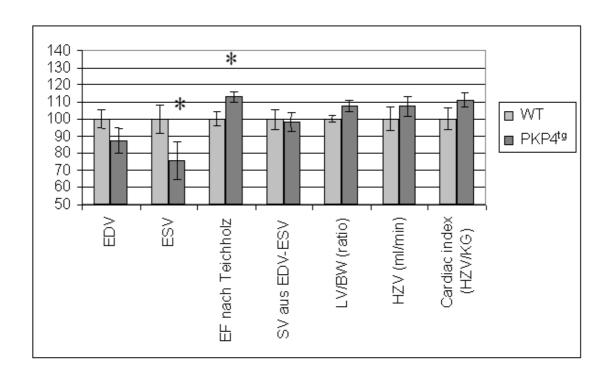


Abbildung 18: Vergleich funktioneller Werte (Tabelle 10) zwischen trainierten Wildtypmäusen und Plakophilin 4 -/- Tieren im Alter von 16 Wochen

Dargestellt sind errechnete Herzfunktionsparameter wie die enddiastolische sowie endsystolische Volumina (EDV = $(7/2,4+LVIDd))*LVIDd^3$, bzw. ESV = $(7/2,4+LVIDs))*LVIDs^3$) die Ejektionfraktion errechnet nach Teichholz (EF = (EDV-ESV)/EDV*100), das Schlagvolumen (SV = EDV-ESV) und das Herzzeitvolumen (HZV = SV/Ao R-R *60). Der Cardiac Index stellt eine Beziehung des Herzeitvolumens zum Körpergewicht dar. Außerdem zeigt die Graphik die Masse des linken Ventrikel in Bezug zum Körpergewicht (LV/BW Ratio). Signifikant unterschiedliche Werte (p-Wert < 0,05) sind mit "*" gekennzeichnet.

Die Füllungsvolumina der Herzen der trainierten Mutanten waren stark herabgesetzt. Errechnet aus diesen Parametern war ein Anstieg der Ejektionsfraktion zu beobachten. Das Herzzeitvolumen (HZV) der Plakophilin -/- Tiere zeigte einen Anstieg im Vergleich zu den Widtypen, was sich auch nach Bezugnahme auf das Körpergewicht (Cardiac Index) bestätigte. Die LV/ BW Ratio, also die Masse des linken Ventrikel bezogen auf das Körpergewicht des Tieres, wies im Vergleich mit Wildtypgeschwistertieren einen Anstieg auf (Tabelle 10; Abbildung 18).

5.1. Untersuchungsergebnisse der Tiere vor und nach dem Training

Die Gruppe der 22 Mäuse wurde vor Beginn des Trainings und nach Abschluss der achtwöchigen Trainingseinheit einer sonographischen Untersuchung mit dem Vevo 770 unterzogen. Um Effekte des Leistungstrainings auf die Wildtypmäuse bzw. ihre mutanten Geschwister zu verdeutlichen, wurden ausgewählte Parameter graphisch dargestellt. Die Graphiken zeigen die Gewichtszunahme, die Stärkenzunahme des interventrikulären Septums (IVS), die Zunahme der linksventrikulären Masse und die Entwicklung der enddiastolischen Volumina durch die erhöhte kardiale Belastung. Durch ständige Beobachtung und Animation der Tiere während des Trainings wurde gewährleistet, das alle Tiere vergleichbare Leistung erbrachten. Die absoluten Werte sind als prozentuale Steigerung über die Trainingsdauer wiedergegeben, wobei die Ausgangswerte zu Beginn des Trainings jeweils als 100% angegeben werden, da sich vor Trainingsbeginn keine signifikanten Unterschiede der Messungen zwischen Wildtypen und Mutanten feststellen ließen.

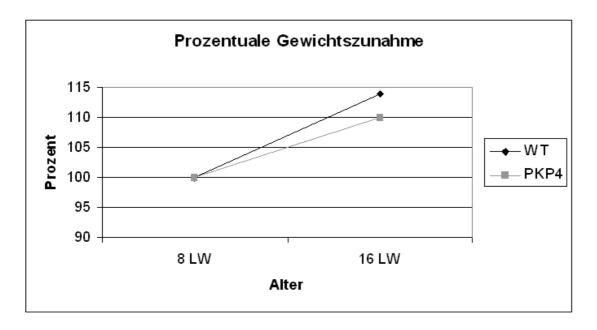


Abbildung 19: Prozentuale Gewichtszunahmen der Wildtypmäuse und ihrer Plakophilin 4 defizienten Geschwister vor, bzw. nach dem achtwöchigen Schwimmtraining (absolute Werte vgl. Tabelle 7; Tabelle 8)

Bei beiden Gruppen war eine Zunahme des Körpergewichts zu erkennen, da die Tiere sich während des Versuchs noch im Wachstum befanden. Eine Gewichtszunahme bedingt durch Muskelaufbau als Folge des Leistungstrainings war deshalb so nicht darstellbar. Transgene Mäuse haben generell ein etwas erniedrigtes Körpergewicht verglichen mit ihren Wildtypgeschwistern.

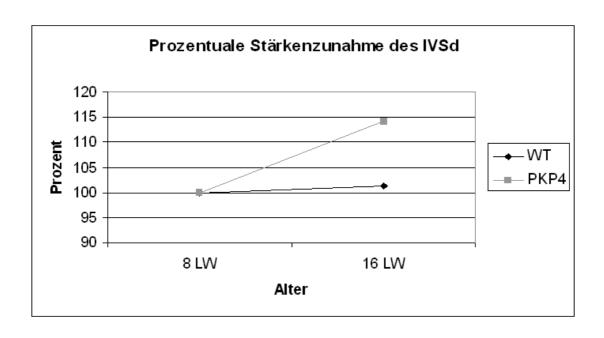


Abbildung 20: Prozentuale Zunahmen der Stärke des interventrikulären Septum (IVS) der Wildtypmäuse und ihrer Plakophilin 4 defizienten Geschwister vor, bzw. nach dem 8-wöchigen Schwimmtraining (absolute Werte vgl. Tabelle 7; Tabelle 8)

Während bei den Wildtypmäusen kaum eine Verdickung des interventrikulären Septums nach der Trainingsphase gemessen wurde, zeigte sich eine drastische Hypertrophie des Septums bei den mutanten Mäusen im Alter von 16 Wochen.

