

Aus der Anatomischen Anstalt

Lehrstuhl Anatomie I – Vegetative Anatomie

Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Jens Waschke

Modulation der Adhäsion und Erregungsweiterleitung in Kardiomyozyten

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Bernd Markus Erber

aus

Schrobenhausen

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jens Waschke

Mitberichterstatter: PD Dr. Christoph Küper

Prof. Dr. Hans Theiss

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2019

Für Oma und Opa

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Anatomie und Funktion des Herzes	1
1.2	Histologie des Herzes	3
1.3	Aufbau der Glanzstreifen	6
1.4	Regulation der Zellhaftung.....	8
1.4.1	Charakteristika der Kohäsion von Kardiomyozyten	8
1.4.2	Die Bedeutung der PKC für Zelladhäsion und Gap Junction-Funktion.....	9
1.5	Grundlagen der arrhythmogenen Kardiomyopathie.....	11
1.5.1	Epidemiologie	11
1.5.2	Genetischer Hintergrund	12
1.5.3	Klinische Präsentation und Diagnostik	13
1.5.4	Therapie.....	14
1.6	Einsatzbereiche zyklischer Peptide	15
2	Fragestellung	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Antikörper und weitere Reagenzien	18
3.2	Kultivierung von HL-1-Kardiomyozyten.....	22
3.3	Immunfärbungen	24
3.4	Proteinquantifizierung	25
3.5	Elektrophorese und Western Blot-Analyse	26
3.6	Immunpräzipitation	28
3.7	siRNA-vermittelte Hemmung der Dsg2- und Pg-Expression	29
3.8	Messung der Ca ²⁺ -Konzentration	30
3.9	Dispase-basierter Dissoziationsansatz.....	32
3.10	Mikro-Elektroden-Messungen.....	33

3.11	Herzpräparation und -perfusion nach Langendorff	37
3.12	Statistik.....	40
4	Ergebnisse.....	41
4.1	Einfluss von Trp und cAMP auf die Höhe der intrazellulären Ca ²⁺ - Konzentration	41
4.2	Wiederherstellung der physiologischen Verteilung von Dsg2 und Cx43 durch Dsg2-LP und cAMP bei desmosomalem Haftungsverlust.....	44
4.3	Stärkender Effekt von Dsg2-LP und cAMP auf die Kardiomyozytenhaftung bei Störung der desmosomalen Haftung	47
4.4	Verbesserung der Erregungsweiterleitung durch Dsg2-LP und cAMP bei Störung der desmosomalen Haftung	53
4.5	Rolle der PKC in der Funktionsweise des Dsg2-LP	60
4.5.1	Rolle der PKC für die geregelte Erregungsweiterleitung bei Depletion von Pg.....	60
4.5.2	Beeinflussung der PKC-abhängigen Cx43-Phosphorylierung durch Dsg2- LP bei desmosomalem Haftungsverlust.....	65
4.6	Assoziation von Cx43, Dsg2 und β 1-AR	68
4.7	Verbesserung der Erregungsweiterleitung durch Dsg2-LP im ex-vivo Pg-Knockout-Mausmodell	69
5	Diskussion	72
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	72
5.2	Interpretation der Ergebnisse.....	73
5.2.1	Der Glanzstreifen als funktionelle Einheit	73
5.2.2	Der Mechanismus der protektiven Wirkung von Dsg2-LP und cAMP auf die Zelladhäsion	73
5.2.3	Rolle der PKC für den Funktionsmechanismus des Dsg2-LP	75
5.2.4	Beeinflussung der Funktion und Lokalisation der Gap Junctions durch desmosomale Haftung	77
5.2.5	Die protektive Wirkung von cAMP auf die Erregungsweiterleitung.....	78

5.2.6	Reduktion der Arrhythmie durch Dsg2-LP im ex-vivo Pg-Knockout-Mausmodell	79
5.3	Diskussion der Methoden	80
5.4	Ausblick	82
6	Zusammenfassung	83
7	Literaturverzeichnis	85
8	Anhang	94
8.1	Abkürzungen	94
8.2	Zusammensetzung der Lösungen und Chemikalien	97
8.3	Danksagung	103
8.4	Eidesstattliche Versicherung	104

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Funktion des Herzes

Das Herz ist ein aus einer rechten und linken Hälfte bestehender, etwa faustgroßer Hohlmuskel und steht im Zentrum des Blutkreislaufs (Waschke et al., 2015). Dabei ist es als Druck- und Saugpumpe für den beständigen, rezirkulierenden Transport des Blutes innerhalb des Blutkreislaufs verantwortlich. Die rechte Herzhälfte ist für den Blutfluss im Lungenkreislauf, die linke Herzhälfte für den Blutfluss im Körperkreislauf zuständig. Die beiden Herzhälften, die durch ein Septum voneinander getrennt sind, bestehen jeweils aus einem Vorhof (Atrium), der das Blut aus dem jeweiligen Kreislauf empfängt, und einer Kammer (Ventriculus), die das Blut in den Kreislauf zurückpumpt. Die Vorhöfe sind in ihrer Anordnung den Kammern vorgeschaltet. Physiologisch ist die linke Kammer mit 10-12mm Wandstärke am kräftigsten, da sie den höchsten Druck aufbauen muss. Das Blut verlässt die linke Kammer über die Aorta, die rechte Kammer über den Truncus pulmonalis in den Kreislauf (Schmitz und Aumüller, 2014) (siehe Abbildung 1).

Die Pumpwirkung des Herzes wird durch einen rhythmischen Wechsel zwischen Kontraktion (Systole) und Erschlaffung (Diastole) erzeugt. Während der Systole wird sauerstoffarmes Blut über die rechte Herzhälfte in den Lungenkreislauf, über die linke Herzhälfte sauerstoffreiches Blut in den Körperkreislauf transportiert. Während der Diastole werden die Kammern anschließend mit Blut befüllt. Die Herzklappen, die zwischen den Vorhöfen und Kammern sowie den Kammern und Aorta bzw. Truncus pulmonalis liegen, sorgen als Ein-Weg-Ventile durch rhythmisches Schließen und Öffnen für den gerichteten Transport des Blutes (Hoth et al., 2012).

Das Herz wird über die Herzkranzgefäße mit Blut versorgt. Aus dem Anfangsteil der Pars ascendens der Aorta entspringen die beiden Koronararterien, deren Äste im weiteren Verlauf von außen in das Myokard eindringen und es so versorgen (Hoth et al., 2012).

Über das hierarchisch organisierte Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystem schlägt das Herz autonom. Das Reizleitungssystem besteht aus modifiziertem Herzmuskelgewebe. Der Sinusknoten ist dabei das übergeordnete Zentrum und fungiert mit der höchsten Eigenregungsfrequenz als Schrittmacher der Herzaktion. Der AV-Knoten, der bei einem Ausfall des Sinusknotens selbst die Schrittmacherfunktion übernehmen kann, hat als zweite Station des Reizleitungssystems vor allem die Funktion

Einleitung

einer Verzögerung der Erregungsweiterleitung zwischen Vorhof und Kammer, um diese optimal mit Blut füllen zu können. Über HIS-Bündel und Kammerschenkel wird die Erregung zu den Purkinje-Fasern weitergeleitet, die sie schließlich auf das Arbeitsmyokard übertragen. In den Zellen des Reizleitungsmyokards und des Arbeitsmyokards breitet sich die Erregung überwiegend über Gap Junctions gleichmäßig über das gesamte Myokard aus (Veeraraghavan et al., 2018).

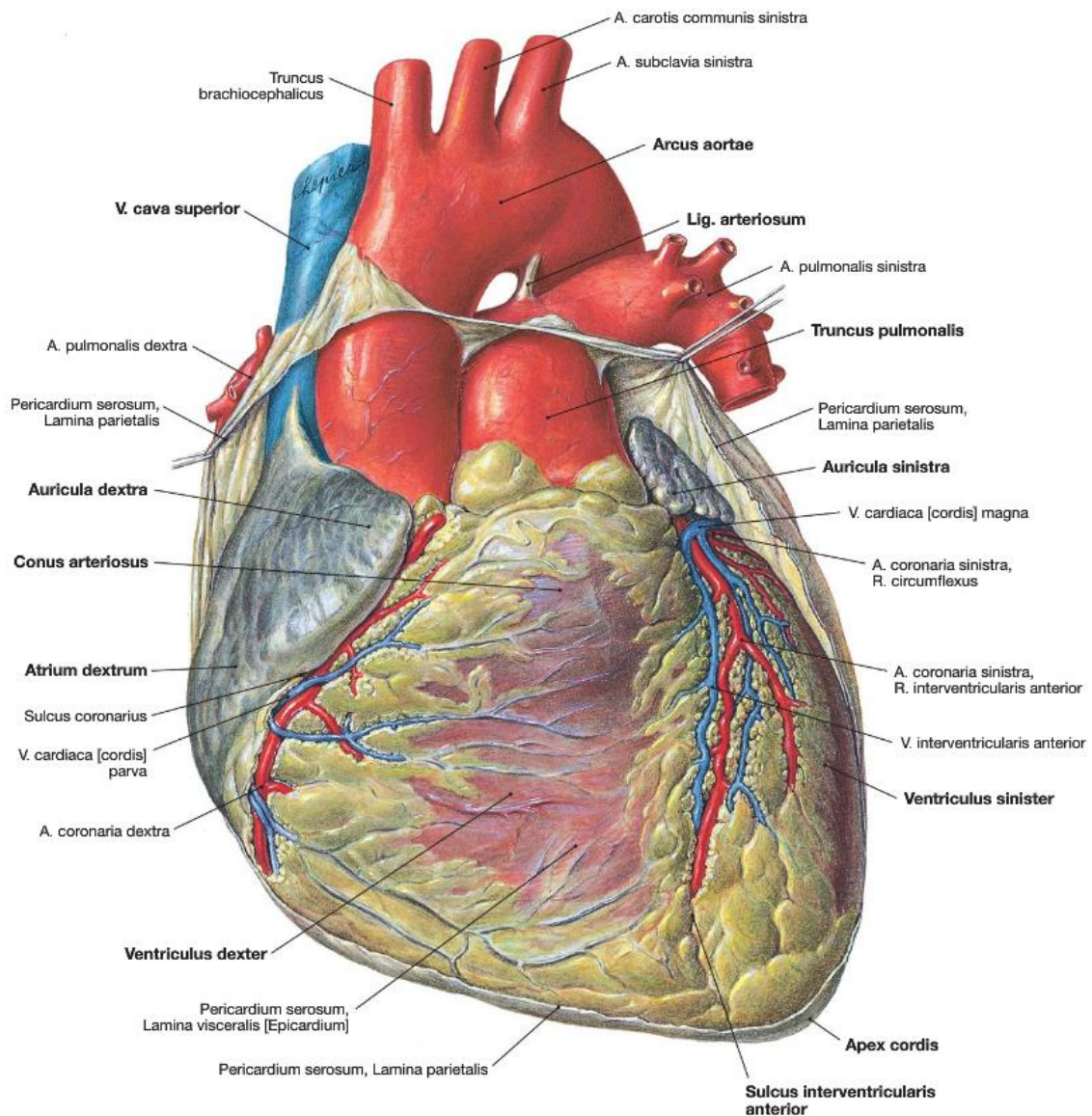


Abbildung 1: Ansicht des Herzes von vorne

(Modifiziert nach Sobotta, Atlas der Anatomie, Band 2, Auflage 24)

Einleitung

Im nicht erregten Zustand besitzen Herzmuskelzellen wie alle Muskelzellen ein Ruhemembranpotential, das durch die unterschiedliche Verteilung einwertiger Ionen, vor allem K^+ , Na^+ und Cl^- , im Extra- und Intrazellulärraum bedingt wird (Schmitz and Aumüller, 2014). Ursache dafür ist die jeweils spezifische Permeabilität der Membran für die Ionen und die Aufrechterhaltung der Ionengradienten durch die Na^+-K^+ -ATPase. Dies führt im Arbeitsmyokard zu einem Ruhemembranpotential von ca. $-80mV$, das über gleichrichtende K^+ -Kanäle stabilisiert wird. Sinusknotenzellen besitzen aufgrund fehlender gleichrichtender K^+ -Kanäle ein Ruhemembranpotential von ca. $-60mV$, wodurch spontane Depolarisationen möglich werden. Diese spontanen Depolarisationen lösen nun über verschiedene Ionenströme eine schnelle Positivierung des Membranpotentials aus, das sog. Aktionspotential, das sich über das Reizleitungssystem bis in das Arbeitsmyokard ausbreitet und somit die Erregung weiterleitet. Während Aktionspotentiale im Sinus- und AV-Knoten nach ihrem Anstieg relativ schnell wieder absinken, besitzen die Aktionspotentiale des Arbeitsmyokards aufgrund ihrer spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle nach einem schnellen Anstieg eine Plateauphase von 200-400ms (Hoth et al., 2012; Schmitz and Aumüller, 2014).

1.2 Histologie des Herzes

Im Skelettmuskel bildet die Muskelfaser ein Synzytium. Sie besteht aus mehreren hundert Myofibrillen, die, aufgebaut aus jeweils mehreren Myofilamenten, die Funktionseinheiten der Muskelfasern bilden. Skelett- und Herzmuskulatur werden lichtmikroskopisch als quergestreift bezeichnet, was sie von der nicht-quergestreiften, glatten Muskulatur abgrenzt. Die Querstreifung kommt durch die gleichmäßige, sich gegenseitig überlappende Anordnung der Aktin- und Myosinfilamente zustande sowie die gleichmäßige Anordnung ihrer übergeordneten Struktur, der Myofibrillen (Welsch, 2014) (siehe Abbildung 2).

Für die aktive Verkürzungsfähigkeit des Muskelgewebes sind nun die Myofilamente Aktin und Myosin II verantwortlich. Dabei gleiten die Aktinfilamente tiefer zwischen die Myosinfilamente, wobei die Myosinfilamente als Motorproteine den aktiven Teil darstellen. Eine Bedingung für diesen Kontraktionsmechanismus ist die Erhöhung der

Einleitung

zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, ohne die die Myosinköpfe nicht an die Aktinfilamente binden können.

Den Reiz zur Kontraktion setzt das Aktionspotential, das sich über das gesamte Sarkolemm, die Plasmamembran der Muskelfasern, ausbreitet und zu einer Depolarisation des Ruhemembranpotentials führt. Die Depolarisation setzt sich in ihrem Verlauf auch auf Einstülpungen des Sarkolemm fort, die sog. T-Tubuli, und kann so in die Tiefe der Muskelfaser vordringen. Die Depolarisation bedingt schließlich die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, dem sarkoplasmatischen Retikulum, was nun die Bewegung der Myofilamente und somit die Kontraktion der Muskelfasern ermöglicht (Lüllmann-Rauch, 2015).

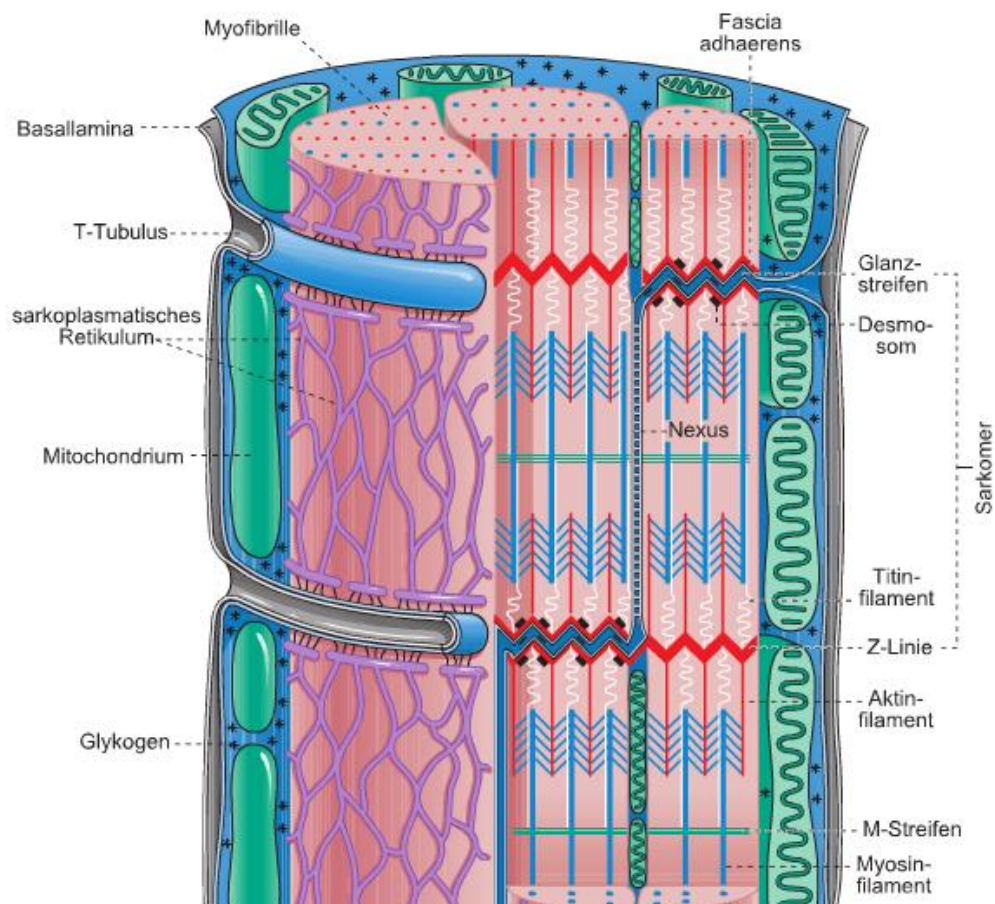


Abbildung 2: Kontraktile Apparat und Membranstrukturen der Herzmuskelzelle

(Modifiziert nach Lüllmann-Rauch 2015)

Einleitung

Die Herzmuskelzellen sind mit ihrem kontraktilem Apparat, bestehend aus Aktin- und Myosinfilamenten, ähnlich wie die Skelettmuskulatur aufgebaut. Im Gegensatz zu Skelettmuskelzellen besitzen Herzmuskelzellen meist nur einen zentral gelegenen, euchromatinreichen Zellkern. Des Weiteren unterscheiden sich das sarkoplasmatische Retikulum (SR) und die T-Tubuli der Herzmuskelzellen in ihrer Struktur vom Skelettmuskel. Das SR ist weniger stark ausgeprägt, wohingegen die T-Tubuli sich weiter in der Zelle verbreiten. Die für die elektromechanische Kopplung benötigten Ca^{2+} -Ionen werden sowohl aus dem SR als auch zum Teil aus dem Extrazellulärraum bereitgestellt (Lüllmann-Rauch, 2015).

1.3 Aufbau der Glanzstreifen

Zwei benachbarte Herzmuskelzellen sind am Glanzstreifen, engl. Intercalated Disc (ICD), miteinander verbunden und bilden dort gemeinsame Haft- und Kommunikationskontakte aus. Lichtmikroskopisch erkennt man Glanzstreifen als stark färbbare, treppenartig verlaufende Linien, die zwischen mindestens zwei Herzmuskelzellen lokalisiert sind. Der mechanische Zusammenhalt zweier Zellen wird über Adhärenskontakte und Desmosomen vermittelt. Diese beiden Kontakte liegen vor allem transversal zur Längsachse der Zellen, um die Übertragung von Zugkräften gewährleisten zu können. Elektrophysiologisch sind die Herzmuskelzellen über Gap Junctions miteinander verbunden, die hauptsächlich longitudinal zur Längsachse der Zellen orientiert sind (Lüllmann-Rauch, 2015) (siehe Abbildung 3).

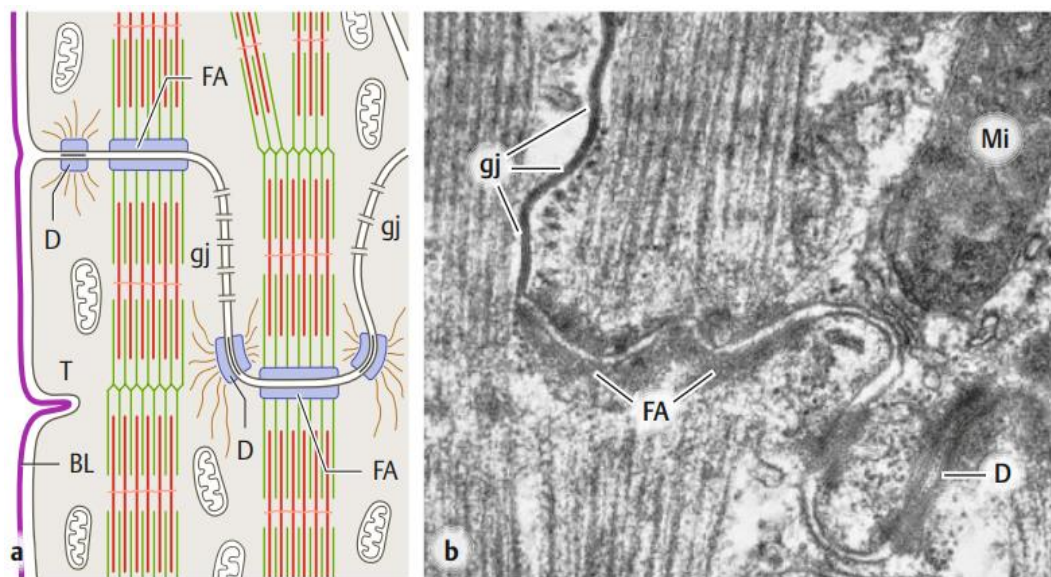


Abbildung 3: Glanzstreifen. **a** Schema. D, Desmosom. FA, Fascia adhaerens. gj, Gap Junctions. BL, Basallamina. T, Mündung eines T-Tubulus **b** EM-Bild.