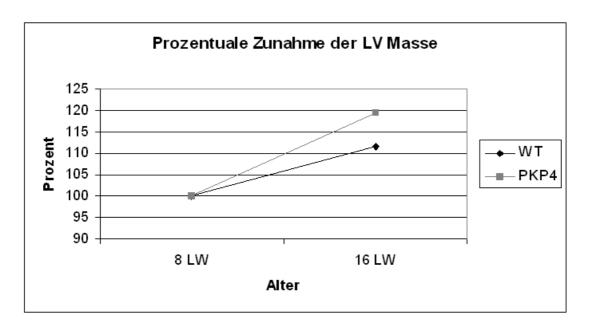


Abbildung 21: Prozentuale Zunahme der Masse des linken Ventrikel der Wildtypmäuse verglichen mit ihren mutanten Geschwistertieren (absolute Werte vgl. Tabelle 9)

Die deutlich erhöhte Masse des linken Ventrikel nach Abschluss des Trainings bei den PKP 4 transgenen Mäusen im Vergleich zu ihren Geschwistern resultierte vor allem aus der deutlichen Hypertrophie des Septums und dem verringerten Innendurchmessers der Kammer (vgl: LV Masse = ((IVSd+LVIDd+LVPWd)^3-LVIDd^3*1,055).

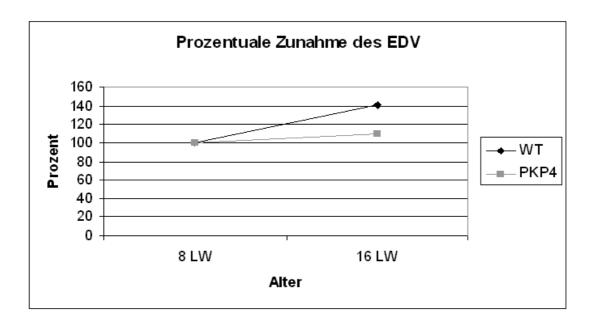


Abbildung 22: Prozentuale Zunahme der enddiastolischen Volumina des linken Ventrikel (EDV) der Wildtypmäuse und ihrer Plakophilin 4 defizienten Geschwister vor, bzw. nach dem 8wöchigen Schwimmtraining (absolute Werte vgl. Tabelle 10)

Die Graphik verdeutlicht die geringere Zunahme der enddiastolischen Füllungsvolumina der Plakophilin 4 defizienten Mäuse verglichen mit ihren Geschwistern zu Ende des Leistungstrainings. Diese Werte korrelieren mit den bereits dargestellten Werten des Innendurchmessers des linken Ventrikel.

4.1.3. Untersuchungsergebnisse der einjährigen Tiere

Im Vergleich einer Gruppe 48 Wochen alter untrainierter homozygot Plakophilin 4 defizienter Mäuse mit gleichaltrigen Wildtypen konnten zahlreiche Veränderungen vor allem im Bereich der Linksherzparameter festgestellt werden. Diese Tiere wurden mit dem SONOS 5500 in einer geblindeten Studie untersucht und ausgewertet.

Eine Auswahl der signifikant veränderten Daten sind in den folgenden Tabellen und Graphiken aufgeführt.

| | WT | | PKP4 ^{gt} | |
|-----------|---------------|----|--------------------|----|
| Parameter | MW±SE | n | MW±SE | n |
| Gewicht | 33,05 ± 1,235 | 20 | 30,82 ± 0,841 | 26 |
| IVSd | 0,73 ± 0,011 | 20 | 0,81 ± 0,011 | 26 |
| LVIDd | 3,91 ± 0,056 | 20 | 4,29 ± 0,053 | 26 |
| LVPWd | 0,78 ± 0,005 | 20 | 0,84 ± 0,014 | 26 |
| IVSs | 1,08 ± 0,014 | 20 | 1,15 ± 0,012 | 26 |
| LVIDs | 2,23 ± 0,033 | 20 | 2,55 ± 0,040 | 26 |
| LVPWs | 1,27 ± 0,015 | 20 | 1,32 ± 0,012 | 26 |

Tabelle 11:

Echokardiographieergebnisse ausgewählter Linksherzparameter bei 48 Wochen alten untrainierten Tieren

Die Werte werden angegeben als arithmetischer Mittelwert (MW) ± Standardfehler (SE).

HF: Herzfrequenz, IVSd/ IVSs: Durchmesser des interventrikulären Septums in der Diastole/ Systole, LVIDd/ LVIDs: linksventrikulärer Durchmesser diastolisch/ systolisch, LVPWd/ LVPWs: Durchmesser der posterioren freien Wand des linken Ventrikel in der Diastole/ Systole

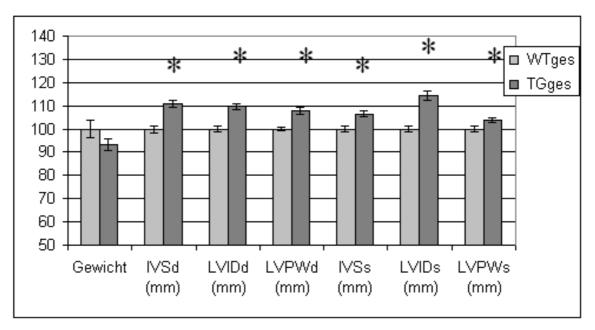


Abbildung 23:

Vergleich der Linksherzparameter (

Tabelle 11) zwischen untrainierten Wildtypmäusen und Plakophilin 4 -/- Tieren im Alter von 48 Wochen

Dargestellt sind neben Gewicht die Stärken des kardialen Septums (IVS), der freien Wand des linken Ventrikels (LVPW) und des Innendurchmessers des linken Ventrikel (LVID). Signifikant unterschiedliche Werte (p-Wert < 0,05) sind mit "*" gekennzeichnet.

Bei untrainierten p0071 defizienten Tieren die älter als 48 Wochen waren, konnte eine signifikante Vergrößerung verschiedener Parameter des linken Ventrikels festgestellt werden. Es wurden eine Verdickung sowohl des interventrikulären Septums (IVS: 0,73 mm \pm 0,011 in der Diastole, bzw. 1,08 mm \pm 0,014 in der Systole bei Wildtypmäusen und 0,81 mm \pm 0,011 diastolisch, bzw. 1,15 mm \pm 0,012 systolisch bei transgenen Wurfgeschwistern) als auch der posterioren freien Wand des linken Ventrikel (LVPW: 0,78 mm \pm 0,015 in der Diastole, bzw. 1,27 mm \pm 0,015 in der Systole bei Wildtyptieren und 0,84 mm \pm 0,014 diastolisch, bzw. 1,32 mm \pm 0,012 systolisch bei den Transgenen) festgestellt. Zudem wiesen die transgenen Mäuse eine signifikante Vergrößerung des linksventrikulären Innendurchmessers (LVID: 3,91 mm \pm 0,056 diastolisch, bzw. 2,23 mm \pm 0,033 systolisch bei den Wildtypen und 4,29 mm \pm 0,053, bzw. 2,55 mm \pm 0,040 bei den transgenen Mäusen) auf **Tabelle 11**; **Abbildung 23**).

| | WT | | PKP4 ^{tg} | |
|----------------|------------------|----|--------------------|----|
| Parameter | MW±SE | n | MW±SE | n |
| FS % | 42,85 ± 0,463 | 20 | 40,6 ± 0,358 | 26 |
| LV Mass | 105,72 ± 3,437 | 20 | 139,52 ± 4,388 | 26 |
| EDV | 66,81 ± 2,198 | 20 | 83,15 ± 2,443 | 26 |
| ESV | 16,97 ±0,627 | 20 | 23,71 ± 0,905 | 26 |
| EF nach | 74,54 ± 0,521 | 20 | 71,63 ± 0,442 | 26 |
| Teichholz | | | | |
| SV (EDV-ESV) | 49,83 ± 1,686 | 20 | 59,45 ± 1,641 | 26 |
| LV/BW Ratio | $3,23 \pm 0,082$ | 20 | 4,57 ± 0,143 | 26 |
| HZV (Mmode) | 21,68 ± 0,688 | 20 | 24,99 ± 0,911 | 26 |
| Cardiac Index | 0,37 ± 0,014 | 20 | 0,47 ± 0,017 | 26 |
| IVSd/ KG | 0,02 ± 0,001 | 20 | 0,03 ± 0,001 | 26 |
| LVIDd/ KG | 0,12 ± 0,004 | 20 | 0,14 ± 0,004 | 26 |
| LVPWd/ KG | 0,02 ± 0,001 | 20 | 0,03 ± 0,001 | 26 |

Tabelle 12:

Echokardiographieergebnisse ausgewählter funktioneller Parameter bei 48 Wochen alten untrainierten Tieren

Die Werte werden angegeben als arithmetischer Mittelwert (MW) ± Standardfehler (SE).

FS: Ventrikelverkürzungsfraktion, LV Mass: errechnete Masse des linken Ventrikels, EDV: enddiastolisches Volumen, ESV: endsystolisches Volumen, EF: Ejektionsfraktion errechnet nach Teichholz, SV: Schlagvolumen errechnet aus EDV und ESV, LV/ BW Ratio: Masse des linken Ventrikels im Verhältnis zum Körpergewicht, HZV: Herzzeitvolumen, Cardiac Index: Herzminutenvolumen im Verhältnis zum Körpergewicht, IVSd/ KG: Stärke des interventrikulären Septums in der Diastole bezogen auf das Körpergewicht, LVIDd/ KG: Stärke des linksventrikulären Innendurchmessers in der Diastole bezogen auf das Körpergewicht, LVPWd/ KG: Stärke der linksventrikulären posterioren freien Wand in der Diastole bezogen auf das Körpergewicht

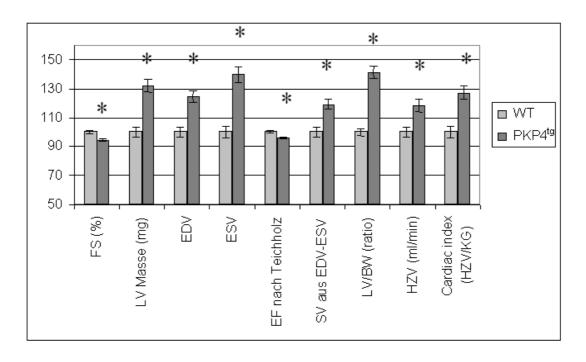


Abbildung 24: Vergleich funktioneller Werte (Tabelle 12) zwischen untrainierten Wildtypmäusen und Plakophilin 4 -/- Tieren im Alter von 48 Wochen

Dargestellt sind errechnete Herzfunktionsparameter wie die Verkürzungsfraktion (FS = ((LVIDd-LVIDs)/LVIDd)*100) des Herzens, enddiastolische sowie endsystolische Volumina (EDV = (7/2,4+LVIDd))*LVIDd^3, bzw. ESV = (7/2,4+LVIDs))*LVIDs^3) die Ejektionfraktion (EF = (EDV-ESV)/EDV*100), das Schlagvolumen (SV = EDV-ESV) und das Herzzeitvolumen (HZV = SV/Ao R-R *60). Der Cardiac Index stellt eine Beziehung des Herzeitvolumens zum Körpergewicht dar. Außerdem zeigt die Graphik die Masse des linken Ventrikel (LV Masse = ((IVSd+LVIDd+LVPWd)^3-LVIDd^3*1,055) errechnet anhand der M Mode Werte und in Bezug zum Körpergewicht (LV/ BW Ratio). Signifikant unterschiedliche Werte (p-Wert < 0,05) sind mit "*" gekennzeichnet.