(Modifiziert nach Lüllmann-Rauch 2015)

Bei den Desmosomen bilden die Cadherine Desmoglein 2 und Desmocollin 2 die interzellulären Adhäsionsmoleküle, die auf der zytoplasmatischen Seite mit den Plaquebildenden Proteinen interagieren (Waschke, 2008). Dabei binden die Cadherine an Plakoglobin (Pg), das selbst in Verbindung mit Desmoplakin (DP) steht. DP bindet

Einleitung

schließlich an die Intermediärfilamente (Delva et al., 2009; Harrison et al., 2016; Waschke, 2008). Ob die beiden interzellulären Bindungsproteine Desmoglein 2 und Desmocollin 2 bevorzugt homophile oder aber heterophile Bindungen eingehen, wird noch immer kontrovers diskutiert (Vielmuth et al., 2018). Unter zellfreien Bedingungen konnte mit Rasterkraftmikroskopie, engl. Atomic Force Microscopy (AFM), eine spezifische homophile Dsg2-Bindung bestätigt werden (Schinner et al., 2017; Schlipp et al., 2014). Eine zentrale Rolle bei der Bindung zweier Cadherine nimmt die Aminosäure Tryptophan ein. Dabei tauschen zwei gegenüberliegende Cadherine in trans-Stellung ihren Tryptophan-Rest in Position 2 der extrazellulären Domäne 1 aus. Dieser Mechanismus wird als Tryptophan-Tausch, im Englischen als tryptophan-swap, bezeichnet (Al-Amoudi and Frangakis, 2008). Freies Tryptophan jedoch kann diese Bindung stören und damit den Zusammenhalt der Desmosomen schwächen (Schlipp et al., 2014; Spindler et al., 2013).

Dagegen bildet bei den Adhärenskontakten vor allem N-Cadherin die interzellulären Verbindungen. Dieses ist im Gegensatz zu den Desmosomen an Aktinfilamente gebunden. Da im Laufe der Entwicklung diese beiden Kontaktarten miteinander verschmelzen, wird dieser Komplex auch als Area composita bezeichnet (Waschke, 2008). In Betracht aller Muskelzelltypen muss erwähnt werden, dass hierunter die Kardiomyozyten einzigartig in der Ausbildung von Areae compositae sind (Borrmann et al., 2006).

Die Hauptfunktion der Gap Junctions ist die Bildung interzellulärer Kanäle, die es elektrischen Signalen und kleinen Ionen erlauben, die Zellgrenzen mit geringem Widerstand zu überwinden. Sie sind damit verantwortlich für die Weiterleitung elektrischer Signale über einen Zellverbund. Die Gap Junctions benachbarter Zellen bestehen aus zwei hexameren Strukturen, den Connexonen, die den extrazellulären Raum überbrücken und eine vom Extrazellulärraum isolierte Pore bilden. Das Hauptprotein der Connexone im Arbeitsmyokard ist das Connexin 43 (Cx43) (Delmar and McKenna, 2010; Nielsen et al., 2012). Zusammenfassend bilden die Zellkontakte der Glanzstreifen untereinander sowie auch mit Na⁺-Kanälen und Ca²⁺-Kanälen Funktionseinheiten aus, die sich wechselseitig beeinflussen, was durch den neuen Begriff „Connexom“ ausgedrückt werden soll (Leo-Macias et al., 2016; Moncayo-Arlandi and Brugada, 2017).

1.4 Regulation der Zellhaftung

1.4.1 Charakteristika der Kohäsion von Kardiomyozyten

1.4.1.1 Die Rolle der Dsg2-vermittelten Haftung

In HL-1-Kardiomyozyten führt eine Störung der Dsg2-vermittelten Haftung durch die Aminosäure Tryptophan oder durch ein zyklisches, neun Aminosäuren umfassendes Dsg2-ähnliches Peptid (Dsg2-SP) zu irregulären Zellkontakten (Schlipp et al., 2014). Während normalerweise bei konfluenten Zellen desmosomenartige als auch adhärensjunktionenartige Zellkontakte sowie Mischtypen der beiden auftreten, bewirkt eine Störung der Dsg2-Interaktionen eine Verschiebung des Verhältnisses in Richtung der adhärensjunktionenartigen Kontakte. Dies wird begleitet von einer Akkumulation irregulärer, länglicher Dsg2-Aggregate, während unter Normalbedingungen fein punktierte Dsg2-Ansammlungen an der Membran vorzufinden sind. Auf mechanischer Ebene nimmt durch Tryptophan und Dsg2-SP zudem der Zusammenhalt des Zellverbundes, mit anderen Worten die Adhäsion ab. Beide Effekte lassen sich durch eine Stabilisierung der Dsg2-Interaktionen mit einem Dsg2-Tandem-Peptid (Dsg2-TP) rückgängig machen (Schlipp et al., 2014), bei dem zwei Dsg2-SP miteinander gekoppelt sind, um eine Quervernetzung zweier Dsg2-Moleküle zu induzieren (Heupel et al., 2009b). Des Weiteren konnte in einem ex-vivo Versuch an Mäuseherzen mithilfe der Langendorff-Perfusion gezeigt werden, dass Tryptophan und das Dsg2-SP auch zu einer reduzierten Herzfrequenz führen. Darüber hinaus wurde die Wirkung einer β -adrenergen Stimulation abgeschwächt, wobei der Anstieg der Herzfrequenz und des Blutdruckes signifikant niedriger waren als bei unbehandelten Herzen (Schlipp et al., 2014).

1.4.1.2 Die Rolle adrenerger Stimulation

Aktuelle Daten belegen, dass auch der β -adrenerge Rezeptor an der ICD lokalisiert ist (Schlipp et al., 2014). Dies verdeutlicht, dass die ICD als funktionelle Einheit gesehen werden muss. Weiterhin wurde gezeigt, dass β -adrenerge Stimulation sowohl in in-vitro, als auch in ex-vivo-Mausmodellen die Kohäsion zwischen Kardiomyozyten verstärkt (Schinner et al., 2017). Dabei ließ sich neben einer Zunahme des desmosomalen Proteins Dsg2 an den Zellgrenzen mit AFM auch eine Zunahme von Dsg2-spezifischen

Einleitung

Bindungsereignissen an den Zellgrenzen messen. Als zentrale Punkte der Signalkaskade, die dieser Wirkung der β -adrenergen Stimulation zugrunde liegen, wurden das Plaque-Protein Pg sowie seine Phosphorylierung durch die Proteinkinase A (PKA) identifiziert. Es wurde nachgewiesen, dass der Ausfall eines funktionsfähigen Pg zum Verlust der oben genannten Wirkungen adrenerger Stimulation führt (Schinner et al., 2017). Da Mutationen im Pg-Gen eine Ursache der arrhythmogenen Kardiomyopathie darstellen (Delmar and McKenna, 2010), dürfen bei einer Mutation eines für ein desmosomales Protein kodierenden Gens also nicht nur die unmittelbaren Folgen eines möglichen Haftungsverlusts betrachtet werden, sondern es muss auch ein Augenmerk auf den möglichen Verlust seiner Regulationsfunktion im Gesamtkomplex ICD gelegt werden. Dabei scheinen Enzyme wie Proteinkinasen eine wichtige Rolle zu spielen.

1.4.2 Die Bedeutung der PKC für Zelladhäsion und Gap Junction-Funktion

Proteinkinasen haben eine zentrale Rolle in der Regulation von Desmosomen. Neben der erwähnten PKA ist dabei vor allem auch die Proteinkinase C (PKC) von Bedeutung. Diese entfaltet ihre Wirkung in erster Linie durch eine Phosphorylierung ihrer Zielproteine an deren Serinresten (Pasdar et al., 1995). In Keratinozyten konnte z. B. gezeigt werden, dass der Auf- und Abbau von Desmosomen direkt von der Aktivität der PKC α abhängig ist (Kroger et al., 2013).

Unter anderem ist die Funktion der PKC bei der AC von Bedeutung. Bei einer Form dieser Herzerkrankung ist das Plaque-Protein DP betroffen. Hierbei ist der Rest von Ser299Arg betroffen, eine Stelle, an der normalerweise die PKC zur Phosphorylierung ansetzt (Rampazzo, 2006).

Welche Wirkung die PKC auf Desmoplakin und im Weiteren auf die Desmosomen haben kann, wurde im Rahmen des Morbus Darier auch in der Haut erforscht. Bei dieser Hauterkrankung kommt es durch einen Adhäsionsverlust zwischen Keratinozyten zu einer Verhornungsstörung. Ursache dafür sind Mutationen im Gen der Ca²⁺-Pumpe des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA2), die den Hauptregulator der intrazellulären Ca²⁺-Homöostase darstellt. Daneben ist die SERCA2 aber auch über die Vermittlung der Lokalisierung von DP an die Zellgrenzen am Auf- und Abbau der Desmosomen beteiligt (Hobbs et al., 2011). Bei einem Verlust der SERCA2-Funktion ist weniger DP an den

Einleitung

Zellgrenzen zu finden, was zu einer Störung des Aufbaus der Desmosomen und darüber hinaus zu einer Abschwächung der Zellhaftung führt. Interessanterweise ist bei SERCA2-defizienten Zellen auch das Vorkommen der PKC α an der Membran reduziert. Dagegen ist durch eine Stimulation der PKC α eine Wiederherstellung der Adhäsionskräfte sowie ein Wiederaufbau von Desmosomen an der Zellmembran möglich. Somit ist die PKC α nicht nur ein Teil des Signalweges ausgehend von der SERCA, sondern vor allem selbst ein wichtiger Regulator der Desmosomen und der Adhäsion (Hobbs et al., 2011). Die PKC wird in ihrer Wirkung wiederum selbst von desmosomalen Proteinen reguliert (Bass-Zubek et al., 2008).

Neben seiner Wirkung auf DP und die Desmosomen wurde in mehreren Publikationen der Einfluss der PKC auf die Funktion der Gap Junctions untersucht. Die Meinungen divergieren jedoch, ob die PKC vornehmlich einen stimulierenden oder inhibierenden Effekt auf die Funktion der Gap Junctions hat (Lampe et al., 2000). Eine zusammenfassende Aussage lässt sich wohl am besten damit treffen, dass ein inhibierender Effekt der PKC auf die Permeabilität bzw. Selektivität der Gap Junctions beschrieben wird, der sich jedoch positiv auf eine gezielte Weiterleitung der Erregung sowie das Überleben der Zellen auswirkt. Dieser Effekt macht sich vor allem in Stressreaktionen bemerkbar (Darrow et al., 1996; Duquesnes et al., 2010; Ek-Vitorin et al., 2006; Kwak et al., 1995; Lampe et al., 2000; Nassal et al., 2016). Die für diese Funktionen relevante Phosphorylierung durch die PKC findet vor allem am Serin-368 statt (Ek-Vitorin et al., 2006; Lampe et al., 2000; Nassal et al., 2016).

In diesem Sinne wurde an Kardiomyozyten von Ratten gezeigt, dass sich die Geschwindigkeit der Erregungsweiterleitung, engl. conduction velocity (CV), unter Einfluss einer Phosphorylierung an Serin-368 unter Ruhebedingungen kaum ändert. Unter metabolischem Stress wurde jedoch festgestellt, dass die Erregungsweiterleitung in einem Zellverbund, in dem diese Phosphorylierung ausgeschaltet worden war, deutlich reduziert war und nach einer gewissen Zeit sogar zu einem Leitungsblock führte (Nassal et al., 2016). Dagegen führte in Kontrollzellen metabolischer Stress nur zu einer leichten Abnahme der CV. Interessanterweise war die Phosphorylierung bei den Kontrollzellen, die dem metabolischen Stress ausgesetzt waren, reduziert. Kwak et al. stellten fest, dass in neonatalen Kardiomyozyten aus Ratten die Phosphorylierung an Serin-368 die elektrische Weiterleitung, gemessen in Siemens (S), zwar erhöht, die Durchlässigkeit für

Einleitung

Färbemittel und damit diverse Moleküle jedoch reduziert. Dies ist verbunden mit einer verhältnismäßigen Zunahme von Gap Junctions, die eine niedrige elektrische Weiterleitungsfähigkeit besitzen. Die Zunahme der CV lässt sich dabei durch die starke Zunahme dieser Gap Junctions an der Membran erklären (Kwak et al., 1995).

Untersuchungen an Infarktmodellen zeigten, dass sich eine ischämische Vorbehandlung bzw. Präkonditionierung positiv auf die Reduktion der Infarktgröße und die Funktionsfähigkeit des Myokards auswirkten. Dafür sind vor allem Kinasen wie PKC verantwortlich (Cross et al., 2002; Garcia-Dorado et al., 2002). Es wird vermutet, dass die Kinasen über eine Verminderung der interzellulären Kommunikation eine reperfusionsbedingte Hyperkontraktibilität unterbinden und so den Zelltod verhindern.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Wirkung der PKC bzw. einer Phosphorylierung des Cx43 am Serin-368 zwar sehr komplex und noch nicht in allen Details geklärt ist, ihre zentrale Stellung in der Regulation der Funktion der Gap Junctions und der Desmosomen jedoch als unumstritten angesehen werden kann.

1.5 Grundlagen der arrhythmogenen Kardiomyopathie

Die arrhythmogene Kardiomyopathie (AC) ist eine genetische Form der Kardiomyopathie, die hauptsächlich den rechten Ventrikel betrifft, oftmals aber auch auf den linken Ventrikel übergreifen kann (Fontaine et al., 1984; Manyari et al., 1983; Romero et al., 2013). Die gefürchtetsten Folgen der AC sind der plötzliche Herztod und das biventrikuläre Herzversagen, ausgelöst durch ventrikuläre Arrhythmien, wovon vor allem auch junge Menschen betroffen sind (Romero et al., 2013). Diesen Symptomen liegt pathogenetisch die Entwicklung einer ventrikulären Atrophie zugrunde, bei der gesundes Muskelgewebe durch fibrös-fettiges Gewebe ersetzt wird (Thiene et al., 1997).

1.5.1 Epidemiologie

Die Prävalenz der Erkrankung beträgt etwa 1/5000, wobei der genaue Wert je nach Herkunft variiert. Zudem muss berücksichtigt werden, dass wohl viele Fälle der AC wegen der Vielzahl an klinischen Erscheinungsbildern nicht als solche identifiziert

werden. Männer sind bei der Erkrankung gegenüber den Frauen überdurchschnittlich mit einem Verhältnis von 3:1 betroffen. Einen hohen klinischen Stellenwert erhält die AC zudem durch die Tatsache, dass zu einem relevanten Teil junge und sportliche Menschen betroffen sind. So rechnet man der AC einen Anteil von 11-22% am plötzlichen Herztod unter jungen Menschen zu.

1.5.2 Genetischer Hintergrund

Mindestens 50% aller Fälle von AC haben einen genetischen Hintergrund. Größtenteils betreffen die Mutationen Proteine des Desmosoms, eines Proteinkomplexes, dessen Hauptfunktion die Vermittlung der Zellhaftung zwischen benachbarten Zellen ist (Saguner et al., 2014; Waschke, 2008). Bis auf wenige Ausnahmen wird die Krankheit autosomal dominant mit unterschiedlicher Penetranz vererbt. Dabei wurden mittlerweile über 144 Mutationen identifiziert, die meisten liegen in den Genen für die desmosomalen Proteine Plakophilin 2 (PKP2), Desmoplakin (DSP), Desmoglein 2 (Dsg2) und Plakoglobin (Pg) (Gerull et al., 2004; Saguner et al., 2014; van der Zwaag et al., 2009).

Kürzlich wurde beschrieben, dass die verschiedenen Mutationen der desmosomalen Komponenten zur Bildung von Autoantikörpern gegen Dsg2 führen, die zur Pathogenese der AC beitragen sollen (Chatterjee et al., 2018).

Da die Therapieversuche aktuell vor allem symptomatischer Art sind, gewinnt ein genauerer Blick auf den molekularen und pathogenetischen Hintergrund der Erkrankung an Bedeutung. Viele Studien sind der Ansicht, dass der fibrös-fettige Umbau zur Entwicklung der ventrikulären Arrhythmien beiträgt (Corrado et al., 2017).

Der Zusammenhang des Aufbaus der ICD mit der Pathogenese der AC wurde zuerst bei der Naxos-Krankheit entdeckt. Bei dieser Erkrankung kommt es neben einer palmoplantaren Keratose auch zu ventrikulären Tachykardien und anderen Symptomen der AC, die im schlimmsten Fall zum plötzlichen Herztod führen (Protonotarios et al., 1986). Während die epidermalen Veränderungen in der frühen Kindheit beginnen, entwickeln sich die diagnostischen Kriterien der AC meist erst ab der Adoleszenz. Dabei zeigen sich mit Auffälligkeiten im EKG, wie QRS-Verlängerungen oder Epsilon-Wellen, und strukturellen Veränderungen an den Ventrikeln die typischen Muster der AC. Die

jährliche Inzidenz des plötzlichen Herztodes beträgt etwa 3 Prozent. Ursache der Naxos-Erkrankung ist die homozygote Mutation 2157del2 im Gen von Plakoglobin, auch JUP-Gen (Junction Plakoglobin) genannt. Die Krankheit manifestiert sich kardial meist nur bei homozygoter, dermal auch bei heterozygoter Mutation (Delmar and McKenna, 2010). Bei der Naxos-Krankheit führt eine Mutation des Plaque-Proteins Plakoglobin auch zu einem reduzierten Vorkommen des Gap Junction Proteins Cx43 an interzellulären Kontakten, was im weiteren Verlauf die Entstehung von Arrhythmien erklärbar macht (Kaplan et al., 2004).

Mutationen am Dsg2-Gen gehören zu den häufigsten betroffenen bei AC. Auch hier zeigen sich die typischen Symptome bei jungen Patienten (Delmar and McKenna, 2010). Untersuchungen an Mäusen mit Dsg2-defizienten Herzen zeigten die Entwicklung von Ventrikeldilatationen, fokalen Fibrosen und Störungen der elektrischen Erregungsweiterleitung. Auf ultrastruktureller Ebene entstand ein Verlust von desmosomalen Strukturen und des Weiteren eine Störung im Aufbau der ICD, wobei auch die Verteilung von Cx43 verändert war (Kant et al., 2015). Die ICD muss somit als eine funktionelle Einheit gesehen werden, in der die einzelnen Strukturen nicht nur eine isolierte Funktion innehaben, sondern vor allem auch miteinander interagieren (Delmar and McKenna, 2010).

1.5.3 Klinische Präsentation und Diagnostik

Die AC ist eine tückische Erkrankung, da sich bei vielen und vor allem auch jungen Patienten keine Symptome bemerkbar machen und somit der plötzliche Herztod die erste klinische Manifestation der Erkrankung darstellt (Romero et al., 2013). Palpitationen, synkopale Anfälle oder atypischer Brustschmerz sind mögliche Symptome, die im Anfangsstadium der Erkrankung auftreten können. Des Weiteren ist die Symptomatik davon abhängig, ob eher der rechte und/oder der linke Ventrikel betroffen ist. In beiden Fällen können sich auch sportbedingte ventrikuläre Tachyarrhythmien bemerkbar machen (Corrado et al., 2017).

Diese Charakteristika machen folglich eine zielführende Diagnostik schwierig. 2010 wurde deshalb von der American Heart Association eine überarbeitete Liste mit Haupt- und Nebenkriterien veröffentlicht (Marcus et al., 2010). Bis zu 90% der Patienten zeigen

Einleitung

Auffälligkeiten im EKG, etwa einen verlängerten S-Zacken-Aufstieg oder Epsilon-Wellen. Eine hohe Sensitivität kann mithilfe der Echokardiographie erreicht werden, wobei der Blick auf Strukturanomalitäten wie Ventrikeldilatationen oder Aneurysmenbildungen gerichtet wird. Des Weiteren wird neben kardiovaskulärer Magnet-Resonanztomographie auch die Herzbiopsie als diagnostische Methode eingesetzt, die zwar eine hohe Spezifität, jedoch eine niedrige Sensitivität aufweist. Dies liegt vor allem daran, dass die pathologische fibrös-fettige Dysplasie nicht gleichmäßig im Myokard der Ventrikel stattfindet und darüber hinaus vom Epikard zum Endokard voranschreitet (Ponikowski et al., 2016; Romero et al., 2013). Eine wichtige Rolle könnte in Zukunft auch der Einsatz von immunhistochemischen Analysen spielen, wobei das Vorkommen und die Verteilung desmosomaler Proteine wie Pg untersucht wird (Asimaki et al., 2009).

1.5.4 Therapie

Da bislang keine kausale Behandlung der Erkrankung möglich ist, hat die symptomatische Behandlung einen sehr hohen Stellenwert. Dabei werden als Ziele die Reduktion der Mortalität, die Prävention der Krankheitsprogression und die Verbesserung der Lebensqualität durch Symptomreduktion gesetzt. Zusammengefasst werden von der American Heart Association dabei als therapeutische Maßnahmen mit aufsteigender Intensität Lebensstiländerung, pharmakologische Behandlung, Katheterablation, implantierbare Defibrillatoren und schließlich die Herztransplantation empfohlen (Corrado et al., 2015; Ponikowski et al., 2016).

Die Lebensstiländerung umfasst vor allem einen Verzicht auf Ausdauer- und Wettkampfsportarten (Corrado et al., 2015). An Mäusen mit heterozygotem Verlust von Pg konnte z. B. gezeigt werden, dass Ausdauertraining die Progression der AC beschleunigt (Kirchhof et al., 2006). Da derzeit noch keine kausale medikamentöse Behandlung der AC möglich ist, werden Amiodaron und Beta-Blocker nur zur symptomatischen Prävention von ventrikulären Arrhythmien eingesetzt. Bei der Katheterablation werden Leitungsbahnen durchtrennt, die für kreisende Erregungen verantwortlich sind und somit ventrikuläre Tachyarrhythmien auslösen können. Diese Option wird hauptsächlich bei Patienten mit wiederkehrenden ventrikulären

Einleitung

Tachyarrhythmien eingesetzt, bei denen die pharmakologische Therapie keine ausreichende Wirkung zeigt oder nicht gewünscht ist. Um den plötzlichen Herztod durch Herzrhythmusstörungen als Haupttodesursache der AC zu verhindern, wird bei Patienten sehr häufig ein implantierbarer Defibrillator eingesetzt. Dadurch können letale ventrikuläre Tachyarrhythmien erfolgreich unterbrochen und so das Gesamtüberleben signifikant verlängert werden. Es wurde gezeigt, dass über einen Zeitraum von 7 Jahren das Gesamtüberleben durch den Einsatz eines implantierbaren Defibrillators um 35% gebessert werden konnte (Wichter et al., 2004). Der Einsatz eines implantierbaren Defibrillators schließt dabei die Katheterablation nicht aus. Die Herztransplantation als finale Option wird bei Patienten mit schwerem Herzversagen oder wiederkehrenden Episoden von ventrikulären Tachyarrhythmien durchgeführt (Corrado et al., 2015).