Die Verkürzungsfraktion (FS) der transgenen Tiere war im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern signifikant erniedrigt. Die Masse des linken Ventrikel (LV Masse) der Mutanten war deutlich erhöht, was sich auch bezogen auf das Körpergewicht (LV/ BW Ratio) darstellen liess. Es zeigte sich eine Erhöhung sowohl des endiastolischen- (EDV), als auch des endsystolischen Volumens (ESV) bei den transgenen Mäusen. Ebenso wurden signifikante Veränderungen im Schlagvolumen (SV aus EDV-ESV) und der Ejektionsfraktion nach Teichholz (EF) deutlich, welche sich aus den Werten der Füllungsvolumina ableiteten. Das Herzzeitvolumen (HZV) war erhöht im Vergleich zu den Wildtypmäusen, was sich auch im Bezug auf das Körpergewicht (Cardiac Index) der Tiere verdeutlichte.

| | WT | | PKP4 ^{gt} | |
|-----------------|------------------|----|--------------------|----|
| Parameter | MW±SE | n | MW±SE | n |
| MV Vmax (cm/s) | 78,61 ± 2,051 | 20 | 69,25 ± 1,395 | 26 |
| MV PGmax | $2,35 \pm 0,096$ | 20 | 1,89 ± 0,092 | 26 |
| (mmHg) | | | | |
| MV PGmean | 1,26 ± 0,048 | 20 | $0,92 \pm 0,030$ | 26 |
| (mmHg) | | | | |
| MV E-Pkt (cm/s) | 78,22 ± 1,821 | 20 | 70,10 ± 1,412 | 26 |
| MV A-Pkt | 51,71 ± 1,544 | 20 | 42,63 ± 1,262 | 26 |
| (cm/s) | | | | |
| MV E/A | $1,52 \pm 0,030$ | 20 | 1,62 ± 0,038 | 26 |

Tabelle 13: Echokardiographieergebnisse ausgewählter Linksherzparameter bei 48 Wochen alten untrainierten Tieren

Die Werte werden angegeben als arithmetischer Mittelwert (MW) ± Standardfehler (SE).

MV Vmax (cm/s): maximale Geschwindigkeit des Mitraldopplers MV PGmean (mmHg): MV E Pkt.: höchster Punkt der E-Welle im Mitraldoppler, MV A Pkt.: höchster Punkt der A-Welle im Mitraldoppler, MV E/A: Quotient aus MV E Pkt. und MV A Pkt.

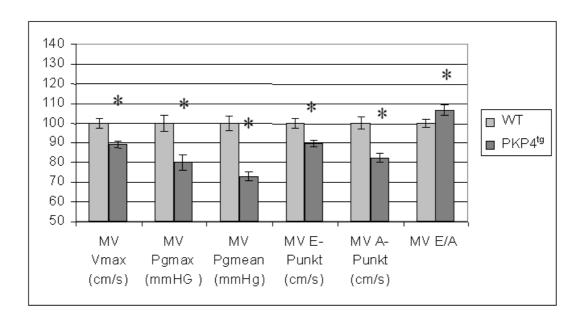


Abbildung 25:

Vergleich der Linksherzparameter (Tabelle 13) zwischen untrainierten Wildtypmäusen und Plakophilin 4 -/- Tieren im Alter von 48 Wochen

Dargestellt sind ausgewählte Parameter aus der Mitraldopplermessung wie die maximale Geschwindigkeit des Mitraldopplers (MV Vmax), der maximale und der Druck (MV PG max, bzw. MV PG mean) . Außerdem zeigt die Graphik den jeweils höchsten Punkt der E-, bzw. A-Welle (MV E-Pkt., bzw. MV A-Pkt.) und deren Quotient (MV E/A). Signifikant unterschiedliche Werte (p-Wert < 0,05) sind mit "*" gekennzeichnet.

In der Gruppe der untrainierten 48 Wochen alten Mausmutanten waren sowohl die maximale Mitralflussgeschwindigkeit (MV Vmax: 78,61 cm/s \pm 2,051 bei Wildtypmäusen und 69,25 cm/s \pm 1,395 bei Transgenen), als auch der maximale Druck signifikant vermindert. Als Folge dessen zeigten sich erniedrigte E-, bzw. A-Wellen (MV- E: 78,22 cm/s \pm 1,821, bzw. MV-A: 51,71 cm/s \pm 1,544 bei der Wildtypgruppe und MV-E: 70,10 cm/s \pm 1,412, bzw. MV-A: 1,62 cm/s \pm 0,038 in der Messung der transgenen Tiere) (**Tabelle 13**; **Abbildung 25**).

Nach intraperitonealer Gabe des Sympathomimetikums Isoprenalin war keine signifikante Änderung der Herzfunktion und der zuvor ermittelten Parameter feststellbar.

4.2. Elektrokardiographische Daten

Die 20 Wildtyp- bzw. 26 transgenen Mäuse im Alter von 48 Wochen wurden unter Isoflurannarkose elektrokardiographisch untersucht. Anschließend erfolgte eine zweite Aufzeichnung der Herzaktivität unter Isoprenalingabe. Die Daten wurden elektronisch und als Papier-EKG erfasst und im Anschluss an die Untersuchung von einer, hinsichtlich des Genotyps, geblindeten Person ausgewertet. Es konnten keine Auffälligkeiten in Rhythmusoder Kurvenverlauf der elektrischen Aktivität festgestellt werden. Im Vergleich zwischen den beiden Genotypen waren keine signifikanten Unterschiede messbar.