1.6 Einsatzbereiche zyklischer Peptide

Das Feld der zyklischen Peptide als Therapeutika ist ein relativ junger Bereich in der klinischen Behandlung. Dabei sind derzeit etwa 40 verschiedene zyklische Peptide im klinischen Gebrauch, wobei die Anzahl jährlich wächst (Bechara and Sagan, 2013; Zorzi et al., 2017). Die zyklischen Peptide zeichnen sich durch wichtige Eigenschaften aus, die den therapeutischen Nutzen erhöhen, etwa eine geringe Toxizität sowie eine hohe Zielselektivität bei gleichzeitig guter Bindungsaffinität (Zorzi et al., 2017). Die bisher genutzten zyklischen Peptide umfassen vor allem antimikrobielle Substanzen und humane Peptidhormone (Busby et al., 2010; Klinker and Borgert, 2015; Nicolaou et al., 1999). Diese werden hauptsächlich von natürlichen Substanzen abgeleitet. Neue Herstellungsmethoden ermöglichen es aber, Peptide de novo herzustellen, die nicht aus der Natur abgeleitet werden können. Dadurch werden sich in Zukunft die Einsatzbereiche der zyklischen Peptide wohl deutlich vergrößern können (Craik et al., 2013; Zorzi et al., 2017).

Bei der Erkrankung Pemphigus vulgaris (PV) wurde im Mausmodell gezeigt, dass Peptide, die an der Bindungsstelle des Cadherins Desmoglein 3 (Dsg3) angreifen, den Haftungsverlust der Keratinozyten und damit die Blasenbildung aufhalten können (Spindler et al., 2013). Bei dieser Erkrankung entstehen Antikörper vor allem gegen die Adhäsionsmoleküle Dsg1 und Dsg3, die wohl direkt die Dsg3-Transinteraktion zwischen

Einleitung

zwei Zellen stören und so über verschiedene Signalwege zur Blasenbildung in der Haut führen (Spindler et al., 2018; Spindler and Waschke, 2018). Interessanterweise war ein Dsg-ähnliches Tandem-Peptid (TP) in der Lage, den Haftungsverlust auch in-vitro zu verhindern. Dabei wurden Keratinozyten (HaCaT) verwendet, die mit PV-Immunglobulin G inkubiert wurden (Heupel et al., 2009b). Das TP bestand aus zwei gleichen Aminosäuresequenzen von Dsg1 und Dsg3, die mit einem flexiblen Teil miteinander verbunden waren. Als Grundlage wurde die Struktur von E-Cadherin verwendet und anstelle der Aminosäuren von E-Cadherin die von Dsg1 und 3 eingesetzt. Das TP sollte nun in der Lage sein, zwei gegenüberliegende Desmogleine miteinander zu verbinden. Um Konformationsänderungen und damit den Verlust der Bindungsaffinität an Dsg1 und Dsg3 zu verhindern, wurden die Peptide zyklisch designt, um eine Quervernetzung interagierender Dsg-Moleküle zu ermöglichen (Heupel et al., 2009b).

2 Fragestellung

Die arrhythmogene Kardiomyopathie ist eine hereditäre Herzerkrankung, die sich meist im Kindes- und jungen Erwachsenenalter manifestiert. Im Laufe der Erkrankung kommt es zu Herzrhythmusstörungen, die zum plötzlichen Herztod führen können. Die Ursache sind meist Mutationen in Genen desmosomaler Proteine, die vor allem für die Zellhaftung verantwortlich sind. Häufig betroffen sind dabei die Gene für Dsg2 und Pg. Bislang ist jedoch keine kausale Behandlung der Erkrankung möglich. Deshalb werden derzeit nur symptomatische Therapieformen eingesetzt bzw. als ultima ratio die Herztransplantation.

Ein genaueres Verständnis der Pathogenese der arrhythmogenen Kardiomyopathie könnte dazu beitragen, in Zukunft spezifische Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln. Ausschlaggebend für die pathologischen Veränderungen, die schließlich zu den malignen Arrhythmien führen, scheint ein durch Mutationen bedingter Funktionsverlust der Desmosomen zu sein.

In murinen Kardiomyozyten wurde bereits ein protektiver Effekt eines Desmoglein-spezifischen verbindenden Peptids auf die Zellhaftung bei einem künstlich ausgelösten desmosomalen Funktionsverlust beobachtet (Schlipp et al., 2014). Kürzlich konnte durch adrenerge Stimulation ein positiver Effekt auf die Zelladhäsion nachgewiesen werden (Schinner et al., 2017). Der Einfluss auf die Erregungsweiterleitung ist bei beiden Ansätzen jedoch unbekannt.

In dieser Arbeit sollen daher die Zusammenhänge zwischen desmosomaler Zellhaftung und Erregungsweiterleitung in Kardiomyozyten in-vitro sowie in einem Plakoglobin-defizienten Mausmodell ex-vivo genauer untersucht werden. Ferner soll eruiert werden, ob sich bei einem Verlust der Zelladhäsion der Einsatz des Dsg2-quervernetzenden Peptids oder eine Erhöhung von cAMP protektiv auf die Erregungsweiterleitung auswirkt. Dabei soll auch der Beteiligung möglicher Signalwege nachgegangen werden. Ziel ist damit die Erforschung von Grundlagen für einen neuen, spezifischen Therapieansatz bei arrhythmogener Kardiomyopathie.

3 Material und Methoden

3.1 Antikörper und weitere Reagenzien

Die Antikörper wurden für Western Blot-Analysen und Immunfärbungen verwendet.

Erstantikörper

Antikörper	Spezies	Klonalität	Verdünnung WB/IF	Hersteller	Produkt- nummer
Anti-Dsg1/2	Maus	Monoklonal	1:200/1:100	Progen	61002
Anti-Pg	Maus	Monoklonal	1:100/1:1000	Progen	61005
Anti- α - Tubulin	Maus	Monoklonal	1:1000/---	Abcam	7291
Anti-Cx43 total	Kaninchen	Polyklonal	1:1000/1:1000	Sigma- Aldrich	SAB4501175
Anti-p-Cx43 Ser368	Maus	Monoklonal	1:100/---	Santa Cruz	sc-101660-r

Tabelle 1: Erstantikörper

Zweitantikörper

Als Zweitantikörper für Western Blot-Analysen wurden Peroxidase-konjugierte, der Ziege entstammende, Antikörper verwendet, die dem Erstantikörper entsprechend gegen Kaninchen (IgG) oder Maus (IgG+IgM) (*Dianova*) gerichtet waren.

Antikörper	Hersteller	Kopplung	Einsatzbereich	Verdünnung
Ziege-anti-Maus-Fc (engl.: „Goat anti mouse“; gam)	Dianova, Hamburg	Pox	WB	1:10 000
Ziege-anti-Kaninchen-Fc (engl.: „Goat anti rabbit“; garb)	Dianova, Hamburg	Pox	WB	1:10 000
gam	Dianova, Hamburg	Cy3	IF	1:600
garb	Dianova, Hamburg	Cy2	IF	1:600

Tabelle 2: Zweitantikörper

Testreagenzien

Name	Hersteller	Wirkungsweise	Lösungs- mittel	Eingesetzte Konzentration	Dauer der Anwendung
L- Tryptophan (Trp)	Sigma- Aldrich, München	Interferenz mit desmosomalem Bindungs- mechanismus	H ₂ O	400µM	24 Stunden
Carbe- noxolon (Clx)	Abcam, Groß- britannien	Inhibitor der Gap Junctions	H ₂ O	20µM	24 Stunden
Bisindolyl- maleimid X (Bim-X)	Sigma- Aldrich, München	Inhibitor der PKC	PBS	1mM	24 Stunden
Phorbol-12- myristat-13- acetat (PMA)	Abcam, Groß- britannien	Aktivator der PKC	PBS	100nM	24 Stunden
Thapsigargin	Sigma- Aldrich, München	Inhibitor der SERCA- Pumpe	DMSO	100nM	30 Minuten / 24 Stunden
Forskolin (F)	Sigma- Aldrich, München	Aktivator der Adenylyl- zyklase	DMSO	5µM	30 Minuten
Rolipram	Sigma- Aldrich, München	Inhibitor der Phospho- diesterase IV	DMSO	10µM	30 Minuten

Tabelle 3: Testreagenzien

Das in der vorliegenden Dissertation verwendete Dsg2-LP baut auf einer Grundidee der Wirkungsweise zyklischer Peptide auf. Das Peptid soll gegenüber der normalen Bindungsstelle an der extrazellulären Domäne 1 binden und so zwei Desmogleinreste benachbarter Zellen verbinden. Dabei wird bewusst nicht die Bindungsstelle des Tryptophan-Tausches (Tryptophan-swap) angegriffen, um physiologische Bindungen weiterhin zu ermöglichen. Das Peptid wurde so entworfen, dass sowohl eine cis-, als auch eine trans-Bindung möglich ist. Vorausgehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass das Peptid homophile Dsg2-Bindungen stabilisiert, nicht aber zwischen N-Cadherin, das auch in Glanzstreifen vorkommt (Schlipp et al., 2014). Eingehende Studien zur Wirkung auf Desmocollin und zum Funktionsmechanismus werden in der Arbeitsgruppe gerade durchgeführt.

3.2 Kultivierung von HL-1-Kardiomyozyten

HL-1 Zellen sind Kardiomyozyten, die von William C. Claycomb (Department of Biochemistry and Molecular Biology, LSU Health-Sciences-Center, New Orleans, USA) isoliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden (Claycomb et al., 1998).

HL-1-Kardiomyozyten sind eine Herzmuskelzelllinie, die von der aus dem Vorhof von Mäuseherzen stammenden, virus-induzierten Tumorzelllinie AT-1 abstammen. Die Zellen können viele Zyklen der Zellpassage durchlaufen, ohne jedoch ihre Fähigkeit zur Kontraktion zu verlieren. Dabei behalten die Zellen ihre kardiale Differenzierung auf morphologischer, biochemischer und elektrophysiologischer Ebene bei. Genexpressionsanalysen bewiesen mit dem Vorhandensein der kardialen α -Myosin-heavy chain, dem kardialen α -Aktin, und von Connexin 43 eine Ähnlichkeit zu adulten Myozyten aus Vorhöfen (Claycomb et al., 1998). Außerdem konnten intakte ICDs nachgewiesen werden. Das Zytoplasma der HL-1-Zellen ist mit Myofibrillen gefüllt und des Weiteren reich an Glykogen, was charakteristisch für mitotisch aktive Kardiomyozyten ist. Elektrophysiologisch konnte gezeigt werden, dass sich die Zellen spontan und synchron im Zellverbund kontrahieren (Claycomb et al., 1998).

Material und Methoden

Die Reagenzien zur Kultur wurden von Sigma-Aldrich (München) bezogen. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in Claycomb Medium (#51800C) gezüchtet, das noch zusätzlich zu 10% mit fötalem Rinderserum (#F2442, batch 058K8426), 100µM Norepinephrin, Penicillin/Streptomycin und 2mM L-Glutamin versetzt wurde. Das Medium wurde täglich gewechselt. Die Zellen wurden in T75-Flaschen gezüchtet und zweimal pro Woche nach Erreichen von 100% Konfluenz geteilt. Hierfür wurden die Zellen einmalig mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) bei 37°C gewaschen und in Trypsin/ Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) für 5 - 10min bei 37°C bis zum vollständigen Ablösen der Zellen vom Flaschenboden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in HL-1-Waschmedium resuspendiert und somit die Trypsin-Enzymreaktion gestoppt. Die Zelllösung wurde nun in ein Zentrifugationsgefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 500 G über 3min und Absaugen des Überstandes wurde der Rückstand in HL-1-Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Aussaat erfolgte zur weiteren Kultivierung der Zellen in T75-Flaschen. Um einen gleichmäßigen und lückenlosen Zellrasen für die Experimente zu erhalten, wurden für Western Blot-Verfahren, Immunfärbungen, Dispase-basierte Dissoziationsansätze und FURA2-basierte Messungen an lebenden Zellen jeweils 25000 Zellen pro cm² auf Kulturschalenböden ausgesät und für 7 Tage kultiviert, für den MEA-Versuch jeweils 250000 Zellen pro cm² auf speziellen MEA-Elektroden ausgesät und für 3 Tage kultiviert. Um die Zellen auf den hydrophoben Kulturschalenböden und in T75-Flaschen anwachsen zu lassen, wurden diese für 1h mit 0,02% Gelatine und 25µg/ml Fibronectin beschichtet. Nachdem die Zellen für die Experimente ausgesät worden waren, wurden sie mit Claycomb-Medium ohne Norepinephrin gezüchtet, um basale adrenerge Stimulation zu vermeiden. Wir erhielten die Zellen im 61. Kulturzyklus und züchteten sie für Experimente bis zum 82.-85. Zyklus, je nach erhaltenen morphologischen und funktionellen Eigenschaften. Zweimal wöchentlich wurde ein neuer Zyklus begonnen und die Zellen dabei für neue Experimente ausgesät. Ein Drittel der Zellen wurde jeweils für die weitere Kultur verwendet, der Rest für Experimente.

3.3 Immunfärbungen

Immunfärbungen ermöglichen es, die Lokalisation von Zellproteinen sichtbar zu machen und somit eine Aussage über deren Vorkommen bzw. ihre Anordnung treffen zu können. Dabei bindet ein Erstantikörper spezifisch an Epitope des zu untersuchenden Antigens bzw. Proteins, der im zweiten Schritt durch einen gegen ihn gerichteten Zweitantikörper, an den ein Fluorophor gekoppelt ist, sichtbar gemacht werden kann.

Vorbereitung der Proben

Die HL-1-Kardiomyozyten wurden auf 0,9cm großen Glasplatten in 24-Lochplatten gezüchtet, bis ein einheitlicher Zellrasen entstand. Nach Behandlung mit den entsprechenden Reagenzien wurde das Medium abgezogen und die Zellen bei Raumtemperatur zweifach mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur pro Loch mit 500µL PFA für 10min fixiert, das PFA anschließend abgegossen und fachgerecht entsorgt. Danach wurden die Zellen für 5min mit 500µL des Tensids Triton X-100 (Sigma-Aldrich, München) permeabilisiert, gelöst zu 0,1% in PBS. Dieses besteht aus einer 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)-phenyl-polyethylen-glykol Lösung. Mit diesem Schritt wurde die Zellmembran aufgeschlossen und somit eine Untersuchung der Zellproteine ermöglicht. Die Zellen wurden anschließend 3-mal für 5min mit PBS-Puffer gewaschen. Die Glasplättchen wurden nun zur Reinigung in destilliertes Wasser getaucht und anschließend auf Glasobjektträgern platziert. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden, wurden die Zellen mit einem Gemisch aus 3% Albumin aus Rinderserum und 10% normalem Ziegen Serum in PBS (BSA/NGS, Sigma-Aldrich) für 60min in einer feuchten Kammer inkubiert. Das BSA/NGS wurde danach abgezogen und die Zellen auf den Glasplättchen über Nacht mit dem jeweiligen Erstantikörper, gelöst in PBS-Puffer, in der feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Als Erstantikörper wurden dabei polyklonaler anti-Cx43 des Kaninchens (Sigma-Aldrich, #SAB4501175), sowie monoklonaler anti-Dsg1/2 der Maus (Progen, 61002) verwendet. Dieser wurde mit PBS-Puffer 3-mal für 5min abgewaschen und die Zellen anschließend mit den Zweitantikörpern, die entweder mit dem Fluorophor Cy2 oder Cy3 gekoppelt waren, für 60min bei Raumtemperatur inkubiert. Um den anti-Dsg1/2-Antikörper der Maus sichtbar zu machen, wurde ein der Ziege entstammender und gegen Mäuseproteine gerichteter Zweitantikörper verwendet, der mit Cy3 konjugiert war (goat anti mouse, gam-Cy3). Um den anti-Cx43-Antikörper des

Kaninchens sichtbar zu machen, wurde ein der Ziege entstammender und gegen Kaninchenproteine gerichteter Zweitantikörper verwendet, der mit Cy2 konjugiert war (goat anti rabbit, garb-Cy2) (Dianova, Hamburg). Cy ist dabei die Abkürzung für Cyanin-Farbstoff. Um ein zu schnelles Ausbleichen des Präparates im kurzwelligem Licht zu verhindern, wurden die Glasplättchen mit den Zellen auf den Objektträgern mit 1.5% n-Propylgallat/ 60% Glycerol (NPG, Sigma-Aldrich), gelöst in PBS, eingedeckt.

Aufnahme und Auswertung des Bildmaterials

Die Proben wurden mit dem Leica SP5 confocal microscope (Leica) bildlich dargestellt. Dieses Konfokalmikroskop, das mit einem 63x-Ölobjektiv ausgestattet ist, wird mit der LAS-AF Software (Leica) betrieben. Die Cyanin-Farbstoffe werden dabei mit dem Licht einer bestimmten Wellenlänge, bei Cy2 492nm (Amax, Absorptionsmaximum), bei Cy3 550nm (Amax), angeregt und emittieren daraufhin Licht der Wellenlängen 510nm (Emax von Cy2, Emissionsmaximum) respektive 570nm (Emax von Cy3). Dieser Effekt kann nun entweder direkt mithilfe einer Fluoreszenzlampe im Mikroskop sichtbar gemacht werden oder in einer höheren Auflösung mithilfe des Konfokal-Lasers über die LAS-AF Software. Schließlich wurden die Bilder mit der Software ImageJ (NIH, Bethesda, USA) bzw. Adobe Photoshop CC 2017 (Adobe Systems, San Jose, USA) ausgewertet. Um valide Ergebnisse zu erhalten, wurden bei einem Experiment für alle Konditionen die gleichen Anregungsintensitäten verwendet.

3.4 Proteinquantifizierung

Mithilfe der Bicinchoninsäure (BCA)-Proteinquantifizierungsmethode wurde die Proteinmenge in Western Blot-Lysaten bestimmt. Hierfür wurde das Pierce BCA-Protein-Assay-Kit gemäß den Herstellerangaben verwendet. Dabei erfolgt ein kolorimetrischer Proteinnachweis mit Ermittlung der Proteinkonzentration durch die Biuret-Reaktion, bei der im alkalischen Milieu Peptide zweiwertige Kupferionen (Cu-(II)-Ionen) zu einwertigen Kupferionen (Cu-(I)-Ionen) reduzieren. Diese Ionen bilden nun mit BCA einen lila-gefärbten Komplex, dessen Konzentration mittels Photometer bestimmt werden kann und linear zur Proteinkonzentration der jeweiligen Probe ist. Zur Bestimmung der absoluten Proteinkonzentration wurde eine separate Standardreihe von 25µg/ml - 2000µg/ml BSA in dem jeweiligen Puffer parallel inkubiert.

3.5 Elektrophorese und Western Blot-Analyse

Zur semiquantitativen Untersuchung von Proteinen wurde ein kombiniertes Verfahren aus Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), Western-Blot und abschließender Detektion der Proteine mittels immunologischer Methodik eingesetzt.

HL-1-Kardiomyozyten wurden dafür in handelsüblichen 24-Lochplatten gezüchtet, bis ein einschichtiger Zellrasen entstanden ist. Um dies zu erreichen, wurden die Zellen bei einer geplanten Wachstumsdauer von 7 Tagen zu je 60000 Zellen pro Kulturschalenboden, bei einer Wachstumsdauer von 5 Tagen zu je 360000 Zellen pro Kulturschalenboden ausgesät. Das Claycomb-Medium wurde ab dem dritten Tag täglich gewechselt. Nach Zugabe der Reagenzien für die diversen Konditionen und Einhaltung der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellrasen 2-mal mit der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS-Puffer) vorsichtig gewaschen. Danach wurden die Zellen für 60sek mit eiskaltem SDS-Lyse-Puffer (25mM HEPES, 2mM EDTA, 25mM NaF, 1% sodiumdodecylsulfate (SDS), pH 7.4) inkubiert, der zusätzlich mit einer Proteasen-Inhibitor-Mischung versetzt war (cOmplete, Roche, Mannheim), wodurch die Zellen vor einer Degradierung durch Proteasen geschützt wurden. Das SDS hat dabei die Aufgabe, zum einen die Ladung der zu untersuchenden Moleküle zu verdecken und zum anderen die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine zu zerstören, um ihren Einfluss auf die Laufgeschwindigkeit der Proteine zu reduzieren. Richteten sich die Untersuchungen zusätzlich auf Phosphorylierungsstellen der Proteine (Phosphorylierungsstelle p368 bei Connexin43) wurde dem Lyse-Puffer des Weiteren eine Phosphatasen-Inhibitoren Mischung (PhosSTOP, Roche, Mannheim) hinzugefügt. Die Kulturschalenböden wurden mit Pipettenspitzen ausgekratzt und die Zellsuspension in Küvetten übertragen. Die Suspensionen wurden anschließend mit jeweils zehn kurzen Stößen einer Sonifikation ausgesetzt, um die Proteine aus den Zellen zu extrahieren.

Danach wurde der Proteingehalt der Suspensionen mithilfe der BCA-Methode (Bicinchoninsäure) (Thermo Scientific, Waltham, USA, #23225) bestimmt. Somit kann gewährleistet werden, dass annähernd gleich viel Gesamtprotein im weiteren Versuchsverlauf verwendet wird und die Ergebnisse nicht durch unterschiedliche Gesamtproteinmengen verfälscht werden.

Im nun folgenden Schritt der SDS-Gelelektrophorese werden die Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt. Eine angelegte Spannung von 80V-120V bewirkt dabei die Migration der negativ geladenen Moleküle Richtung Anode. Aufgrund des geringeren Widerstandes wandern kleine Proteine schneller als größere, sodass nach der Elektrophorese die Proteine ihrer Größe nach im Gel verteilt sind. Zunächst wurden die Proben dafür entsprechend der Laemmli-Methode mit Laemmli-Puffer für 5min bei 95°C denaturiert und gleiche Mengen Protein auf einem 10%-Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel (SDS-Page) aufgetragen. Die aus zwei Teilen bestehenden Gele wurden in vertikale Elektrophorese-Gelsysteme (Biorad, München) eingebracht. Dazu wurde in den Zwischenraum von ca. 1mm entfernten Glasplatten zunächst ein Trenngel bis etwa 2cm unterhalb des oberen Randes gegossen und zur Polymerisation gebracht. Nach ca. 20min wurde der verbliebene Zwischenraum bis zum oberen Rand der Glasplatten mit Sammelgel befüllt und mit einem Kunststoffkamm versehen, sodass später die Proben in gleichmäßigem Abstand auf das Gel aufgetragen werden konnten. Tetramethylethyldiamin (TEMED) wurde dabei als Katalysator, Ammoniumpersulfat (APS) als Initiator der Polymerisation verwendet.