4.3. Daten der Untersuchung am isolierten Herzen nach Langendorff

Nach der Entnahme wurden die Herzen gewogen und sofort in der Langendorff-Apparatur mit Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert. Die Herzaktion wurde sowohl spontan nach AV-Block, als auch elektronisch stimuliert beurteilt. Anschließend wurde nach demselben Versuchsprotokoll unter kontinuierlicher Orciprenalin-Infusion (α - und β -Agonist) verfahren. Es wurden weder vermehrt auftretende spontane Arrhythmien nach AV-Block noch an den experimentell stimulierten Herzen beobachtet. Spontane Arrhythmien während Orciprenalin-Perfusion wurden in 3 der 25 transgenen Tiere beobachtet. Obwohl bei den 19 Wildtypmäusen keine spontanen Arrhythmien auftraten, sind diese Ergebnisse nicht als signifikant anzusehen. Induzierte Arrhythmien wurden in 16 der 25 Transgenen im Gegensatz zu 13 der 19 Wildtyptiere gesehen. Zusammenfassend waren keine auffälligen Unterschiede zu erkennen. Es konnten weder ohne, noch mit Orciprenalin-Infusion vermehrt spontane oder experimentell induzierte Arrhythmien in den Plakophilin 4 defizienten Tieren festgestellt werden.

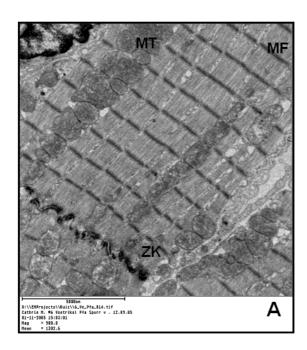
Die Dauer der einzelnen Aktionspotentiale bzw. der Aktivierungszeit (z.B. der Überleitungszeit vom AV-Knoten zu den Purkinjefasern) wies keine signifikanten Auffälligkeiten zwischen den Mausherzen der verschiedenen Genotypen auf.

Ebenso wurden keine signifikanten Unterschiede in der antegraden Überleitung des AV-Knotens oder der ventrikulären Refraktärzeit gemessen.

4.4. Elektronenmikroskopische Daten

Bewertet wurden elektronenmikroskopische Schnitte des linken Ventrikels von jeweils drei weiblichen, bzw. drei männlichen Wildtypmäusen und drei weiblichen, bzw. drei männlichen transgenen Geschwistertieren. Es handelte sich um untrainierte 52 Wochen alte Tiere. Die Struktur des Herzgewebes der Plakophilin 4 defizienten Mäuse wies deutliche Veränderungen im Vergleich zu den Wildtypen auf.

Im Folgenden sollen die morphologischen Unterschiede auf ultrastruktureller Ebene anhand einer Auswahl von Bildern dargestellt werden.



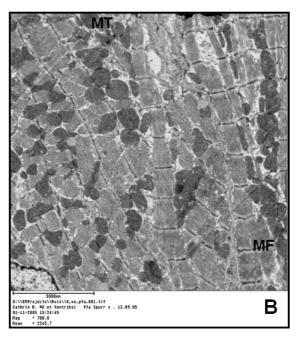


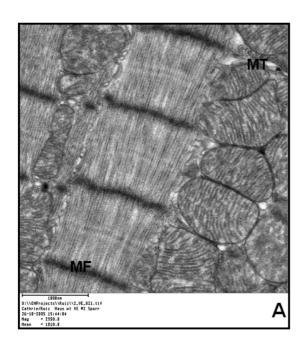
Abbildung 26:

5000 x Vergrößerung des Herzmuskelgewebes einer Wildtypmaus (A) und einer Plakophilin 4 defizienten Mutante (B); 52 Wochen alt

MT: Mitochondrien; MF: Myofibrillen; ZK: Zelladhäsionskontakt

Es zeigte sich eine deutliche Strukturveränderung des Plakophilin 4 defizienten Herzens im Vergleich zum Wildtyp. Die Myofibrillen (MF) wiesen einen ungeordneten Verlauf auf. Sie waren unterschiedlich dicht und kurz, verschieden stark verbreitert, teilweise auch abnorm

schmal, mit Verzweigungen, nichtparallelem, z.T. aberrierendem Verlauf und dreidimensional abnormer Anordnung. Die Mitochondrien (MT) befanden sich nicht, wie im Wildtypherz zu beobachten in Reihen zwischen den Myofibrillenpacketen angeordnet, sondern schienen herdförmig vermehrt (**Abbildung 26**)



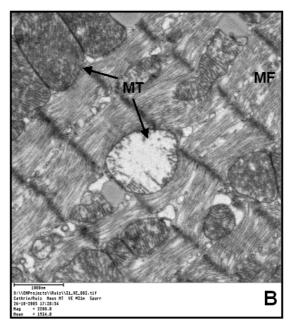
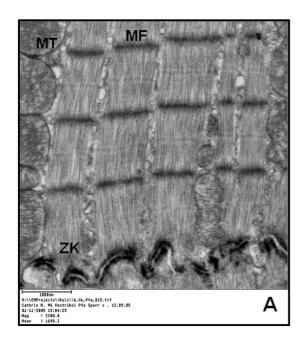


Abbildung 27:

1000 x Vergrößerung des Herzmuskelgewebes einer Wildtypmaus (A) und einer Plakophilin 4 defizienten Mutante (B); 52 Wochen alt

MT: Mitochondrien; MF: Myofibrillen

Die Myofibrillen (MF) waren schmaler und im Vergleich zum Wildtyp weniger gradlinig angeordnet. Die Mitochondrien (MT) schienen relativ klein und ohne vitale Mitochondriengranula. Die im Wildtyp deutlich erkennbaren mitochondrialen Christae sind im Präparat der transgenen Maus teilweise verloren (**Abbildung 27**).