Nach Abschluss der zweiten Polymerisation konnten die Käme entfernt und die Gele mit den Proben befüllt werden. Während der Wanderung der Proben durch das Sammelgel wurde eine Spannung von 80V, im Trenngel von 120V angelegt. Zur späteren Bestimmung der Größe der Proteine wurde neben den Proben ein Marker mit Proteinen bekannter Größe aufgetragen (PPL-Marker: engl.: prestained protein ladder; Fermentas, St. Leon-Rot).

Die Proteine wurden anschließend mittels der feuchten Übertragungsmethode (wet-blot Methode) auf eine Membran aus Nitrozellulose (Novex, Thermo Fisher) übertragen. Dafür wurde das Gel an die Nitrozellulosemembran angelegt und auf jeder Seite mit zwei angefeuchteten Filterpapieren umschlossen. Diese Anordnung wurde nun zwischen zwei Graphitelektroden geklemmt und in eine Mini-Transblot-Kammer gestellt. Die Kammer wurde mit Transferpuffer (25mM Tris, 192mM Glycin und 20% (v/v) Methanol) befüllt. Für die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran wurde ein Stromfluss von 0,8mA/cm² über 90min verwendet.

Die für eventuelle weitere Bindungen freien hydrophoben Bindungsstellen auf den Membranen wurden mit fettarmer Milch, die zu 5% in TBS-T-Puffer (20mM Tris-base,

137mM NaCl, 0.0475% Tween, pH 7.6) gelöst wurde, für 30min blockiert. Im folgenden Schritt wurden die Membranen nun entsprechend den Herstellerangaben bei 4°C über Nacht mit dem Erstantikörper inkubiert. Diese wurden entweder in fettarmer Milch, zu 5% gelöst in TBS-T, oder bovinem Serum-Albumin (BSA), zu 5% gelöst in TBS-T, gelöst. Anschließend wurden diese Erstantikörper mit dem der Ursprungsspezies, entweder Kaninchen oder Maus, entsprechenden Zweitantikörper für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zweitantikörper wurden wiederum ebenfalls in fettarmer Milch, zu 5% gelöst in TBS-T, gelöst.

Mittels der Elektrochemilumineszenz-Methode (ECL) (0,5% Luminol, 0,25% Paracumaricssäure, 0,03% Hydrogenperoxid, 0,1M Tris-HCl) wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Im letzten Schritt wurden diese Banden densitometrisch mithilfe des Programmes ImageJ analysiert und in Microsoft Excel überführt.

3.6 Immunpräzipitation

Mithilfe der Immunpräzipitation können spezifisch Proteine aus einem Zelllysat aufgereinigt und ihre Interaktionspartner analysiert werden. Dafür muss eine Antigen-Antikörper-Bindung mit einem dafür spezifischen Antikörper eingegangen werden, der selbst an einen festen Gegenstand bindet.

Die HL-1-Kardiomyozyten wurden in T75-Flaschen gezüchtet, bis ein einheitlicher Zellrasen entstand. Die Zellen wurden jeweils mit 10mL eiskaltem PBS gewaschen und danach mit modifiziertem RIPA-Puffer, der mit den Protease-Inhibitoren Leupeptin, Pepstatin, Aprotinin, Phenylmethylsulfonylfluorid und den Phosphatase-Inhibitoren versetzt war, für 30min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend aus den Flaschen gekratzt und durch jeweils 10-maliges Auf- und Abziehen mit 20G und 27G Nadeln homogenisiert. Über Nacht wurden gleiche Mengen an Protein mit entsprechenden Antikörpern gegen die aufzureinigenden Proteine (Pg oder Dsg2) oder als Kontrolle mit einer Immunglobulin G (IgG)-Fraktion derselben Antikörperspezies (Kaninchen für Cx43, Maus für Dsg2) inkubiert. Danach wurden die Lysate mit vorgewaschenen magnetischen Mikroperlen, den Dynabeads® Protein G (Life Technologies), für 120min bei 4°C inkubiert. In diesem Schritt wurden die Antikörper-Protein-Komplexe über den Fc-Teil des Antikörpers an das Protein G gekoppelt, mit dem

die Mikroperlen beschichtet sind. Um die Proteine zu entfernen, die nicht über die Antikörper an den Mikroperlen haften, wurden diese 2-mal in Waschpuffer I, 3-mal in Waschpuffer II und 2-mal in Waschpuffer III bei 4°C gewaschen. Danach wurden die Dynabeads® Protein G in Laemmli-Puffer resuspendiert und die Proteine für 10min bei 95°C denaturiert. Die Proteine wurden auf 10%-Polyacrylamid-Gelen aufgetragen und eine Gel-Elektrophorese durchgeführt. Dieser und die weiteren Schritte entsprechen dem Vorgehen, das im Absatz „Elektrophorese und Western Blot“ beschrieben ist.

3.7 siRNA-vermittelte Hemmung der Dsg2- und Pg-Expression

Um die Expression der Gene der Proteine Dsg2 und Pg zu vermindern, wurde small interfering RNA (siRNA) verwendet. Die siRNA muss dafür eine Sequenz besitzen, die komplementär zu einem Teil der mRNA des ausgewählten Gens bzw. Proteins ist. Dadurch bindet sie an die entsprechende mRNA und inhibiert so deren Funktion (Carthew and Sontheimer, 2009; Kaestner et al., 2015). Dafür wurde ON-TARGETplus SMARTpool mouse siRNA für Dsg2 und Pg (JUP) und als Kontrolle ON-TARGETplus non-targeting control pool siRNA, deren Sequenz mit keiner mRNA kompatibel ist, verwendet (Dsg2-, Pg-, n.t.-siRNA) (Thermo Fisher Scientific/Dharmacon, Lafayette, USA). Als Transfektionsmethode wurde die Elektroporation gewählt. Dafür wurde das System der Firma Lonza (4D-Nucleofector, Lonza, Köln) verwendet. Die ersten Experimente mit dem GFP-Multigen-Vektor zeigten, dass die höchste Effektivität bei HL-1-Kardiomyozyten mit der Elektroporationslösung Amaxa™ SF und dem Puls EN150 erreicht werden konnte. Pro verwendete Küvette von Lonza können dabei maximal ca. 4000000 Zellen gleichzeitig transfiziert werden. Konfluente HL-1-Kardiomyozyten wurden für 5min mit Trypsin von den T75-Kulturflaschenböden gelöst und bei 300 Umdrehungen pro min (rpm, rates per minute) für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen, das Zellsediment in der Amaxa™ SF Lösung suspendiert und die Suspension schließlich in die Küvetten von Lonza überführt. Diese wurden anschließend in den Nucleofector™ platziert und mit dem Puls EN150 der Elektroporation ausgesetzt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen auf den Kulturschalenböden oder den MEA-Elektroden ausgesät, die zuvor mit 0,02% Gelatine und 25µg/ml Fibronectin beschichtet und mit ausreichend erwärmten Claycomb-Medium befüllt worden waren. Dabei wurden die Zellen auf den 2cm² großen Kulturschalenböden

zu je 250000, auf den MEA-Elektroden zu je 650000 ausgesät, um nach 3 Tagen einen einheitlichen Zellrasen als auch ein zufriedenstellendes Transfektionsergebnis gewährleisten zu können.

3.8 Messung der Ca^{2+} -Konzentration

Mithilfe Fura-2-basierter Messungen konnten die intrazellulären, vom Kontraktionszyklus abhängigen Schwankungen der Ca^{2+} -Konzentration der HL-1-Kardiomyozyten bestimmt werden (Graves et al., 2012). Fura-2 ist ein ratiometrischer Farbstoff, der sein Fluoreszenzmaximum in Abhängigkeit der Gegenwart von Ca^{2+} ändert. Bei Anwesenheit einer hohen Ca^{2+} -Konzentration wird die höchste Fura-2-Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 340nm gemessen (Absorptionsmaximum, A_{max}), bei Abwesenheit von Ca^{2+} bei einer Anregungswellenlänge von 380nm. Die Emission des Farbstoffs bzw. die Fluoreszenz wird bei der Wellenlänge 510nm bestimmt. Mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration nimmt dabei die Fluoreszenz bei Bestrahlung mit 340nm zu, die Fluoreszenz bei Bestrahlung mit 380nm jedoch ab. Nach der Grynkiewicz-Gleichung ist die Konzentration von freiem intrazellulärem Ca^{2+} proportional zu dem Verhältnis der gemessenen Fluoreszenz/Emission bei Anregung durch Licht der Wellenlängen 340/380nm (Hirst et al., 2005) (siehe Abbildung 5).

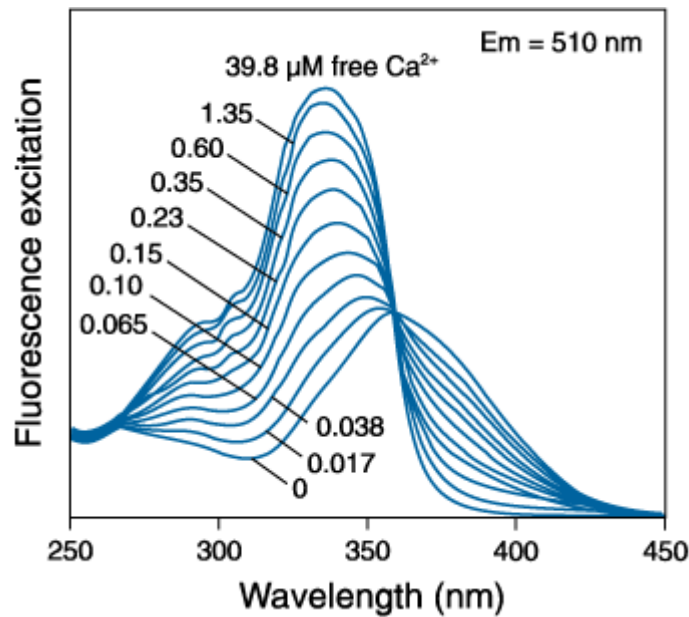


Abbildung 5: Anregungsspektren von Fura-2 in 0-39,8μM haltigen Ca²⁺-Lösungen

(Thermo Fisher)

Zur Versuchsvorbereitung wurden jeweils 150000 HL-1-Kardiomyozyten auf Glasplättchen in 24-Kulturschalenböden ausgesät bis ein dichter Zellrasen entstand. Der Zellrasen wurde 2-mal mit 500μL Fura2-Messpuffer gewaschen. Danach wurden die HL-1-Kardiomyozyten mit einer Mischung aus 0,4% Fura-2-AM (Molecular Probes, Thermo Fisher) und 0,4% PluronicF-127 (Life Technologies, Thermo Fisher), gelöst in Messpuffer, für 20min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 15min in Messpuffer ohne Zusatz inkubiert. Um ein Bleichen des Farbstoffes zu verhindern, fanden die Inkubationen in Dunkelheit statt. Die Glasplättchen wurden in einem Träger eingespannt und mithilfe eines invertierten Mikroskops (Carl Zeiss Microscopy) untersucht. Dabei wurde die Polychrome V Lichtquelle (TILL Photonics, Martinsried), die CoolSNAP-Hq2 Digitalkamera (Photometrics) und ein Fura-2 Filterset (AHF Analysetechnik, Tübingen) verwendet. Vor der Messung wurden 5 Zellen aus den sich im Sichtfeld befindenden Zellen bestimmt, bei denen die Ratio aufgenommen werden sollte. Diese wurden in der Software manuell umrandet, um nur das Signal dieser einzelnen Zellen zu messen. Somit konnte während eines Messvorgangs gleichzeitig die Fluoreszenz von 5 Zellen gemessen werden. Während des Versuchs wurden die Zellen alle 0,35sek mit den Wellenlängen 340/380nm bestrahlt und die Fluoreszenz gemessen.

Nach 90sek basaler Messung wurde F/R in der jeweiligen Konzentration 5 μ M bzw. 10 μ M zugegeben und anschließend für weitere 90sek gemessen. Das Verhältnis der korrespondierenden Zahlenwerte wurde in eine Microsoft-Excel Datei übertragen und ausgewertet.

3.9 Dispase-basierter Dissoziationsansatz

Mithilfe eines Dissoziationsansatzes können Aussagen über die interzelluläre Haftung getroffen werden. Indem ein einheitlicher Zellrasen mechanischen Scherkräften ausgesetzt wird, zerfällt dieser in mehrere kleinere Fragmente. Die Anzahl der Fragmente gibt nun indirekt Aufschluss über die Stärke der Adhäsion. Grundlage des Versuchs ist das Anwachsen eines einheitlichen HL-1-Kardiomyozyten-Zellrasens auf 24-Kulturschalenböden. Zu Beginn des Versuches wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend pro Schale mit 200 μ L Dissoziationspuffer bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bis sich ein intakter Zellrasen vom Kulturschalenboden löste. Dieser Schritt dauerte in der Regel zwischen 35 und 50min. Anschließend wurde der Puffer vorsichtig abgezogen und durch jeweils 350 μ L HBSS-Puffer (Hanks' balanced saline solution, AppliChem, Darmstadt) ersetzt. Dies ist eine bilanzierte Salzlösung, die sowohl den pH-Wert und das osmotische Gleichgewicht aufrechterhält, als auch die Zellen mit Wasser und Ionen einschließlich Ca²⁺, das für die Cadherin-vermittelte Zelladhäsion wichtig ist, versorgt. Im Folgenden wurden die Zellrasen mechanischen Scherkräften ausgesetzt, indem die Kulturschalenplatte auf einen Orbitalschüttler für 90sek bei 1250 Umdrehungen pro Minute aufgesetzt wurde. Um beim weiteren Vorgehen das Ergebnis nicht zu verfälschen, wurden anschließend pro Kulturschälchen 500 μ L PFA zur Fixierung hinzugefügt. Mit einem binokularen Stereomikroskop (Leica) wurde bei 1,25-facher Vergrößerung die Anzahl der entstandenen Fragmente ausgezählt. Da bei verstärkter Adhäsion die Anzahl der Fragmente geringer als bei erniedrigter Zellkohäsion ist, ist die Fragmentenanzahl ein indirekter Parameter der Kohäsion.

3.10 Mikro-Elektroden-Messungen

Grundlagen

Mikro-Elektroden-Anordnungen stellen eine Möglichkeit dar, elektrische Potentialschwankungen mehrerer Bereiche eines Zellverbundes gleichzeitig zu messen. Im Falle der HL-1-Kardiomyozyten können damit Aussagen über Rhythmus und Frequenz der elektrischen Aktivität sowie deren Ausbreitung über den Zellrasen getroffen werden. Die MEA2100-60-System-Anordnung (Multichannel Systems, Reutlingen) leitet dabei die elektrischen Potentialschwankungen des HL-1-Zellrasens über die 60MEA100/10iR-Ti-gr (Multichannel Systems, Reutlingen) ab, einem mit 60 Elektroden besetzten Kulturschälchen (im Weiteren MEA-Elektroden).

Versuchsvorbereitung

Bevor die HL-1-Kardiomyozyten auf den MEA-Elektroden ausgesät werden konnten, musste die hydrophobe Oberfläche der Elektroden vorbehandelt werden, um das Anwachsen der Zellen zu ermöglichen. Zunächst wurden die Elektroden für 30min mit 500 μ L FCS inkubiert, anschließend für 60min mit 0.02% Gelatine und 25 μ g/ml Fibronectin (in Aqua dest.). Nicht vorbehandelte Zellen wurden zu je 550000, mit siRNA transfizierte Zellen (mithilfe des Lonza Nucleofactors) zu je 750000 auf den Elektroden ausgesät und für 3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die große Zellmenge bei der Aussaat und die damit verbundene kurze Kultivierung von 3 Tagen waren nötig, da auf den MEA-Elektroden die Zellen in einer niedrigeren Menge nicht konfluent anwachsen konnten. Bei einer längeren Kultivierungszeit wäre außerdem kein ausreichender Effekt der siRNA garantiert gewesen. Die Medienwechsel fanden täglich mit jeweils 1000 μ L Claycomb-Medium statt. Mit Ausnahme von F/R wurden alle Mediatoren, mit denen die Zellen behandelt wurden, 24h vor Versuchsbeginn appliziert. Ein weiterer Medienwechsel inklusive Versetzung mit den entsprechenden Mediatoren wurde direkt vor Versuchsbeginn vollzogen. Dies wirkte sich positiv auf die Erzeugung elektrischer Potentiale aus und synchronisierte die elektrische Aktivität der Zellen. Die Ableitungsstellen der MEA-Elektroden, an denen das MEA2100-60-System ansetzt, wurden mit 80% Ethanol gereinigt, um eventuelle Schmutzpartikel zu entfernen. Schließlich wurden die MEA-Elektroden in das auf 37°C vorgewärmte

MEA2100-60-System eingesetzt, wobei die schwarz markierte Referenzelektrode nach links gerichtet wurde.

Versuchsdurchführung

Die Messungen wurden mithilfe der Software McRack (Multichannel-Systems, Reutlingen) durchgeführt. Das Programm wurde über den PC gestartet und die Messung aufgenommen. Dabei fanden jeweils drei Messungen statt. Nach einer ersten Messung von 90sek, wurde während der folgenden Messung von 240sek der Mediator F/R zugegeben. Anschließend wurde noch einmal für 90sek gemessen. Über die Software wurde dabei immer eine der vier mittleren Elektroden (44, 45, 54 oder 55) als Bezugselektrode (bzw. Trigger-Elektrode) eingestellt. An dieser wurde jede Aktivität der HL-1-Kardiomyozyten somit zum Zeitpunkt 0ms registriert. Die Potentialschwankungen, die auf den anderen Elektroden gemessen wurden, wurden nun zeitlich in Relation zu dieser Bezugselektrode gesetzt. Dadurch konnten Aussagen über die Ausbreitung der elektrischen Erregung über den Zellrasen getroffen werden. Während der Messung wurden folgende Daten analysiert:

Über die Einstellung „Display“ wurden gleichzeitig die Potentialschwankungen über jeder Elektrode dargestellt, entsprechend einem normalen EKG.

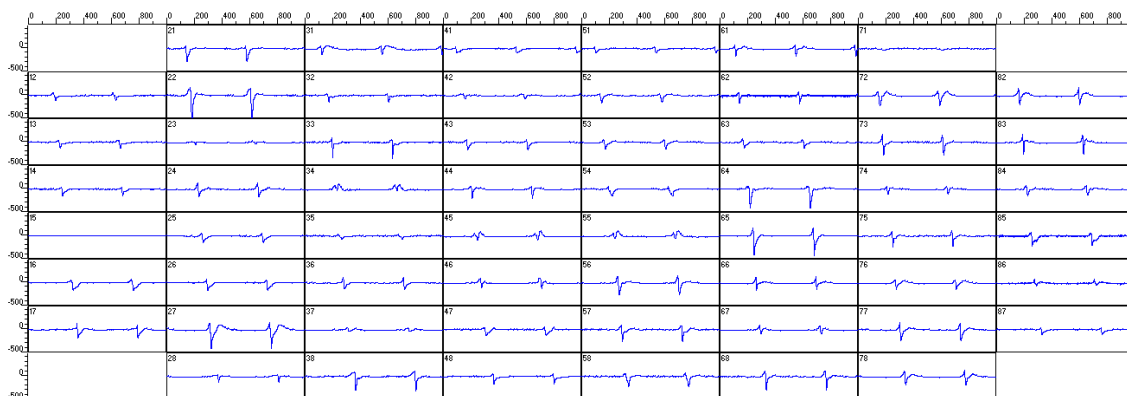


Abbildung 6a: Darstellung „Display“

Material und Methoden

Mithilfe der Einstellung „Number“ wurde bei jeder registrierten Potentialschwankung bzw. jeder registrierten elektrischen Aktivität der Kardiomyozyten, die über dem Schwellenwert lag, der zeitliche Abstand zur Bezugs Elektrode gemessen. Die Bezugs Elektrode erhielt den Wert 0. Mit dieser Einstellung konnte die Geschwindigkeit der Erregungsausbreitung (CV, conduction velocity) bestimmt werden. Dabei wurde in jeder Kondition der zeitliche Abstand einer zufälligen Elektrode zu ihren Nachbarelektroden gemessen („Delay“) und darüber die CV errechnet.

	21	31	41	51	61	71	
	-96.92	-119.80	-144.84	-138.92	-127.72	-58.24	
12	-45.44	-59.96	-69.88	-87.20	-97.92	-102.40	-75.00
13	-13.60	-34.44	-44.04	-67.36	-70.80	-67.72	-48.32
14	3.52	-10.64	-11.64	-35.00	-26.28	-24.88	-18.04
15	-250.00	21.32	23.56	3.56	-0.52	3.68	7.16
16	79.76	52.80	40.04	33.04	29.44	21.60	31.12
17	113.80	78.80	75.40	65.80	51.64	52.80	64.24
		132.24	123.40	122.52	96.28	91.96	99.96

Abbildung 6b: Darstellung „Delay“

Die Einstellung „False Color“ übertrug diese Zahlenwerte in eine farbliche Darstellung, sodass eine Erregung 200ms vor der Erregung auf der Bezugs Elektrode mit Dunkelrot, eine Erregung 200ms nach der Erregung auf der Bezugs Elektrode mit hellgelb dargestellt wurde.

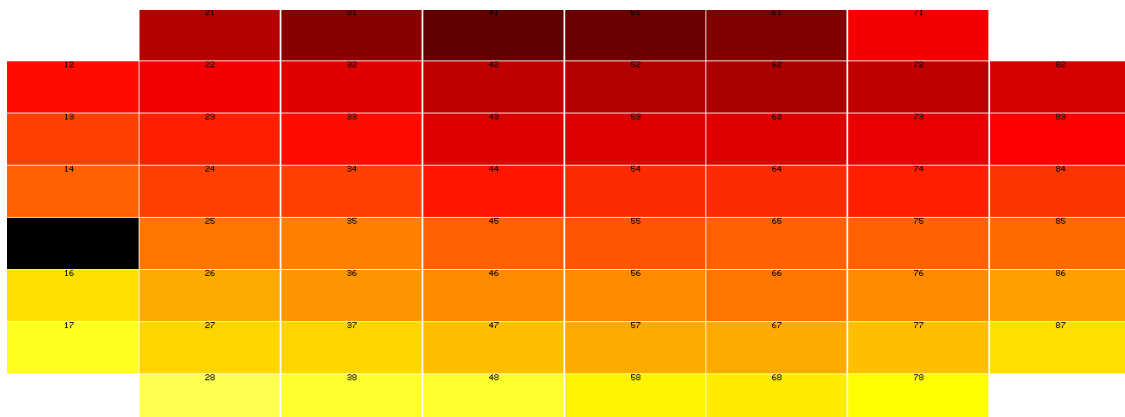


Abbildung 6c: Darstellung „False Color“

Über die Einstellung „Trace“ wurden diese Zahlenwerte über die Zeit (x-Achse) aufgetragen.

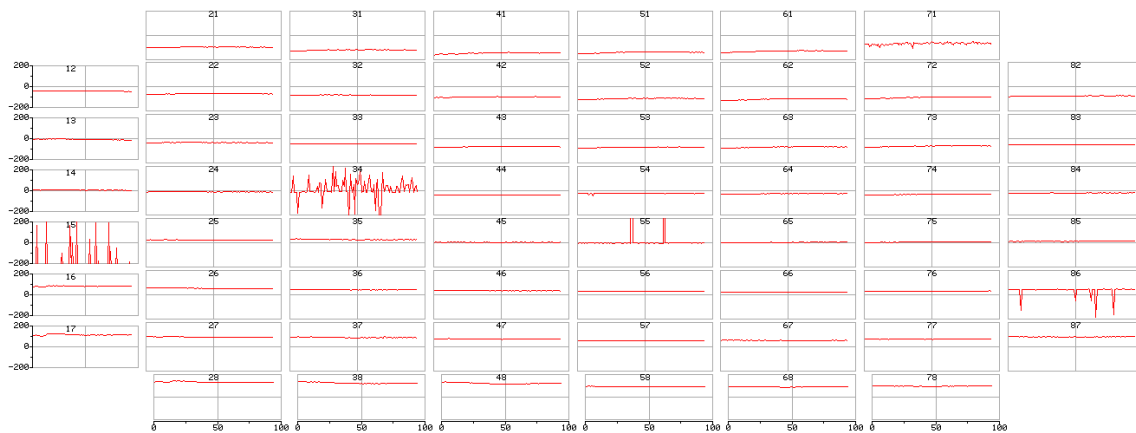


Abbildung 6d: Darstellung „Trace“

Des Weiteren wurden mit den Einstellungen „Rate“ und „Interval“ die Schlagfrequenzen und die Schlagintervalle über jeder einzelnen Elektrode aufgezeichnet.

Herzfrequenz

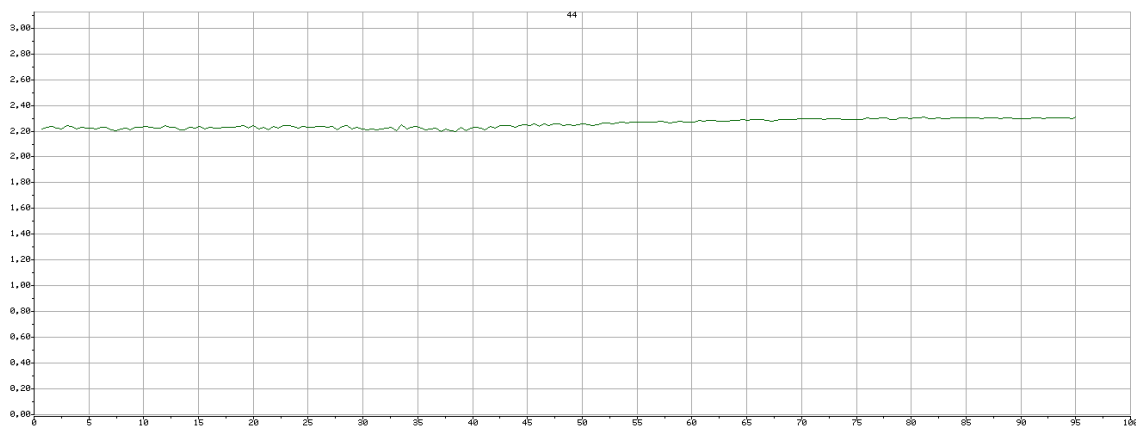


Abbildung 6e: Darstellung „Rate“

Als Wert, mit dem der Grad der Arrhythmie bestimmt werden kann, wurde die SDNN, die Standardabweichung der Schlagintervalle (Standard deviation of NN-intervals), bestimmt. Dies ist eine anerkannte Methode, um den Grad der Arrhythmie anzugeben (de Sousa et al., 2010). Dafür wurden für jede Kondition die SDNNs von drei der 60 Elektroden bestimmt und diese in Verhältnis zur Kontrolle gesetzt.

3.11 Herzpräparation und -perfusion nach Langendorff

Grundlagen

Die Langendorff-Perfusion ermöglicht es, physiologische Parameter wie Blutdruck und Herzfrequenz eines lebenden Herzes ex-vivo zu messen, ohne jedoch durch die Grenzen eines Versuchs am lebenden Tier eingeschränkt zu sein. Der Langendorff-Apparat ersetzt dabei die Körper- bzw. Kreislauffunktionen, indem er eine kontinuierliche Versorgung des Herzes mit einem auf 37°C erwärmten physiologischen Puffer gewährleistet und gleichzeitig wichtige Parameter misst.

Vorbereitung des Langendorff-Apparates

Der Langendorff-Apparat (ADInstruments GmbH, Spechbach) besteht aus einem Zwei-Schlauch-System, bei dem im kleineren, innen gelegenen Schlauch der physiologische Krebs-Henseleit-Puffer (Langendorff-Perfusionspuffer) und im größeren, äußeren Schlauch auf 37°C erwärmtes Wasser zirkulieren. Um das Schlauchsystem komplett auf 37°C zu erwärmen, wurde die Pumpe für das äußere System ca. 30min vor Versuchsbeginn gestartet. Gleichzeitig wurde das innere Schlauchsystem mit dem Krebs-Henseleit-Puffer befüllt, der zusätzlich mit 18,8nM Norepinephrin versetzt war, und mit Carbogen bis zum Versuchsende begast wurde. Carbogen ist ein Gasgemisch aus 5 Volumenteilen CO₂ und 95 Volumenteilen O₂, das den pH-Wert im optimalen Bereich hält und die Zellen mit Sauerstoff versorgt. Das Dsg2-LP und VE-Cad-LP wurden im Krebs-Henseleit-Puffer verdünnt und während des Versuches mithilfe einer handelsüblichen Anästhesie-Pumpe in das Schlauchsystem injiziert, sodass am Ende eine Konzentration von jeweils 20µM vorlag. Abschließend wurde vor dem Versuchsstart die Einheit zur Druckmessung geeicht. Dafür wurde ein 1m langer Schlauch, der mit der Messeinheit in Verbindung stand, mit Puffer befüllt und 1m in die Höhe gehalten. Der Druck, der nun auf die Messeinheit ausgeübt wurde, wurde auf 73,55mmHg geeicht. Zur Messung und Auswertung wurde die Software LabChart7 (ADInstruments GmbH, Spechbach) gestartet und bei jedem neuen Herz bzw. der Zugabe von Mediatoren der Zeitpunkt mit einem Kommentar in der Software festgehalten.



Abbildung 7: Aufbau des Langendorff-Apparates und ein präpariertes Pg-KO-Herz

Präparation des Herzes

Die Zucht und Tötung der Mäuse, sowie die Verwendung im Versuch war in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Europäischen Kommission und lokalen Universitätsrichtlinien. Es wurden neben gesunden Balb/c-Kontrollmäusen herzspezifische Pg-Knockout-Mäuse verwendet, die zuvor nach dem Cre/loxP-System von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) gezüchtet worden waren (Schinner et al., 2017). Dies hatte das spezifische Entfernen von DNA-Sequenzen in lebenden Organismen ermöglicht. Die Balb/c-Wildtyp und die herzspezifischen Plakoglobin-Knockout-Mäuse wurden von der Tierzucht der Universität bezogen. Im Sinne eines ex-vivo Experiments wurden die Mäuse im Alter von 10-14 Wochen von einem

Material und Methoden

Labormitarbeiter mit entsprechender Zulassung mittels Genickbruch getötet und unmittelbar anschließend das Herz entnommen.

Zunächst wurden die noch schlagenden Herzen aus dem toten Tier entnommen, indem mit einer Schere das bauchseitige Fell und die darunterliegende Körperfazie durchtrennt und anschließend der Brustkorb durch Inzisionen am Diaphragma und den seitlichen Brustkorbregionen eröffnet wurde. Das Herz wurde nun mit einer Pinzette fixiert und mittels einer Durchtrennung der herznahen Gefäße entfernt. Unmittelbar anschließend wurde das Herz in eiskalten, Carbogen-begasten und mit 2,75KU/ml Heparin versetzten modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer (Langendorff-Präparationspuffer) getaucht. Der Puffer hatte dabei die Wirkung einer kardioplegen Lösung, indem er mit sofortiger Wirkung die Herzkontraktion unterbrach. Dieser Schritt war notwendig, um zum einen den Metabolismus der Herzzellen während der weiteren Präparation auf ein Minimum zu erniedrigen und somit einen artifiziell erzeugten Gewebeschaden so gering wie möglich zu halten; zum anderen, um durch eine Unterbrechung der Herzkontraktionen die weitere Präparation zu ermöglichen.

Zuerst wurde nun makroskopisch sichtbares Lungengewebe entfernt, das eventuell mitreseziert wurde. Daraufhin wurde das Herz in eine zweite, mit Langendorff-Präparationspuffer befüllte Plastikschiene transferiert. An dieser wurde eine Kanüle angebracht. Die Aorta ascendens wurde durch Präparation freigelegt und wenige Millimeter über die Kanüle gezogen, an der sie mittels zwei Fäden zirkulär befestigt wurde. Insgesamt dauerte die Präparation nicht länger als 5min. Das Herz wurde anschließend über die Kanüle am Langendorff-Apparat befestigt und zwei Elektroden im Ventrikel angebracht. In der Software LabChart7 wurde nun die Messung gestartet. Zunächst wurde das Augenmerk auf EKG und Druckmessung gelegt, um zu prüfen, ob eine reguläre Herzaktion stattfindet bzw. alle Parameter gemessen werden können.

Beginn der Langendorff-Perfusion

Die Herzen wurden mit einem konstanten Druck von 60mmH₂O retrograd über die Aorta ascendens mit dem Langendorff-Perfusionspuffer perfundiert. Über die Aorta ascendens gelangt der Puffer dabei in die Herzkranzgefäße und versorgt so das Herzgewebe über die Dauer des Versuchs mit Nährstoffen und Sauerstoff. Sofort nach Perfusionsstart mit

dem Puffer begannen die Herzen wieder zu schlagen. Nach 10min Kontrollmessung wurde über die Anästhesie-Pumpe das Dsg2-LP und das VE-Cad-LP direkt über der Kanüle injiziert. Unter Berücksichtigung einer 20-fachen Verdünnung bei der Injektion in das Schlauchsystem und unter Berücksichtigung der für jedes Herz unterschiedlichen Höhe des Puffer-Koronarflusses pro min wurde eine Endkonzentration der zugesetzten Peptide von 20 μ M erreicht. Ausschlusskriterien bei den Messungen waren eine Präparationsdauer über 10min sowie ein Abbruch der Herzkontraktion während des Versuchs (Bell et al., 2000).

Die Rohdaten wurden anschließend über die Software LabChart7 ausgewertet, wobei der Fokus auf die Auswertung der Herzschläge gelegt wurde. Dabei wurde analog den MEA-Messungen die SDNN bestimmt.

3.12 Statistik

Bei Datenwerten aus zwei zu vergleichenden Gruppen wurde unter der Annahme, dass die beiden Gruppen voneinander unabhängig sind und eine Normalverteilung der erhobenen Daten vorliegt, der zweiseitige, ungepaarte t-Test angewandt. Gab es mehr als zwei Vergleichsgruppen, wurde unter der Annahme, dass die Gruppen voneinander unabhängig sind und eine Normalverteilung der erhobenen Daten vorliegt, die einfaktorielle ANOVA durchgeführt. Zur Vermeidung einer Alpha-Fehler-Kumulierung bei den notwendigen Post-Hoc-Tests wurde die Bonferroni-Holm-Korrektur angewandt.

Statistische Signifikanz wurde ab einem Wert von $p < 0,05$ angenommen. Die Fehlerbalken stellen jeweils den Standardfehler dar. Mit einem Stern gekennzeichnete Verbindungslinien zwischen den Konditionen zeigen eine Signifikanz an. Eine Kennzeichnung mit der Abkürzung „n.s.“ (nicht signifikant) bedeutet kein Vorhandensein einer Signifikanz.

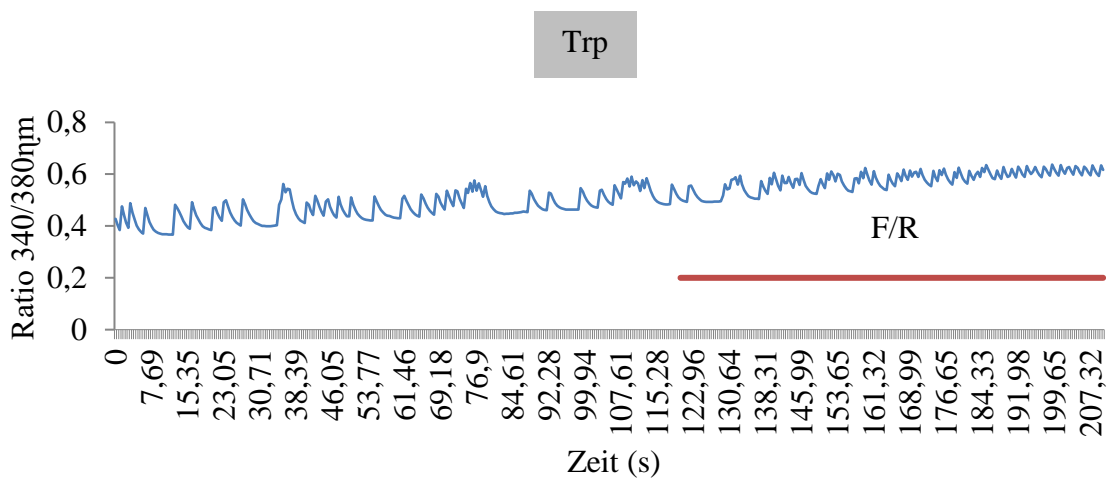
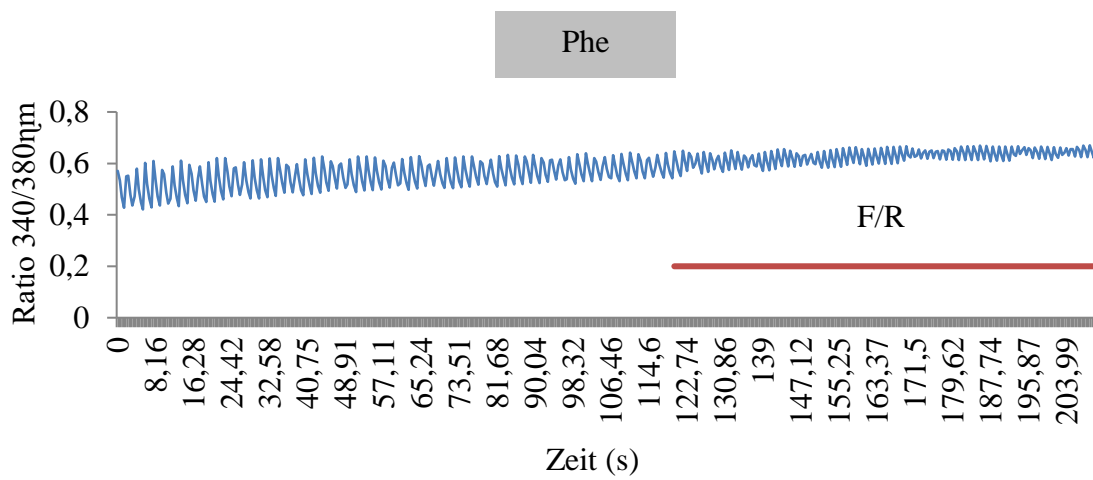
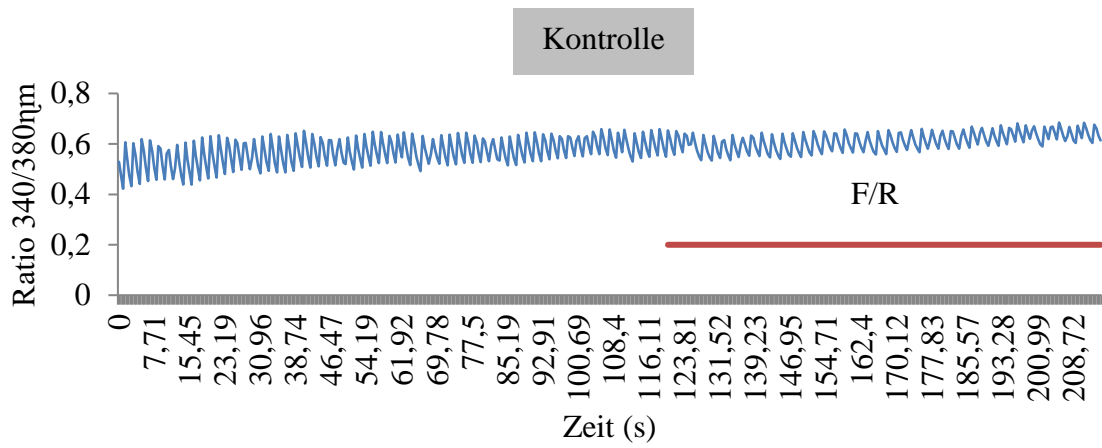
4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von Trp und cAMP auf die Höhe der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

Mithilfe Fura-2 basierter Messungen ist es möglich, Schwankungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration im zeitlichen Verlauf zu analysieren. Damit sollte die Frage erörtert werden, ob die Störung der Cadherin-vermittelten Haftung durch Trp über Veränderungen in der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration vermittelt wird.

In der Kontrolle zeigte sich eine regelmäßige Schwankung der Ca^{2+} -Konzentration. Ein Zyklus des Auf- und Absteigens der Ca^{2+} -Konzentration ist dabei mit einem Erregungszyklus bzw. Kontraktionszyklus der Zelle verbunden. Somit ist in der Kontrolle ein gleichmäßiger Schlagrhythmus mit einer annähernd regelmäßigen Schwankung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu sehen. Zugabe von F/R bewirkte einerseits eine Zunahme der Frequenz, daneben aber auch eine Abnahme in der Amplitude der Konzentrationsschwankungen. Im Vergleich dazu bewirkte Trp eine deutliche Unregelmäßigkeit im Rhythmus der Schwankung der Ca^{2+} -Konzentration, jedoch keine Änderung in der Amplitude. Somit schien Trp primär keinen Effekt auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zu haben, sondern nur sekundär über eine Arrhythmie. L-Phenylalanin (Phe) wurde als strukturähnliche Aminosäure zu Trp als zweite Kontrolle verwendet, da es im Gegensatz zu Trp nicht mit dem Tryptophan-Austausch interferiert (Schlipp et al., 2014). Entsprechend fand sich bei Inkubation mit Phe ein regelmäßiger Rhythmus der Schwankung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sowie eine annähernd gleichbleibende Amplitude. Auch hier nahm, wie in der Kontrolle, nach Zugabe von F/R die Frequenz zu, die Amplitude der Konzentrationsschwankungen jedoch ab. Unter Einfluss des SERCA-Inhibitors Thapsigargin kam die Schwankung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nahezu vollständig zum Erliegen. Eine Zugabe von F/R hatte darauf keinen Effekt. Der Ca^{2+} -Chelator BAPTA wurde verwendet, um die Aussagefähigkeit des Versuches zu testen. Erwartungsgemäß führte eine Inkubation mit BAPTA zu einem kompletten Verlust der intrazellulären Schwankung der Ca^{2+} -Konzentration (siehe Abbildung 8).