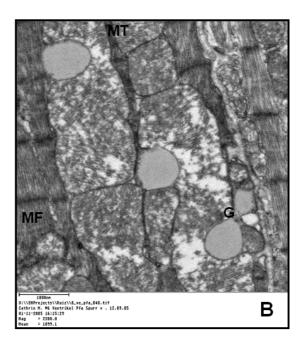


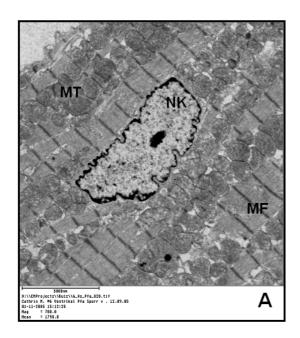
Abbildung 28:

1000 x Vergrößerung des Herzmuskelgewebes einer Wildtypmaus (A) und einer Plakophilin 4 defizienten Mutante (B); 52 Wochen alt

MT: Mitochondrien; MF: Myofibrillen; ZK: Zelladhäsionskontakt (intercalated disc); G: Granula

Die Mitochondrien (MT) im Präparat der Mausmutanten waren teils herdförmig angeordnet und drängten dabei die einzelnen Muskelfasern (MF) in ihrem Verlauf zurück.

Die regelgerechte Feinstruktur der Christae schien im Vergleich zu der des Wildtyps aufgelöst. In den Zwischenräumen der Mitochondrien fanden sich vermehrt Granula (G) (Abbildung 28).



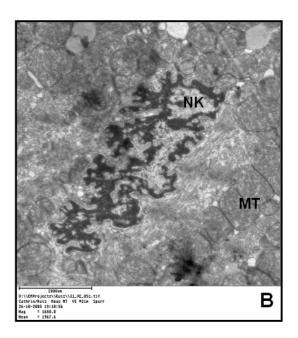
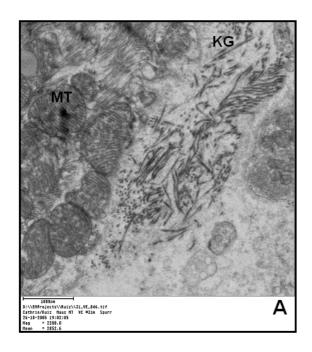


Abbildung 29: 5000 x Vergrößerung des Herzmuskelgewebes einer Wildtypmaus (A) und einer Plakophilin 4 defizienten Mutante (B); 52 Wochen alt MT: Mitochondrien; MF: Myofibrillen; NK: Nukleus

Im Herzmuskel der Plakophilin 4 defizienten Mäuse fanden sich Zellkerne, die eine stark invaginierte Zellkernwand aufwiesen, was als Zeichen der Apoptose gedeutet wurde.

Das, den Nukleus (NK) umgebende Gewebe ließ keine strukturierten Muskelfasern (MF) mehr erkennen und auch die Feinstruktur der Mitochondrien (MT) wirkte teils aufgelöst (**Abbildung 29**).



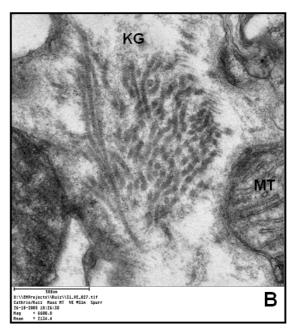
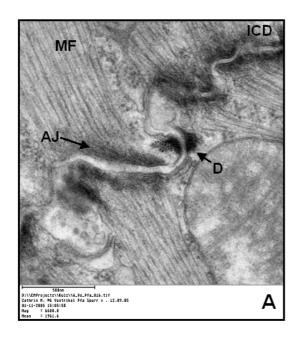


Abbildung 30: 5000 x Vergrößerung des Herzmuskelgewebes zweier Plakophilin 4 defizienter Mutanten (A,B); 52 Wochen alt

MT: Mitochondrien; KG: Kollagenfasern

Unter elektronenmikroskopischer Betrachtung der Präparate konnten in den Schnitten der transgenen Herzen immer wieder Kollagenfasern (KG) ausfindig gemacht werden. Häufig waren diese quergestreiften Faserbündel zwischen den herdförmig angeordneten Mitochondrien und den Myofibrillen (MF) angeordnet. Da im kardialen Gewebe der Wildtypen eine solche Ansammlung kollagener Fasern nicht beobachtet wurde, konnte kein Vergleichsbild aufgenommen werden (**Abbildung 30**).



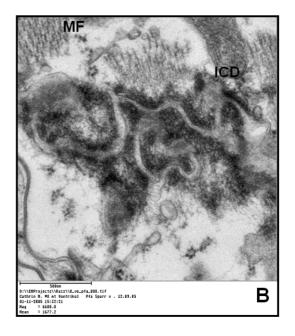
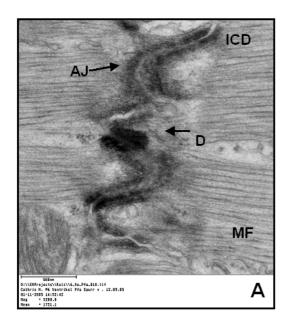


Abbildung 31:
500 x Vergrößerung des Herzmuskelgewebes einer Wildtypmaus (A) und einer Plakophilin 4 defizienten Mutante (B); 52 Wochen alt
MF: Myofibrillen; ICD: Zelladhäsionskontakt (Intercalated Disc); D: Desmosom; AJ: Adherens Junction

Die Verbindung zweier Muskelzellen im Präparat der Wildtypmaus erfolgt innerhalb der *Intercalated Discs* (ICD) sowohl über *Adherens Junctions* (AJ) als auch über punktförmig abgegrenzte Desmosomen (D). Eine feste, ebenmäßige Anheftung der Myofibrillen an die Ränder des gleichmäßig ausgeprägten Interzellularspaltes war im Elektronenmikroskop in Präparat A deutlich zu erkennen.

Im Gegensatz dazu wies das Bild des transgenen Herzens einen ungeordneten Verlauf des Zellkontaktes auf. Die Myofibrillen (MF) waren von ihren ursprünglichen Kontakten gelöst (**Abbildung 31**).



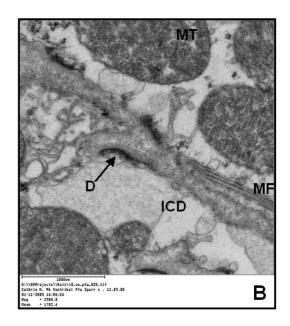


Abbildung 32:

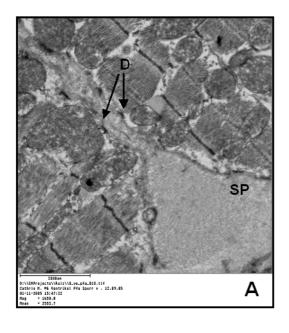
500 x Vergrößerung des Herzmuskelgewebes einer Wildtypmaus (A) und einer Plakophilin 4 defizienten Mutante (B); 52 Wochen alt

MF: Myofibrillen; **ICD**: Zelladhäsionskontakt (intercalated disc); **D**: Desmosom; **AJ**: zonula adherens (adherens junction); **MT**: Mitochondrium

Der Zelladhäsionskontakt der 52 Wochen alten Wildtypmaus stellte sich ebenmäßig dar. Der Zusammenhalt der Zellen innerhalb der *Intercalated Disc* erfolgte zum einen über punktuelle Desmosomen, zum anderen über gürtelförmig angeordnete *Adherens Junctions*. Der Interzellularspalt war gleichmäßig ausgeprägt und zu beiden Seiten waren die einzelnen Muskelfasern fest angeheftet.

Vergleichend hierzu stellte sich der Zellkontakt in der Plakophilindefizienten Maus in einem ungeordneten Verlauf dar.

Der Interzellularspalt war erweitert, die desmosomale Verbindung beider Seiten gelöst. Nur vereinzelt fanden sich noch Anheftungspunkte von Muskelfasern an dieser Zellgrenze. Ein stabiler Zusammenhalt beider Zellen miteinander schien nicht mehr gegeben (**Abbildung 32**).



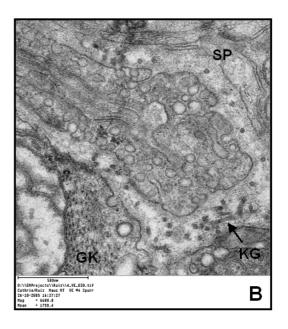


Abbildung 33: 2000 x Vergrößerung des Herzmuskelgewebes zweier Plakophilin 4 defizienten Mutanten (A,B); 52 Wochen alt

D: Desmosom; **KG**: Kollagen; **SP**: Sarkoplasma; **GK**: Glycogen

Die linke Abbildung eines transgenen Herzens zeigt zwei, sich voneinander lösende Zellen. Auf beiden Seiten des Zellkontaktes ließen sich jeweils Reste von Desmosomen erkennen. Der Interzellularspalt füllte sich vermehrt mit extrazellulärer Matrix. Die angrenzende muskuläre Struktur schien insgesamt ungeordnet.

Auf der Abbildung rechts ist ein Ausschnitt des Sarkoplasma in der Mutante zu sehen. Es fanden sich zahlreiche Glycogengranula und kollagene Fasern. Im Sarkoplasma fand vermehrt Mikropinozytose statt (**Abbildung 33**).

4.5. Histologische Daten

4.5.1. LacZ-Färbung

Zum Nachweis der Genexpression wurde eine LacZ Färbung verschiedener Organe jeweils von vier Wildtypmäusen, drei Heterozygoten und vier PKP4^{gt}-Mutanten durchgeführt. Die Gefrierschnitte von Herz, Aorta, Niere, Gehirn, Leber und Lunge wurden anschließend unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Die Ergebnisse sind im folgenden anhand einiger Beispiele von Niere und Herz dargestellt.



Abbildung 34: LacZ Färbung der Niere; Wildtyp (A), Heterozygot (B), Homozygot (C)

Die blaue Färbung weist LacZ nach und indiziert somit den Einbau der *gene trap* Kassette in die Zellen der Maus. Der Gefrierschnitt der Wildtypniere wies keinerlei LacZ-Färbung auf. Im Gegensatz dazu war im Präparat der heterozygot mutanten Maus bereits eine leichte Blaufärbung, vor allem im Bereich des Nierenmarks, erkennbar. Besonders deutlich färbte sich das Nierenmark im homozygot PKP4^{gt} Tier an. Auch die äußeren Bezirke der Nierenrinde waren stark blau gefärbt. Der innere Bereich der Nierenrinde, in dem sich die zentral gerichteten auf- und absteigenden Tubuli befinden, war diffus gefärbt (**Abbildung 34**).

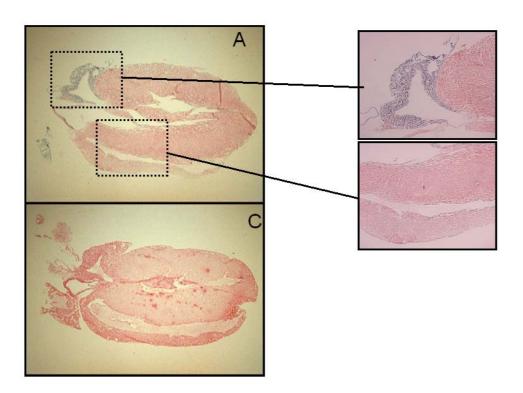


Abbildung 35: LacZ-Färbung eines Längsschnittes des Herzens einer homozygoten Mutante (A) und einer Wildtypmaus (B)

Im Vergleich zum Wildtyppräparat zeigte das Herz der Plakophilin 4 defizienten Maus eine Blaufärbung vor allem im Bereich der Vorhöfe. Das Myokard wies eine diffuse Färbung des LacZ auf, wobei sich das Endokard linear stärker anfärben liess (**Abbildung 36**).