Ergebnisse



Ergebnisse

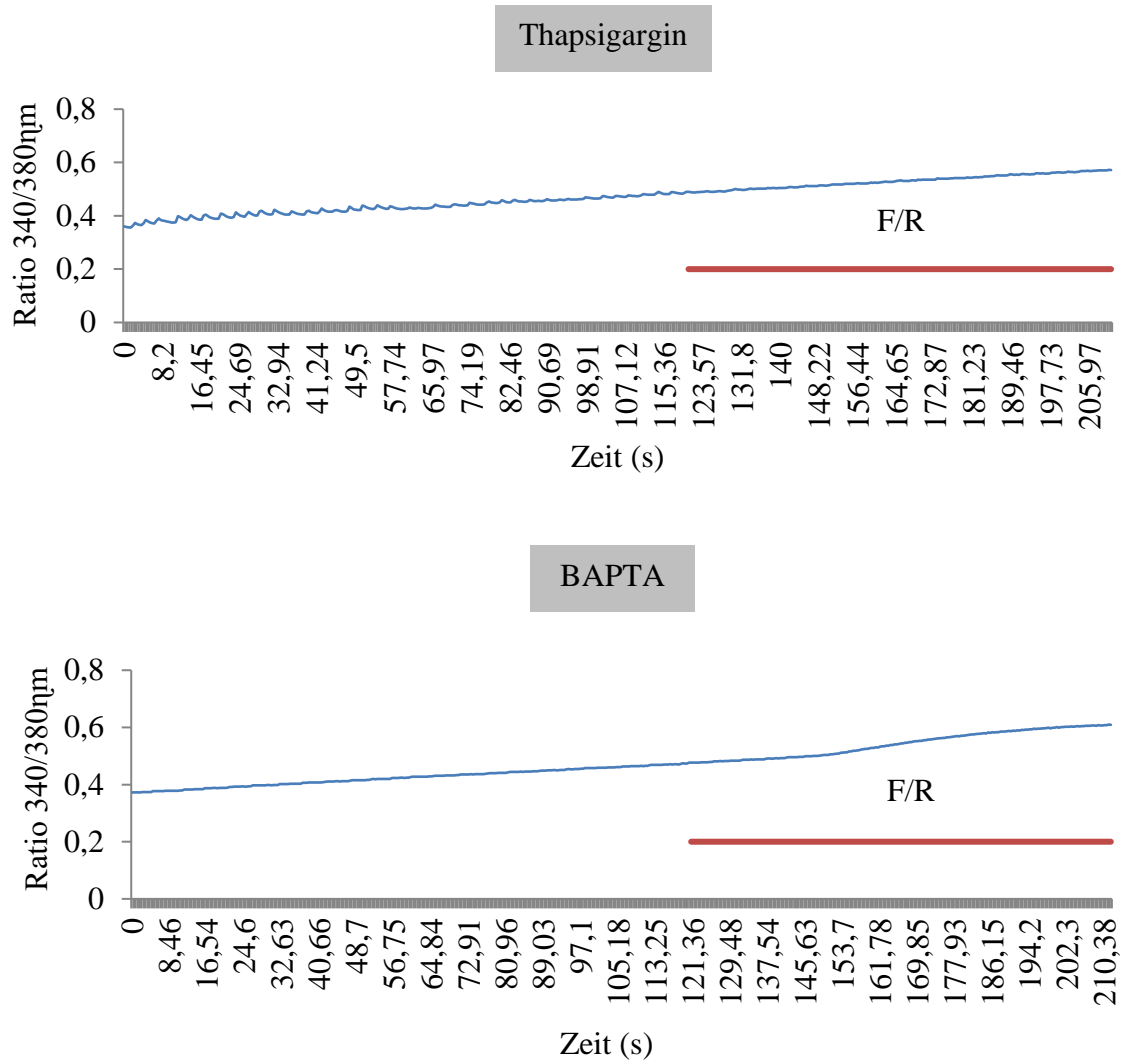


Abbildung 8: Fura-2-basierte Messungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Auf der y-Achse wurde die Ratio des emittierten Lichtes bei 340 und 380nm eingetragen, auf der x-Achse die Zeit in Sekunden. Der Wert der Ratio korreliert mit der Höhe der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. In allen Konditionen wurden die HL-1-Kardiomyozyten nach 120sek mit F/R $5\mu\text{M}/10\mu\text{M}$ versetzt und anschließend die Messung für weitere 90sek aufgezeichnet. Die blaue Kurve entspricht der Ratio über die Zeit, der rote Balken zeigt für 90sek die F/R-Inkubation an. Die Zellen wurden neben der Kontrolle für 24h mit Phenylalanin (Phe) $400\mu\text{M}$, für 24h mit Trp $400\mu\text{M}$, für 30min mit Thapsigargin 500nM und für 30min mit BAPTA $1\mu\text{M}$ inkubiert. (Kontrolle $n=10$, Phe $n=7$, Trp $n=7$, Thapsigargin $n=6$, BAPTA $n=3$)

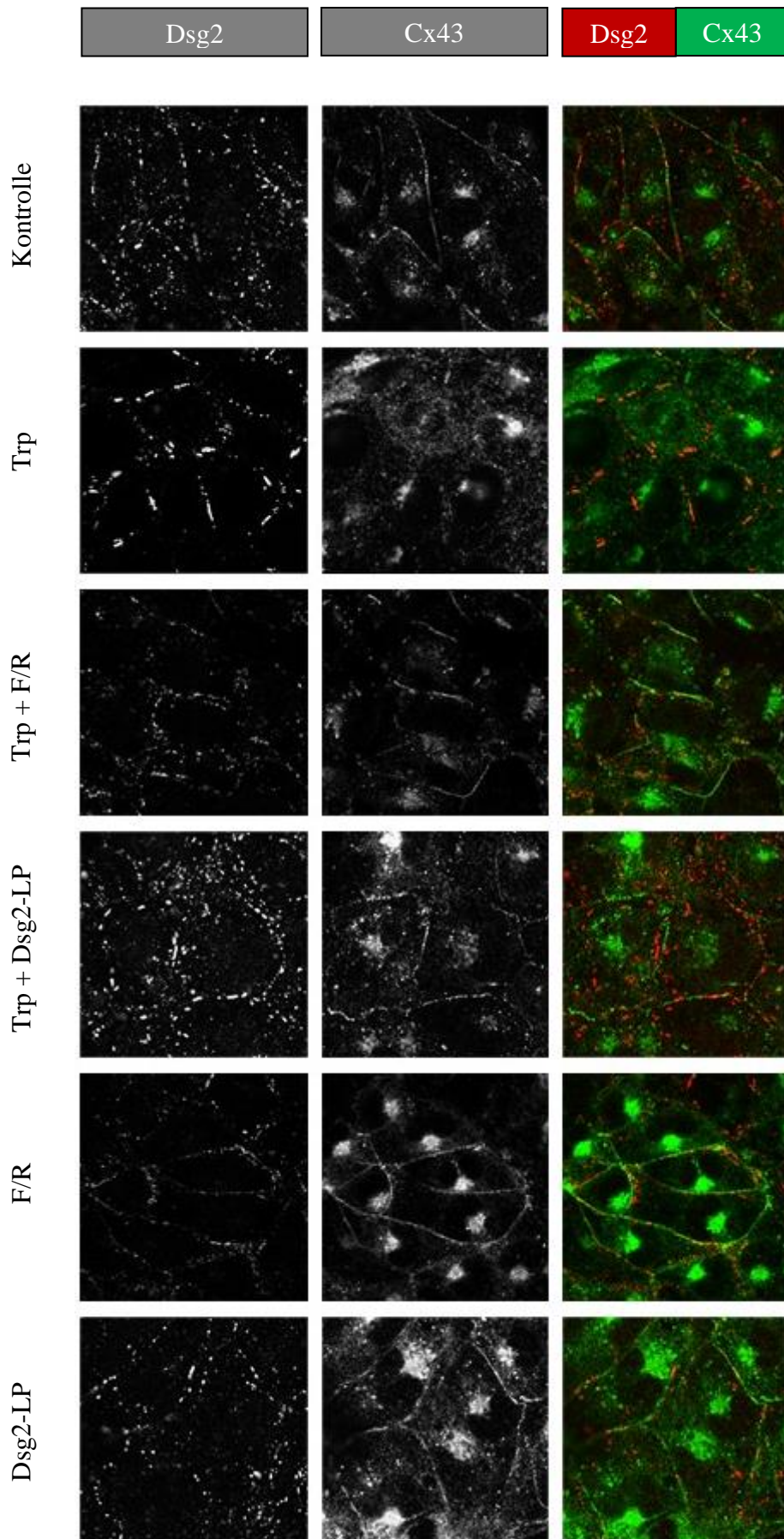
4.2 Wiederherstellung der physiologischen Verteilung von Dsg2 und Cx43 durch Dsg2-LP und cAMP bei desmosomalem Haftungsverlust

Mit Immunfärbungen konnte gezeigt werden, wie sich eine Störung der Cadherin-Haftung auf die Integrität von Desmosomen und GJs auswirkt. Des Weiteren wurde untersucht, ob dabei auch protektive Wirkungen von F/R und Dsg2-LP beobachtet werden können. Als zu analysierende Proteine wurden zum einen das Cadherin Dsg2 gewählt, das als einziges im Herzgewebe vorkommendes Desmoglein eine zentrale Rolle im Aufbau und der Funktion der Desmosomen einnimmt. Zum anderen wurde die Lokalisation von Cx43, dem wichtigsten Protein der GJs, analysiert.

Zunächst zeigte sich, dass in konfluenten HL-1-Kardiomyozyten Dsg2 punktförmig und gleichmäßig entlang der Zellmembran lokalisiert war und Cx43 nahezu durchgehend und linear an der Membran verteilt war. Daneben fand sich auch eine zytoplasmatische Färbung. Beide Proteine schienen teilweise an der Membran zu kolokalisieren (siehe Abbildung 9).

Eine Behandlung konfluenter HL-1-Kardiomyozyten mit Trp führte zu einer Akkumulation irregulärer Dsg2-Aggregate an der Membran. Diese erschienen länglich und ungleichmäßig verteilt. Cx43 ist nach Inkubation mit Trp an der Membran nicht mehr nachzuweisen, dagegen war die zytoplasmatische Cx43-Färbung verstärkt. Eine zusätzliche Inkubation der Kardiomyozyten mit F/R schien die Wirkung von Trp rückgängig zu machen. Dsg2 war unter gleichzeitigem Einfluss beider Substanzen gleichmäßig und punktförmig an der Membran lokalisiert und auch Cx43 war nahezu kontinuierlich an der Membran verteilt, sodass das Bild ähnlich den Kontrollbedingungen erscheint. Neben F/R schien auch eine Inkubation mit Dsg2-LP die Wirkung von Trp rückgängig zu machen. Auch hier fand sich Dsg2 gleichmäßig und punktförmig, Cx43 fast durchgehend und linear an der Membran. Eine alleinige Behandlung der HL-1-Kardiomyozyten mit F/R oder Dsg2-LP hatte dagegen keinen relevanten Einfluss auf die Lokalisation der beiden Proteine.

Ergebnisse



Ergebnisse

Abbildung 9: Immunfärbung für Dsg2 und Cx43. Für jede Kondition wurde die Lokalisation der Proteine Dsg2 und Cx43 mit einer Immunfärbung sichtbar gemacht. Die Graphiken rechts sind eine Überlagerung der beiden Färbungen. Dabei wird Dsg2 mit rot, Cx43 mit grün dargestellt. Neben der Kontrolle wurden die Zellen entweder mit Trp 400 μ M für 24h, Trp 400 μ M für 24h mit F/R 5 μ M/10 μ M für 30min, Trp 400 μ M für 24h mit Dsg2-LP 20 μ M für 24h, F/R 5 μ M/10 μ M für 30min oder Dsg2-LP 20 μ M für 24h behandelt. (K n=7, Trp n=7, Trp + F/R n=7, Trp + Dsg2-LP n=5, F/R n=7, Dsg2-LP n=5) (Modifiziert nach Schinner et al., 2018)

4.3 Stärkender Effekt von Dsg2-LP und cAMP auf die Kardiomyozytenhaftung bei Störung der desmosomalen Haftung

Mithilfe des Dispase-basierten Dissoziationsansatzes wurden die Auswirkungen von cAMP und Dsg2-LP auf die Zelladhäsion von HL-1-Kardiomyozyten unter physiologischen Bedingungen sowie bei einer Störung der desmosomalen Interaktion untersucht. Die HL-1-Kardiomyozyten wurden bis zur Konfluenz gezüchtet und anschließend, wie oben beschrieben, mechanischen Scherkräften ausgesetzt. Die Anzahl der Fragmente ist dabei ein indirekter Wert für die Stärke der Kohäsion. Um eine Störung der desmosomalen Interaktion zu erreichen, wurden die Zellen mit L-Tryptophan (Trp) vorbehandelt. Damit sollte über eine Störung des für Cadherine typischen wechselseitigen Tryptophan-Austauschs die desmosomale Haftung geschwächt werden (Schlipp et al., 2014). Zum anderen wurde über eine Transfektion der HL-1-Kardiomyozyten mit Dsg2- und Plakoglobin-siRNA eine Depletion von Dsg2 und des Plaque-Proteins Pg herbeigeführt. Damit wurde der Expressionsverlust zweier Proteine herbeigeführt, deren Gene im Rahmen der AC von Mutationen betroffen sind.

Zunächst konnten die Ergebnisse aus vorhergehenden Arbeiten bestätigt werden (Schlipp et al., 2014), wonach die Behandlung eines HL-1-Zellrasens mit Trp für 24h die Fragmentenanzahl nach Scherstress signifikant auf $153 \pm 15\%$ der Kontrolle erhöht und damit den mechanischen Zusammenhalt des HL-1-Zellrasens abschwächt (siehe Abbildung 10 A). Ebenfalls konnte mit einer Reduzierung der Fragmentenanzahl auf $62 \pm 8\%$ der Kontrolle und damit einer Verstärkung des mechanischen Zusammenhalts unter Behandlung mit F/R Ergebnisse aus Vorarbeiten bestätigt werden (Schinner et al., 2017) (siehe Abbildung 10 B).

Nun konnte jedoch zusätzlich gezeigt werden, dass sich die Abschwächung der Zelladhäsion unter Trp mit F/R rückgängig machen ließ, indem sich die Fragmentenanzahl unter Behandlung mit beiden Reagenzien auf $91 \pm 21\%$ der Kontrolle reduzierte (siehe Abbildung 10 A). Eine Erhöhung des cAMP-Spiegels stabilisierte also die Zelladhäsion sowohl unter Normalbedingungen als auch bei ihrer Störung. Auch Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), ein PKC-Aktivator, hatte eine kohäsionsverstärkende Wirkung auf den HL-1-Zellrasen ($35 \pm 17\%$ der Kontrolle, siehe Abbildung 10 B).

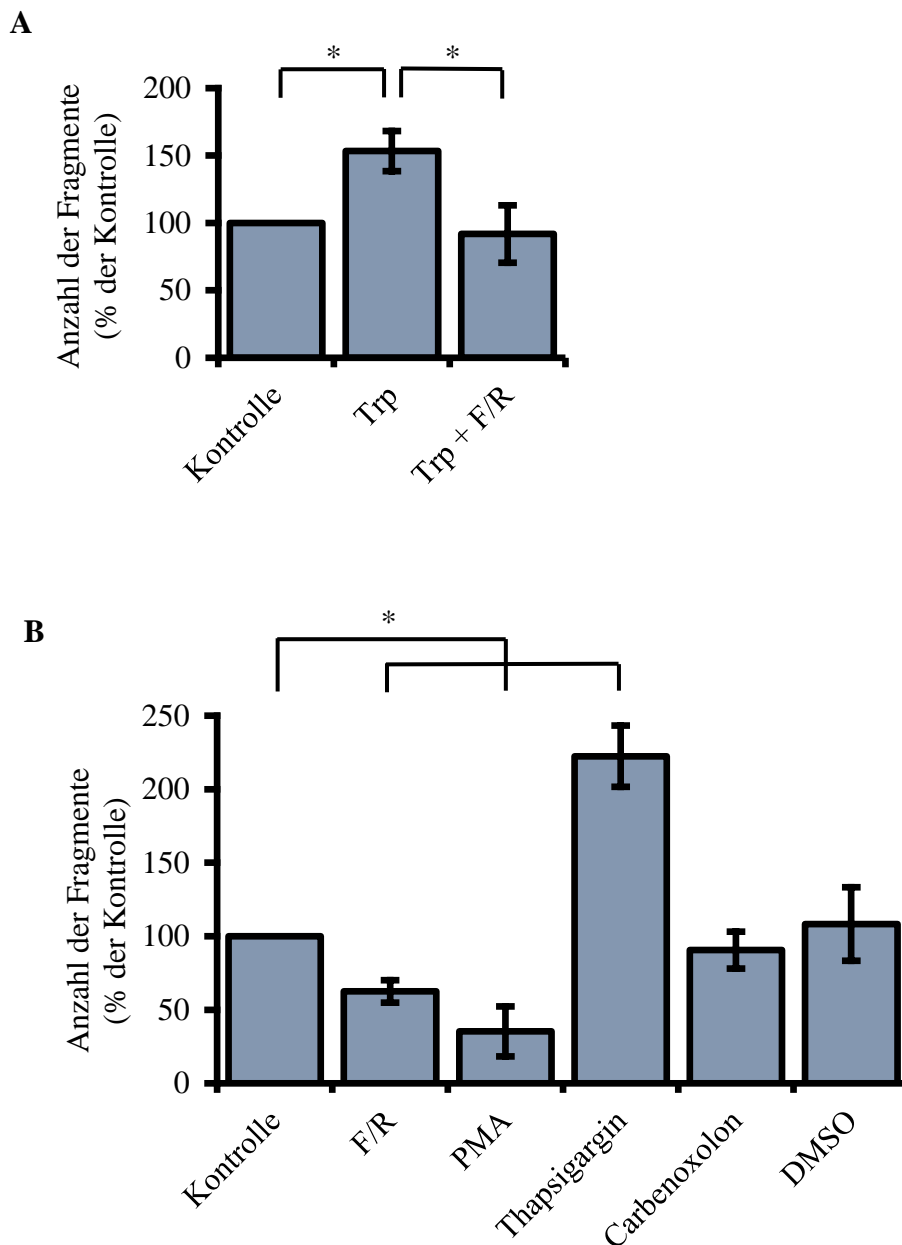


Abbildung 10: Anzahl der Fragmente nach mechanischer Scherbelastung im Dispase-basierten Dissoziationsansatz. **A** Die Zellrasen wurden neben der Kontrolle mit Trp 400 μ M für 24h oder Trp 400 μ M für 24h zusammen mit F/R 5 μ M/10 μ M für 30min behandelt. **B** Die Zellrasen wurden neben der Kontrolle mit F/R 5 μ M/10 μ M für 30min, PMA 100nM für 24h, Thapsigargin 100nM für 24h und Carbenoxolon 20 μ M für 24h behandelt. Die Anzahl der Fragmente in der Kontrolle wurde auf 100% normiert und die Werte der Fragmentenanzahl in den anderen Konditionen dazu in Relation gesetzt. (A: Kontrolle n=9, Trp n=9, Trp + F/R n=7;

Ergebnisse

B: Kontrolle n=10, F/R n=10, PMA n=3, Thapsigargin n= 4, Carbenoxolon n= 7).
(Modifiziert nach Schinner, Erber et al., 2018).

Eine Inkubation mit dem GJ-Inhibitor Carbenoxolon für 24h Stunden führte zu keiner signifikanten Änderung in der Fragmentenanzahl im Vergleich zu unbehandelten HL-1-Kardiomyozyten ($94\pm 18\%$ der Kontrolle, siehe Abbildung 10 B). Dieses Experiment wurde im Hinblick auf die im Folgenden gezeigten elektrophysiologischen Untersuchungen durchgeführt, und deutet an, dass Carbenoxolon zumindest in diesem Untersuchungszeitraum nicht mit der Kohäsion der HL-1-Kardiomyozyten interferiert.

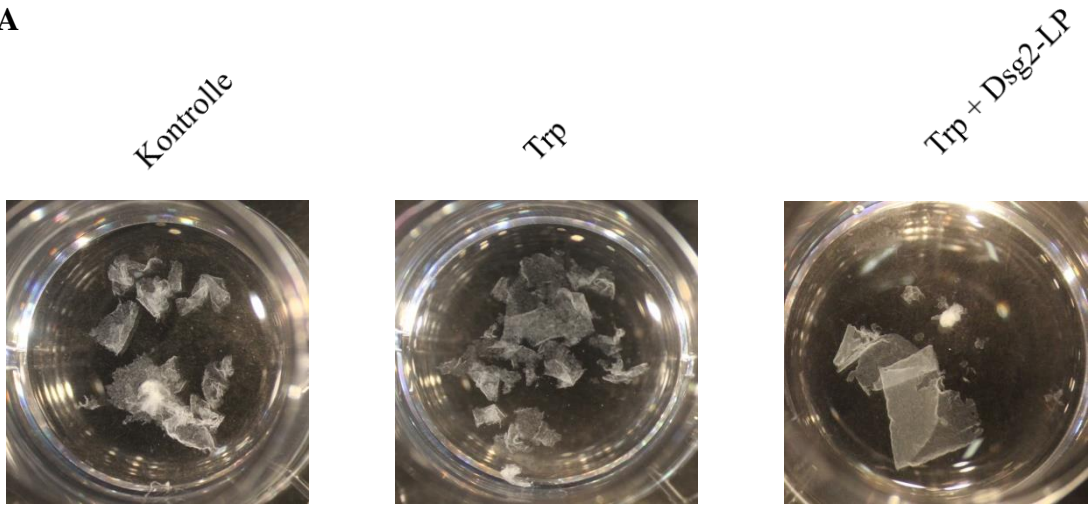
Eine Inkubation der HL-1-Kardiomyozyten mit Dsg2-LP zusammen mit Trp reduzierte die erhöhte Fragmentenanzahl im Vergleich zu alleiniger Trp-Inkubation signifikant auf $100\pm 14\%$ der Kontrolle und somit auf das Niveau von unbehandelten HL-1-Kardiomyozyten. Ähnlich wie F/R hob also auch Dsg2-LP die Auswirkung einer Störung des Tryptophan-Austauschs auf den mechanischen Zusammenhalt des HL-1-Zellrasens auf. Eine Behandlung des Zellrasens alleine mit Dsg2-LP reduzierte die Fragmentenanzahl im Vergleich zur Kontrolle leicht, aber nicht signifikant ($73\pm 18\%$ der Kontrolle, siehe Abbildung 11 A). So entfaltete das Dsg2-LP seinen positiven Effekt auf die Kohäsion hauptsächlich erst bei vorgeschädigter Zellhaftung. Auf der anderen Seite erhöhte das Dsg2-inhibierende Peptid (Dsg2-IP) die Anzahl der Fragmente nach Scherbelastung signifikant auf $194\pm 5\%$ der Kontrolle.

Eine Transfektion der HL-1-Kardiomyozyten mit Dsg2-siRNA oder Pg-siRNA und damit eine deutliche Reduzierung der Expression der betreffenden desmosomalen Proteine Dsg2 und Pg erhöhte signifikant die Fragmentenanzahl nach mechanischer Scherbelastung auf $165\pm 29\%$ bzw. $170\pm 30\%$ der Kontrolle (siehe Abbildung 11 C, D). Auch hier war das Dsg2-LP in der Lage, die erhöhte Fragmentenanzahl der mit Dsg2-siRNA und Pg-siRNA transfizierten HL-1-Zellrasen auf Höhe der Kontrolle zu reduzieren ($77\pm 22\%$ bzw. $87\pm 22\%$ der Kontrolle). Als Kontrolle wurden die Zellen mit non target-siRNA (n.t.-siRNA) transfiziert.