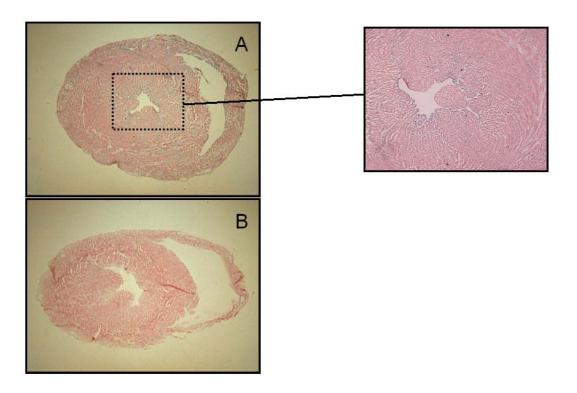
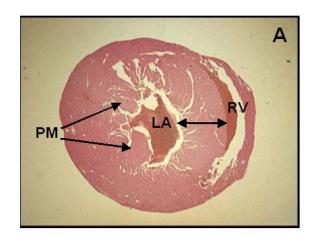


Abbildung 36: LacZ-Färbung eines Querschnittes des Herzens einer homozygoten Mutante (A) und einer heterozygoten Maus (B)

Auch im Herzquerschnitt wurde die diffuse Blaufärbung im Myokard des Ventrikels der Mutante deutlich. Im Vergleich dazu war bei der heterozygoten Maus nur eine schwache Färbung erkennbar (**Abbildung 37**).

4.5.2. Hämatoxylin Eosin Färbung

Die Herzen von je drei Wildtyp- bzw. Plakophilin 4 Mäusen wurden entnommen und in Paraffin fixiert. Die, mit Hilfe eines Mikrotoms auf Papillarmuskelebene angefertigten Schnitte wurden anschließend mit Hämatoxilin Eosin angefärbt und unter einer Lupe und unter dem Lichtmikroskop beurteilt.



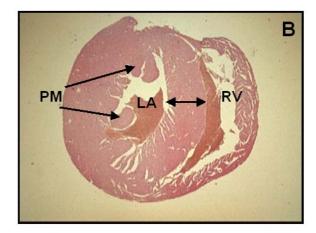


Abbildung 37:
HE gefärbte Herzquerschnitte einer Plakophilin 4 defizienten Mutante (A) und einer Wildtypmaus (B) auf Höhe der Papillarmuskeln
LV: linker Ventrikel; RV: rechter Ventrikel; PM: Papillarmuskeln

Der mit Hämatoxilin Eosin angefärbte Querschnitt der Herzens wurde angefertigt um die echokardiographisch gemessene Hypertrophie der Wände des linken Ventrikel im histologischen Präparat zu visualisieren. Im Vergleich zur Wildtypmaus erschienen im Schnitt der PKP4^{tg} sowohl das interventrikuläre Septum wie auch die posteriore frei Wand des Ventrikel dicker. Auch die Papillarmuskeln wirkten im Präparat der Mausmutante gedrungener als im Herzen der Geschwistermaus (**Abbildung 37**).

4.5.3. Sirius Red Färbung

Die Herzen von je 3 Wildtyp- bzw. PKP4^{tg} Mäusen wurden entnommen und in Paraffin fixiert. Die Schnitte wurden im folgenden mit Sirius Red gefärbt. Unter standardisierten Bedingungen wurde eine repräsentative Anzahl mikroskopischer Bilder aufgenommen. Anschließend konnte die Rotfärbung des kollagenen Gewebes anhand ihrer Pixelzahl mit Hilfe von Adobe Photoshop festgestellt und ausgewertet werden (Dahab et al., 2004).

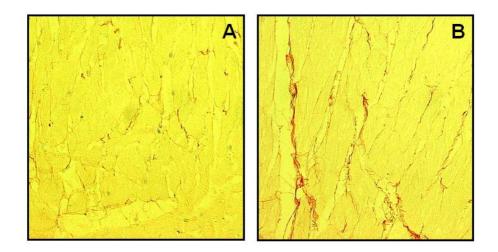


Abbildung 38: Sirius Red gefärbtes Herzgewebe einer Wildtypmaus (A) und einer Plakophilin 4 defizienten Mutante (B)

Rot: Kollagen; Gelb: Muskulatur

Das Herzgewebe der mutierten Mäuse wies einen erhöhten Anteil an Kollagen im Vergleich zum Präparat des Wildtypen auf (**Abbildung 38**). Die Rotfärbung wurde nach einem standardisierten Verfahren anhand der Pixelzahl der genannten Bereiche quantifiziert und mit Hilfe des students T-Test ausgewertet.

Die statistisch signifikante Abweichung des Kollagenanteils am Herzgewebe im Vergleich zum Wildtyp ist im folgenden graphisch dargestellt (**Abbildung 39**).

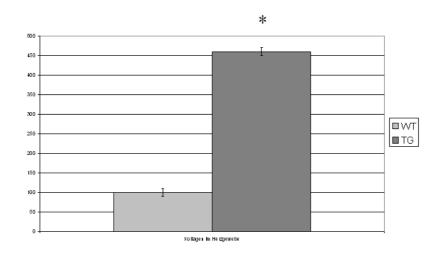


Abbildung 39:
Anteil fibrotischen Gewebes am Herzgewebe einer Wildtypmaus im Vergleich zu einem Plakophilin 4 defizienten Geschwistertier
Signifikant unterschiedliche Werte (p-Wert < 0,05) sind mit "*" gekennzeichnet.