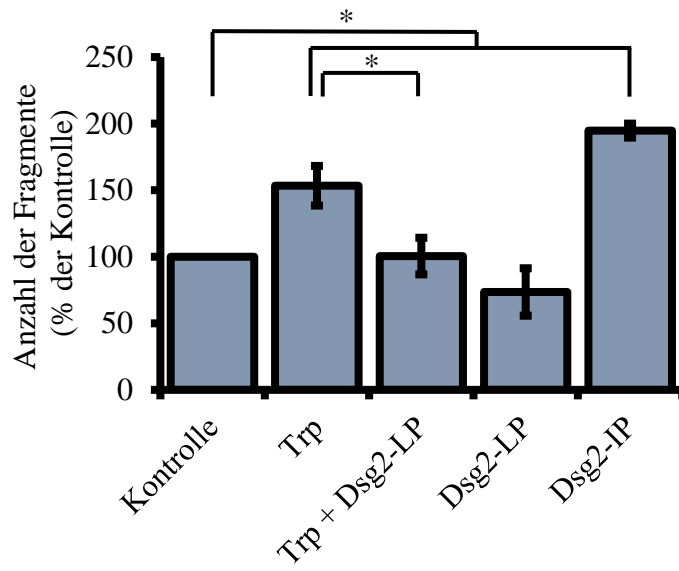
Es lässt sich also zusammenfassen, dass das Dsg2-LP in der Lage war, eine Störung der Zellhaftung, die durch Tryptophan oder durch einen spezifischen Verlust der desmosomalen Proteine Desmoglein2 und Plakoglobin ausgelöst wurde, aufzuheben.

Ergebnisse

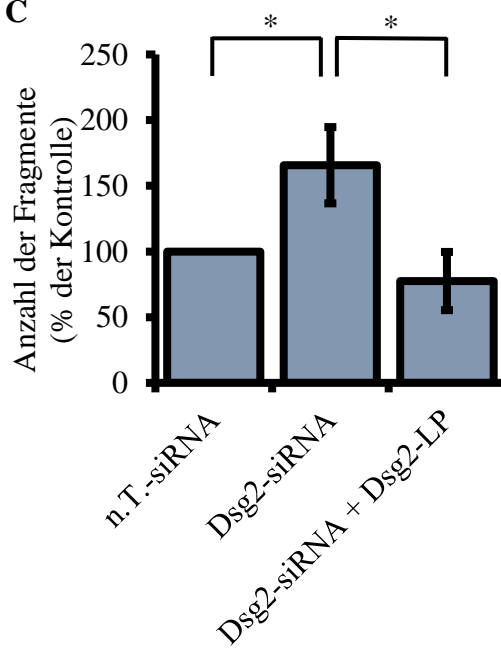
A



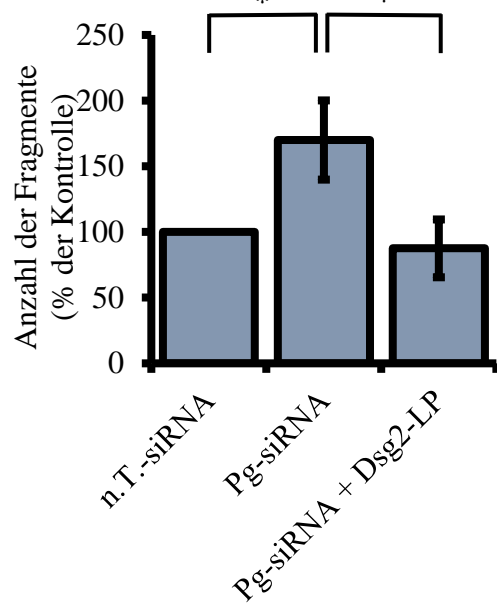
B



C



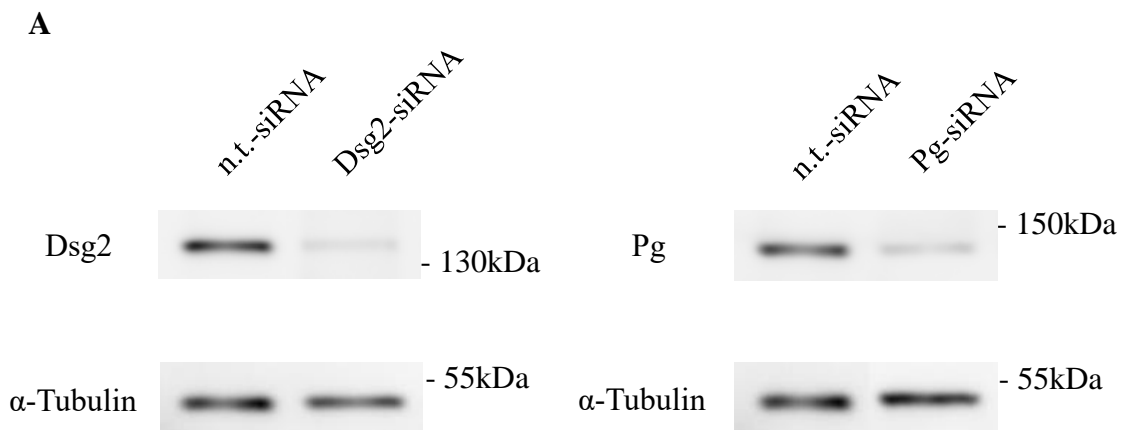
D



Ergebnisse

Abbildung 11: A Beispielhafte Darstellung des fragmentierten HL-1-Zellrasens auf einem 24-Kulturschalenboden nach mechanischer Scherbelastung unter Kontrollbedingungen (links), Behandlung mit Trp 400 μ M für 24h (Mitte) und Trp 400 μ M für 24h + Dsg2-LP 20 μ M für 24h (rechts). **B** Die Zellrasen wurden neben der Kontrolle mit Trp 400 μ M, Trp 400 μ M zusammen mit Dsg2-LP 20 μ M, Dsg2-LP 20 μ M allein und Dsg2-IP 20 μ M für jeweils 24h behandelt. **C, D** Die Zellrasen wurden mit n.t.-siRNA, Dsg2-siRNA und Pg-siRNA transfiziert und daneben auch zusätzlich mit Dsg2-LP 20 μ M für 24h inkubiert (B und C). Die Anzahl der Fragmente in der Kontrolle wurde auf 100% normiert und die Fragmentenanzahlen in den anderen Konditionen dazu in Relation gesetzt. (A: K n=9, Trp n=9, Trp + Dsg2-LP n=7, Dsg2-LP n=5; B: n.t.-siRNA n=8, Dsg2-siRNA n=8, Dsg2-siRNA + Dsg2-LP n=8; C: n.t.-siRNA n=8, Pg-siRNA n=8, Pg-siRNA + Dsg2-LP n=8). (Modifiziert nach Schinner, Erber et al., 2018).

Die Effizienz der Transfektion mit siRNA für die beiden desmosomalen Proteine Dsg2 und Pg wurde mithilfe der Western Blot-Analyse aus Lysaten transfizierter HL-1-Kardiomyozyten bestimmt. Dabei zeigte sich unter Einsatz von Dsg2-siRNA eine signifikante Reduktion der Dsg2-Expression auf 30,2% (verglichen mit Einsatz von n.t.-siRNA) sowie unter Einsatz von Pg-siRNA eine Reduktion der Pg-Expression auf 13,3% (verglichen mit Einsatz von n.t.-siRNA) (siehe Abbildung 12).



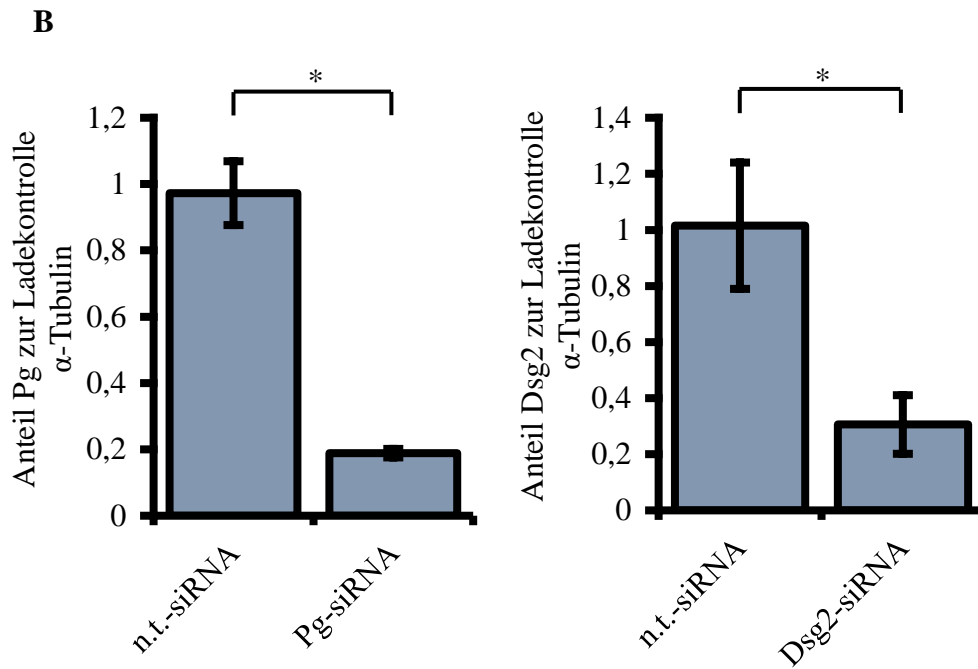


Abbildung 12: A Western Blot-Analyse aus HL-1-Lysaten nach Transfektion mit n.t.-siRNA, Dsg2-siRNA und Pg-siRNA. Das ubiquitär in Kardiomyozyten vorkommende Protein α -Tubulin wurde als Ladekontrolle benutzt. Die Menge an Dsg2 bzw. Pg war nach Transfektion mit siRNA signifikant reduziert. **B** Quantifizierung der Western Blot-Analyse (n=4). (Modifiziert nach Schinner, Erber et al., 2018).

4.4 Verbesserung der Erregungsweiterleitung durch Dsg2-LP und cAMP bei Störung der desmosomalen Haftung

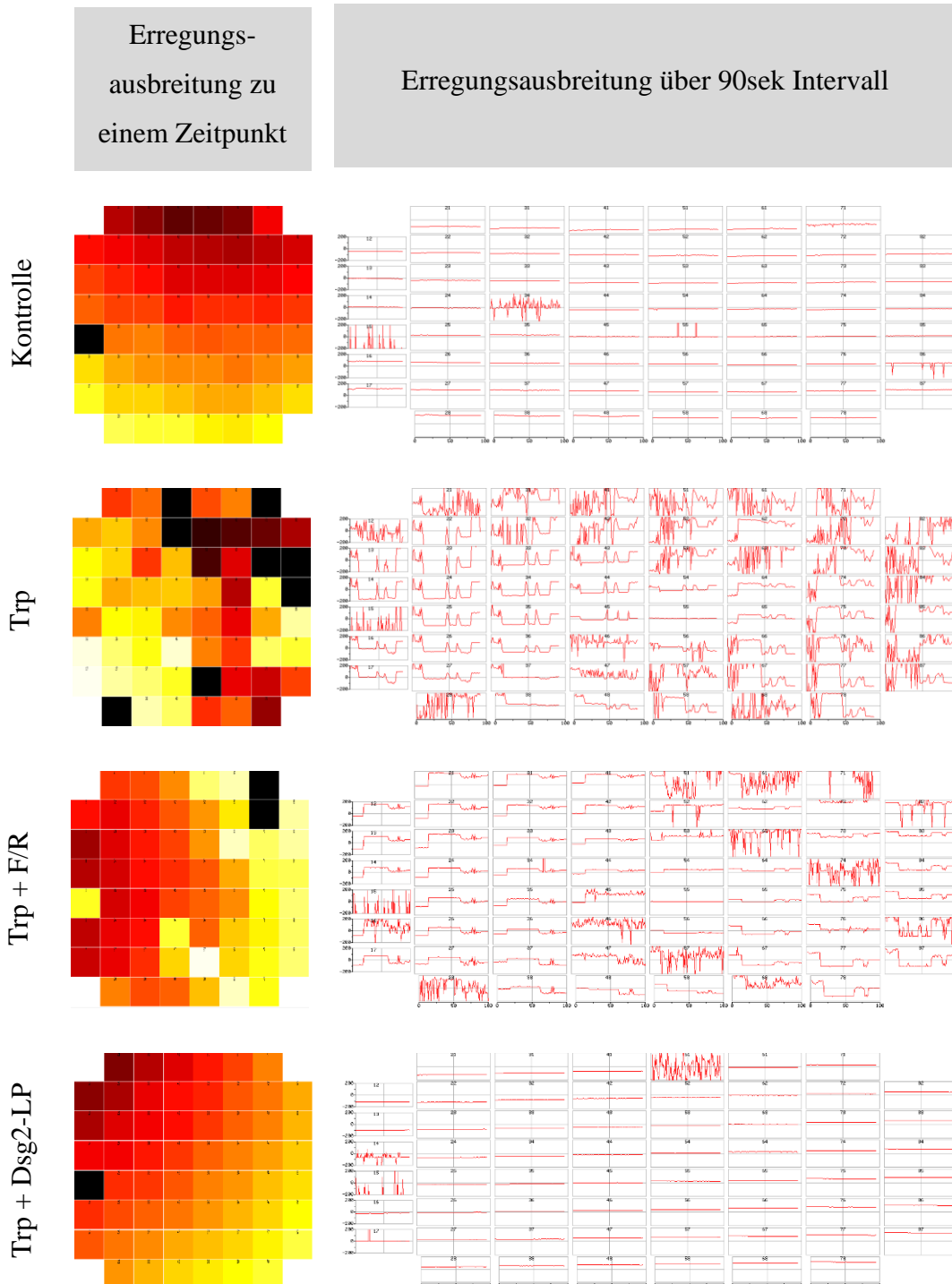
Mittels elektrophysiologischer Untersuchungen mit einer Mikro-Elektroden-Anordnung sollte untersucht werden, ob eine Modulation der desmosomalen Haftung zu Veränderungen der Erregungsweiterleitung führt. Dafür wurden HL-1-Kardiomyozyten verwendet, die entweder mit Trp für 24h behandelt wurden oder mit Dsg2- oder Pg-siRNA transfiziert wurden.

Zunächst wurden die Auswirkungen einer Störung der Cadherin-Haftung auf die Erregungsweiterleitung in HL-1-Kardiomyozyten untersucht. Unter Kontrollbedingungen breitete sich die Erregung gleichmäßig über den HL-1-Zellrasen aus. Dagegen zeigte sich nach Inkubation mit Trp eine deutliche Störung der Erregungsausbreitung. Eine zusätzliche Zugabe von F/R für 3min verbesserte die gestörte Erregungsweiterleitung jedoch deutlich (siehe Abbildung 13 A). So war in der farbkodierten Darstellung nun wieder eine fast gleichmäßige Ausbreitung zu sehen, im abgebildeten Beispiel von links nach rechts. Auch die Verlaufsdarstellung über 90sek zeigte eine deutliche Verbesserung gegenüber alleiniger Behandlung mit Trp. Ebenfalls verbesserte auch das Dsg2-LP nach 24h Inkubation die gestörte Erregungsweiterleitung unter Trp deutlich. Sowohl die farbkodierte als auch die Verlaufsdarstellung zeigten ähnlich der Kontrolle eine gleichmäßige Erregungsausbreitung bzw. gleichbleibende Erregungsabstände über den Elektroden bei Koinkubation der beiden Reagenzien (siehe Abbildung 13 A). Vergleichbar mit Trp wirkte sich der GJ-Inhibitor Carbenoxolon auf die Elektrophysiologie des HL-1-Zellrasens aus, indem er zu einer deutlichen Störung der Erregungsausbreitung führte. Hier war jedoch durch Zugabe von F/R keine Verbesserung festzustellen (siehe Abbildung 13 A). Carbenoxolon diente damit als Positivkontrolle für eine durch Störung der GJ-Funktion induzierte Beeinträchtigung der Erregungsweiterleitung. Im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Trp die Standardabweichung der Schlagintervalle (SDNN) als Maß für die Arrhythmie der Erregungsausbreitung signifikant um den Faktor $11,0 \pm 3,0$, wohingegen eine Erhöhung des cAMP-Spiegels durch F/R als auch eine Stabilisierung desmosomaler Haftung durch Dsg2-LP diesen Wert wiederum signifikant auf das $4,5 \pm 1,1$ -fache bzw. $6,6 \pm 1,8$ -fache der Kontrolle reduzieren konnte. Beide Reagenzien waren somit in der Lage, eine durch Störung der Cadherin-Haftung ausgelöste Arrhythmie zu verbessern (siehe Abbildung 13 B).

Ergebnisse

Daneben reduzierte sich die unter Normalbedingungen gemessene Geschwindigkeit der Erregungsweiterleitung über den HL-1-Zellrasen von $0,84 \pm 0,08 \text{ cm/s}$ signifikant auf $0,038 \pm 0,04 \text{ cm/s}$ unter Trp. Dieser Effekt wurde ebenfalls signifikant durch F/R und Dsg2-LP vermindert. Nach Behandlung mit F/R und Dsg2-LP erhöhte sich die Geschwindigkeit der Erregungsausbreitung auf $0,76 \pm 0,08 \text{ cm/s}$ bzw. $0,92 \pm 0,10 \text{ cm/s}$ (siehe Abbildung 13 C).

A



Ergebnisse

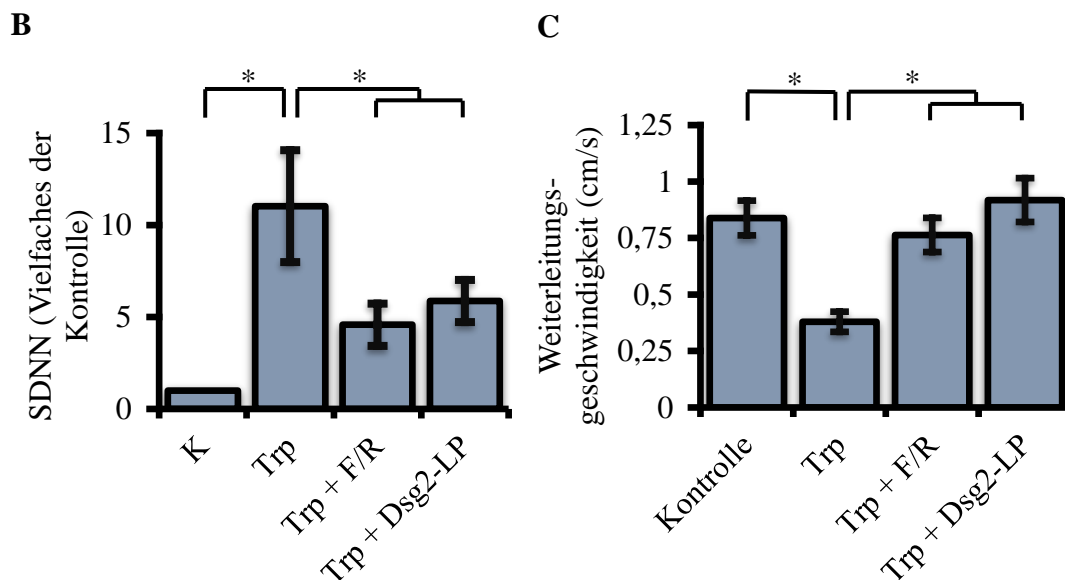
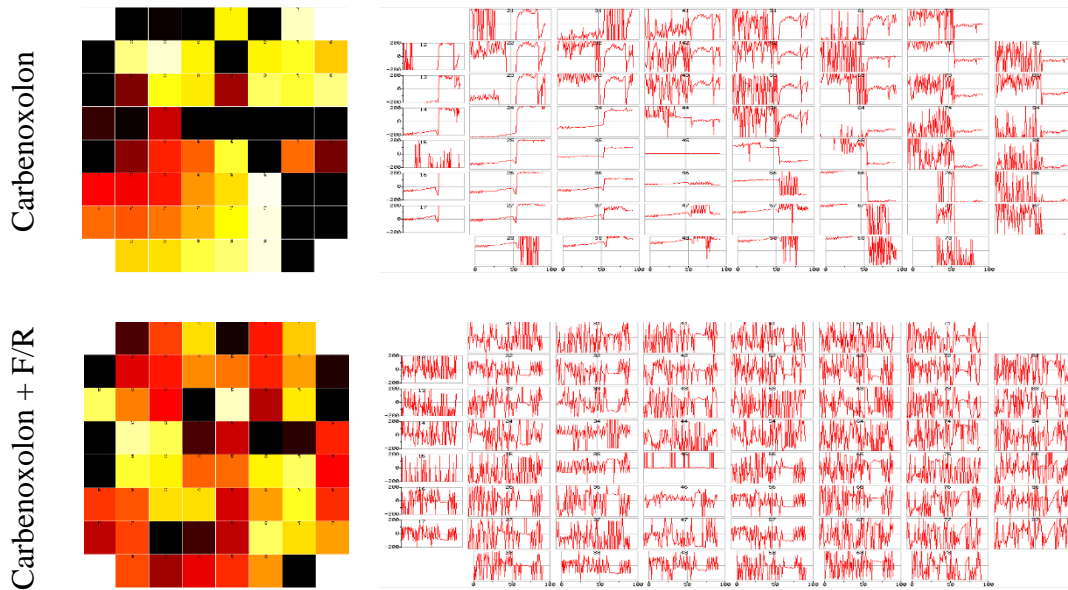


Abbildung 13: Analyse der Erregungsausbreitung der HL-1-Kardiomyozyten bei Störung der Cadherin-Haftung mit der Mikro-Elektroden-Anordnung. Für jede Kondition wurde die Messung für 90sek aufgenommen. **A** Die farbkodierten Darstellungen links sind Ausschnitte zu einem bestimmten Zeitpunkt relativ zur Referenzelektrode, die Darstellungen rechts geben den zeitlichen Versatz der Erregung auf der jeweiligen Elektrode gegenüber der Referenzelektrode als Verlauf über die 90sek an. **B** Dargestellt ist die Standardabweichung der Schlagintervalle (Standard deviation of NN-intervals) als Vielfaches der Kontrolle (K). Dafür wurden für jede Kondition die Daten von drei Elektroden ausgewertet. **C** Gezeigt ist die Weiterleitungsgeschwindigkeit der Erregung über den Zellrasen. Die

Ergebnisse

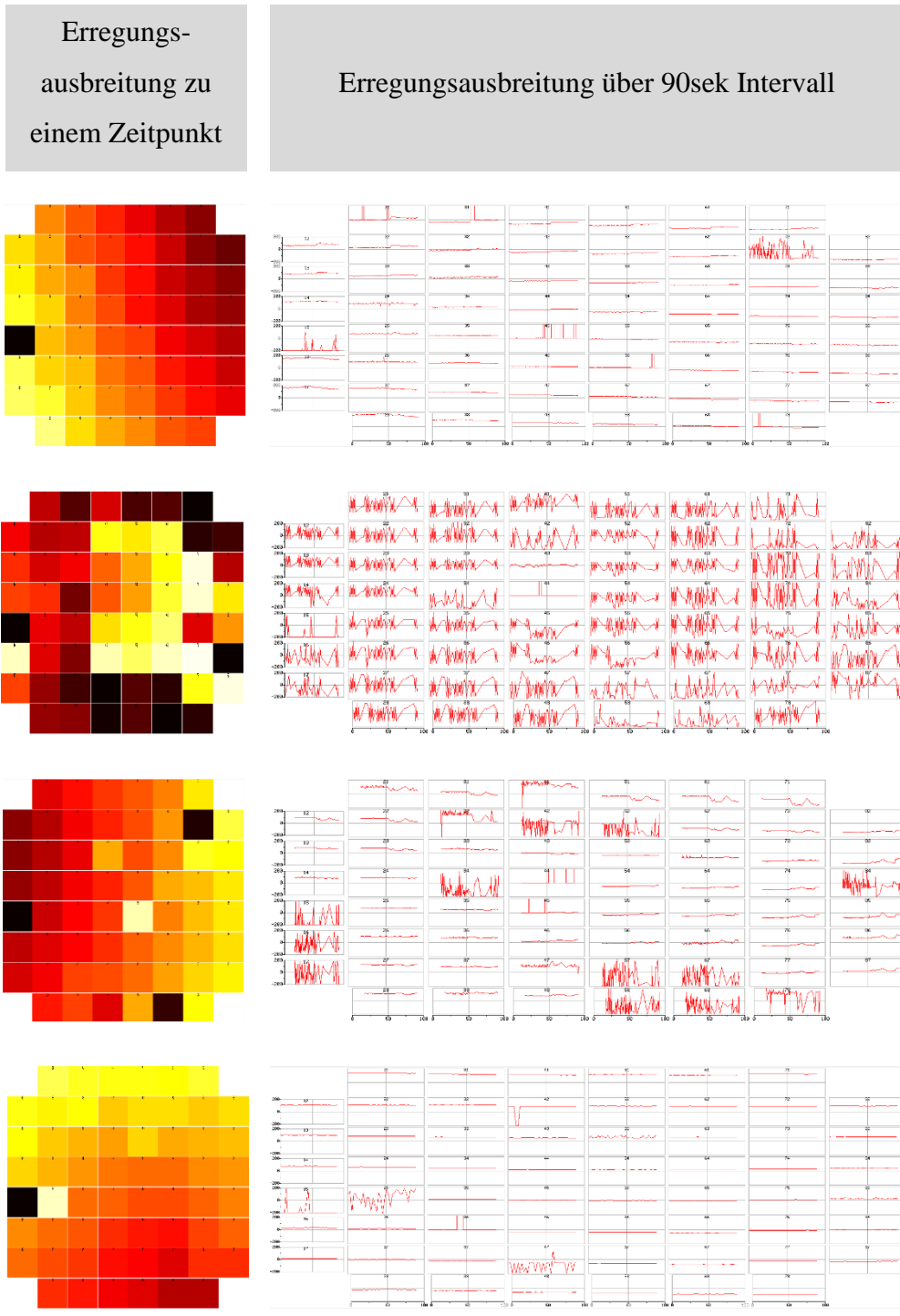
HL-1-Zellrasen wurden neben der Kontrolle mit Trp 400 μ M für 24h, Trp 400 μ M für 24h mit F/R 5 μ M/10 μ M für 3min und Trp 400 μ M für 24h mit Dsg2-LP 20 μ M für 24h behandelt. (K n=8, Trp n=8, Trp + F/R n=8, Trp + Dsg2-LP n=4) (Modifiziert nach Schinner, Erber et al., 2018).

Um spezifisch die Auswirkungen eines Funktionsverlusts desmosomaler Proteine auf die Elektrophysiologie im Herzgewebe zu untersuchen, wurden die Mikro-Elektroden-Untersuchungen an HL-1-Kardiomyozyten durchgeführt, bei denen eine Verminderung der Expression von Dsg2 und Pg induziert wurde. Dies wurde, wie beschrieben, mittels Transfektion mit siRNA für Dsg2 und Pg erreicht. Zellen, die im Sinne einer Kontrolle mit n.t.-siRNA transfiziert wurden, zeigten eine gleichmäßige Erregungsausbreitung über den Zellrasen. Der Verlauf zeigte über 90sek bei fast allen Elektroden einen gleichbleibenden Zeitabstand der gemessenen Erregungen zur Referenzelektrode (im abgebildeten Beispiel Elektrode 45). Dies war sowohl an einzelnen Zeitpunkten im Vergleich zur Referenzelektrode als auch über das 90sek Intervall hinweg nachweisbar. Bei jeder Erregung der HL-1-Kardiomyozyten hatte sich also der elektrische Impuls gleichbleibend von links nach rechts ausgebreitet. Dagegen führte jeweils eine Depletion von Dsg2 und Pg zu einer deutlich gestörten Erregungsausbreitung (siehe Abbildung 14 A).

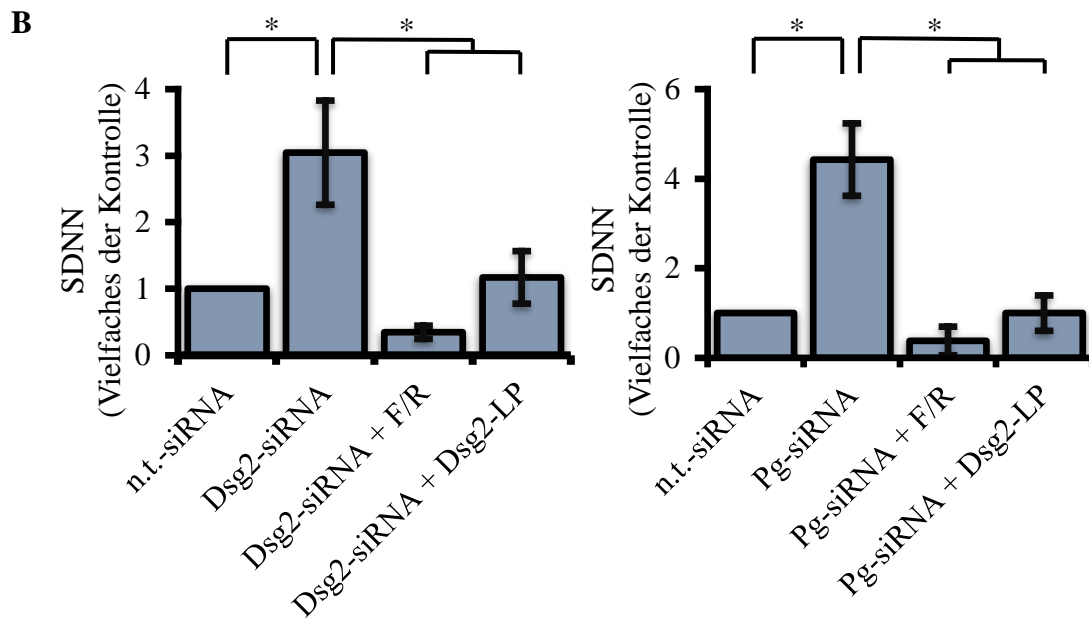
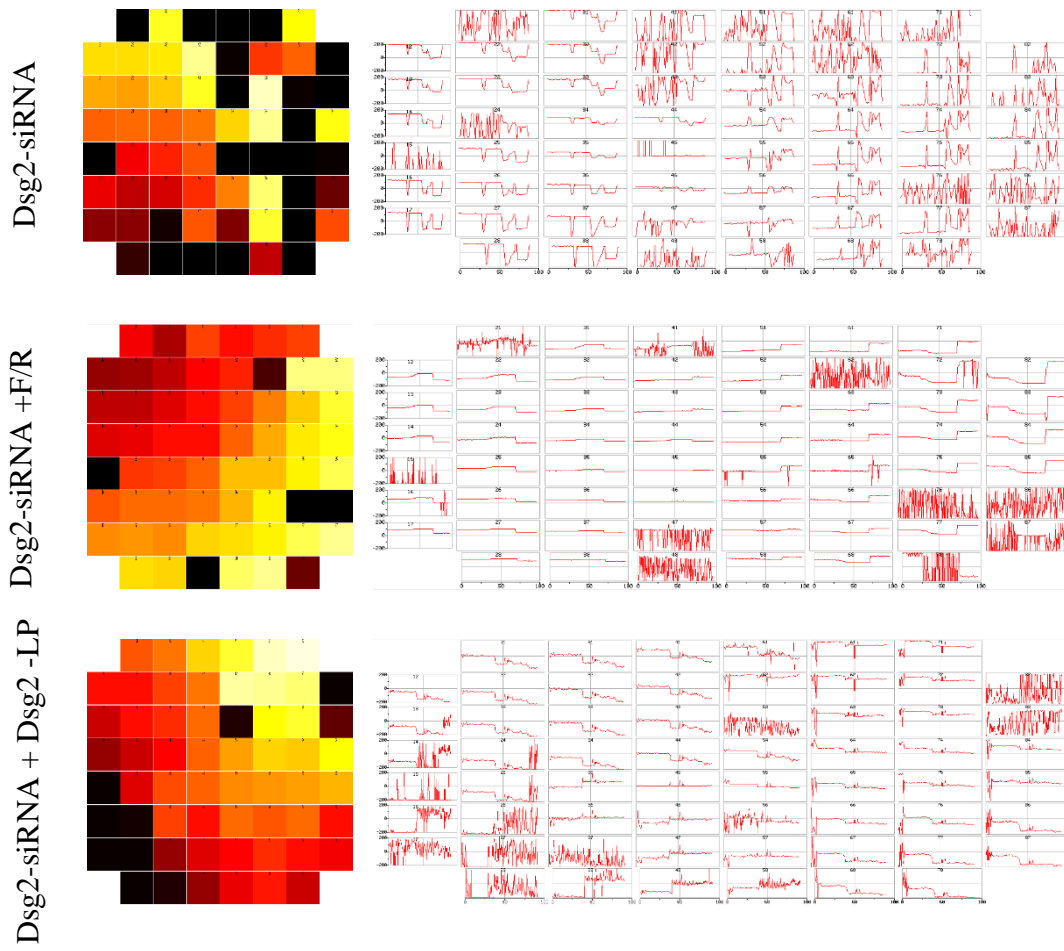
In beiden Fällen verbesserte eine Inkubation entweder mit F/R oder mit Dsg2-LP die gestörte Erregungsausbreitung. Dabei schienen F/R und Dsg2-LP bei mit Pg-siRNA transfizierten Zellen einen größeren protektiven Effekt auf die Erregungsweiterleitung zu haben, als bei Zellen, die mit Dsg2-siRNA transfiziert wurden. Dort waren immer noch leichte Unregelmäßigkeiten in der Erregungsausbreitung zu erkennen (siehe Abbildung 14 A).

Ergebnisse

A



Ergebnisse



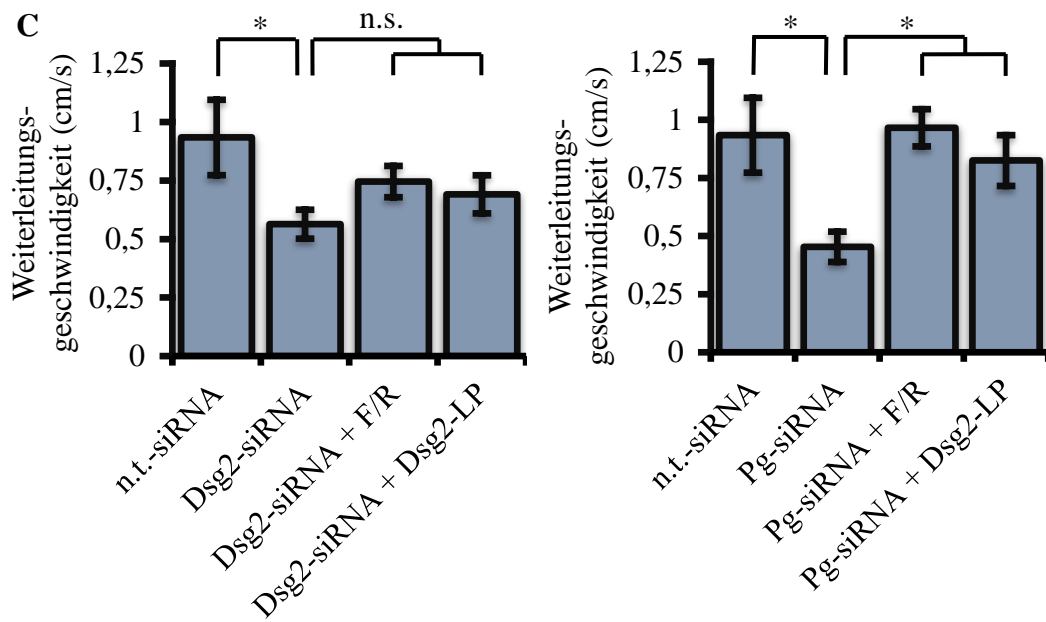


Abbildung 14: **A** Analyse der Elektrophysiologie der HL-1-Kardiomyozyten bei einem Knockdown von Dsg2 und Pg mit der Mikro-Elektroden-Anordnung. Für jede Kondition wurde die Messung 90sek aufgenommen. Die farbkodierten Darstellungen links sind Ausschnitte zu einem bestimmten Zeitpunkt relativ zur Referenzelektrode, die Darstellungen rechts geben den zeitlichen Versatz der Erregung auf der jeweiligen Elektrode gegenüber der Referenzelektrode als Verlauf über die 90sek an. **B** Dargestellt ist die Standardabweichung der Schlagintervalle (Standard deviation of NN-intervals) als Faktor der Kontrolle (n.t.-siRNA). Dafür wurden in jeder Kondition die Daten von drei Elektroden ausgewertet. **C** Dargestellt ist die Weiterleitungsgeschwindigkeit der Erregung über den Zellrasen. Die HL-1-Zellrasen wurden als Kontrolle mit n.t.-siRNA transfiziert, daneben mit Dsg2-siRNA und Pg-siRNA. Mit Dsg2-siRNA und Pg-siRNA transfizierte Zellen wurden daneben zusätzlich entweder für 3min mit F/R 5 μ M/10 μ M oder 24h mit Dsg2-LP 20 μ M behandelt. (n.t.-siRNA n=10, Dsg2-siRNA n=10, Dsg2-siRNA + F/R n=7, Dsg2-siRNA + Dsg2-LP n=3, Pg-siRNA n=4, Pg-siRNA + F/R n=3, Pg-siRNA + Dsg2-LP n=4) (Modifiziert nach Schinner, Erber et al., 2018).

Ergebnisse

Die SDNN erhöhte sich bei einem Verlust an Dsg2 und Pg signifikant auf das $3,0\pm 0,8$ -fache bzw. $4,4\pm 0,8$ -fache der Kontrolle (mit n.t.-siRNA transfizierte Zellen). Bei Verlust von Dsg2 konnte durch den Einsatz von F/R dieser Wert auf das $0,35\pm 0,1$ -fache, durch den Einsatz von Dsg2-LP auf das $1,2\pm 0,7$ -fache der Kontrolle reduziert werden. Bei Verlust von Pg konnte durch den Einsatz von F/R dieser Wert auf das $0,4\pm 0,1$ -fache, durch den Einsatz von Dsg2-LP auf das $1,0\pm 0,4$ -fache der Kontrolle reduziert werden (Siehe Abbildung 14 B).

Eine Depletion der beiden desmosomalen Proteine reduzierte zusätzlich die Geschwindigkeit der Erregungsausbreitung bzw. die Weiterleitungsgeschwindigkeit jeweils signifikant (n.t.-siRNA: $0,93\pm 0,16$ cm/s, Dsg2-siRNA: $0,56\pm 0,06$ cm/s, Pg-siRNA: $0,45\pm 0,07$ cm/s). Nur bei einem Verlust an Pg waren F/R und Dsg2-LP in der Lage, die dadurch erniedrigte Geschwindigkeit der Erregungsausbreitung signifikant auf Kontrollniveau zu verbessern (Pg-siRNA+F/R: $0,96\pm 0,1$ cm/s, Pg-siRNA+Dsg2-LP: $0,82\pm 0,1$ cm/s). Bei einem Verlust an Dsg2 konnten beide Stoffe diese nur leicht, aber nicht signifikant verbessern (Dsg2-siRNA+F/R: $0,75\pm 0,06$ cm/s, Dsg2-siRNA+Dsg2-LP: $0,69\pm 0,08$ cm/s) (siehe Abbildung 14 C).

4.5 Rolle der PKC in der Funktionsweise des Dsg2-LP

Da PKC eine wichtige Rolle in der Regulation des Auf- und Abbaus der Desmosomen sowie der Regulation der GJs zugeschrieben wird (Pasdar et al., 1995), wurde der Frage nachgegangen, ob PKC wichtig für die Wirkung des Dsg2-LP sein könnte.

4.5.1 Rolle der PKC für die geregelte Erregungweiterleitung bei Depletion von Pg

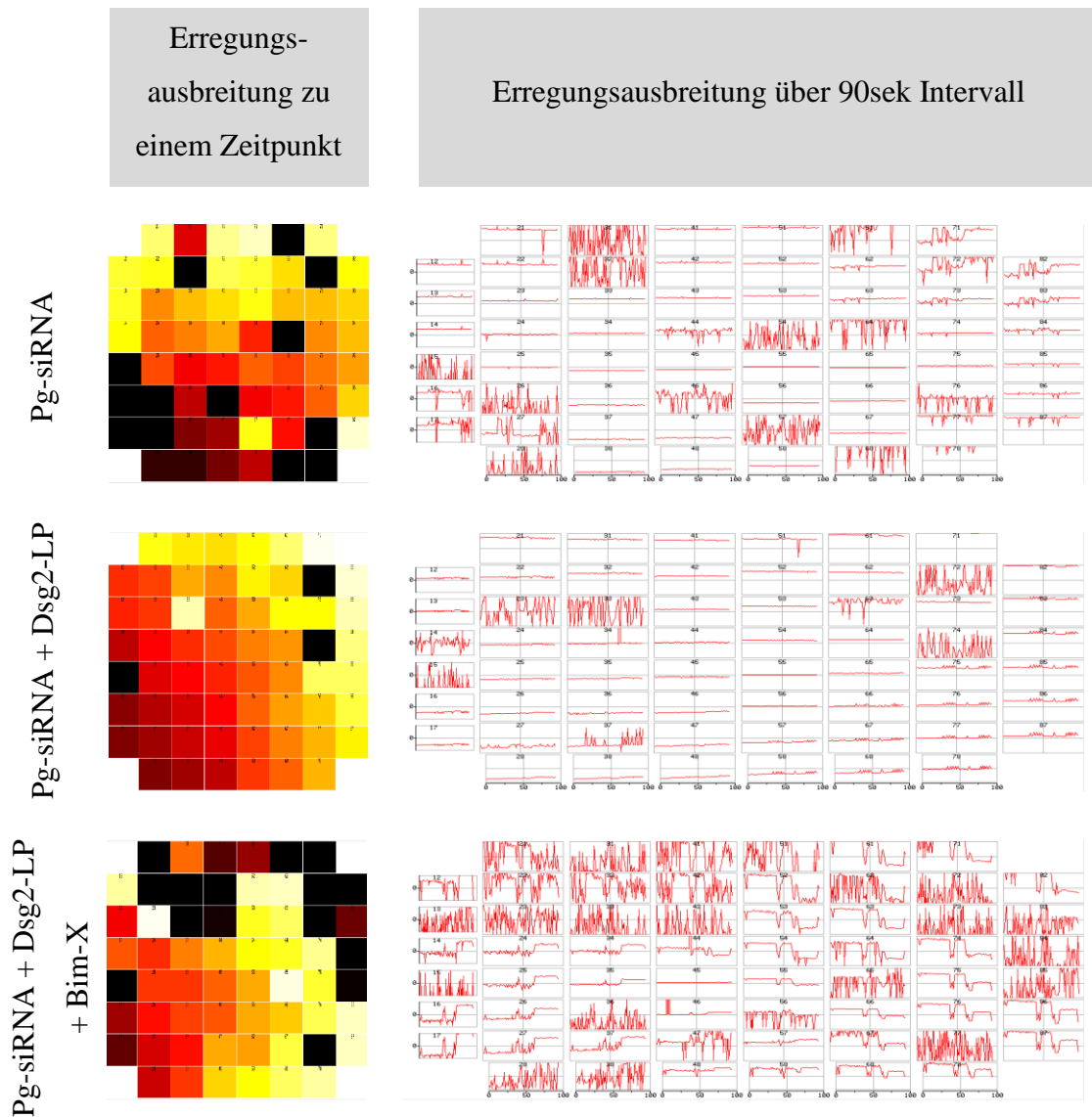
Um zu sehen, ob der protektive Effekt des Dsg2-LP auf die Erregungweiterleitung bei Depletion von Pg über PKC vermittelt wird, wurden die mit Pg-siRNA transfizierten HL-1-Kardiomyozyten neben Dsg2-LP zusätzlich mit dem PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid X (Bim-X) inkubiert. Interessanterweise machte eine zusätzliche Inkubation mit Bim-X den protektiven Effekt des Dsg2-LP auf die gestörte Erregungweiterleitung nahezu vollständig rückgängig. Sowohl in der farbkodierten als auch in der Verlaufsdarstellung war eine deutliche Unregelmäßigkeit in der

Ergebnisse

Erregungsausbreitung zu sehen (siehe Abbildung 15 A). Die SDNN, die sich unter Dsg2-LP bei Pg-defizienten Zellen signifikant reduzierte, erhöhte sich durch Gabe von Bim-X leicht, jedoch nicht signifikant (Dsg2-siRNA+Dsg2-LP+Bim-X: $2,1 \pm 0,6$ -fach der Kontrolle) (siehe Abbildung 15 B).

Jedoch reduzierte sich die Weiterleitungsgeschwindigkeit durch BIM-X signifikant im Vergleich zu einer alleinigen Behandlung mit Dsg2-LP bei Pg-defizienten Zellen auf $0,46 \pm 0,07$ cm/s.

A



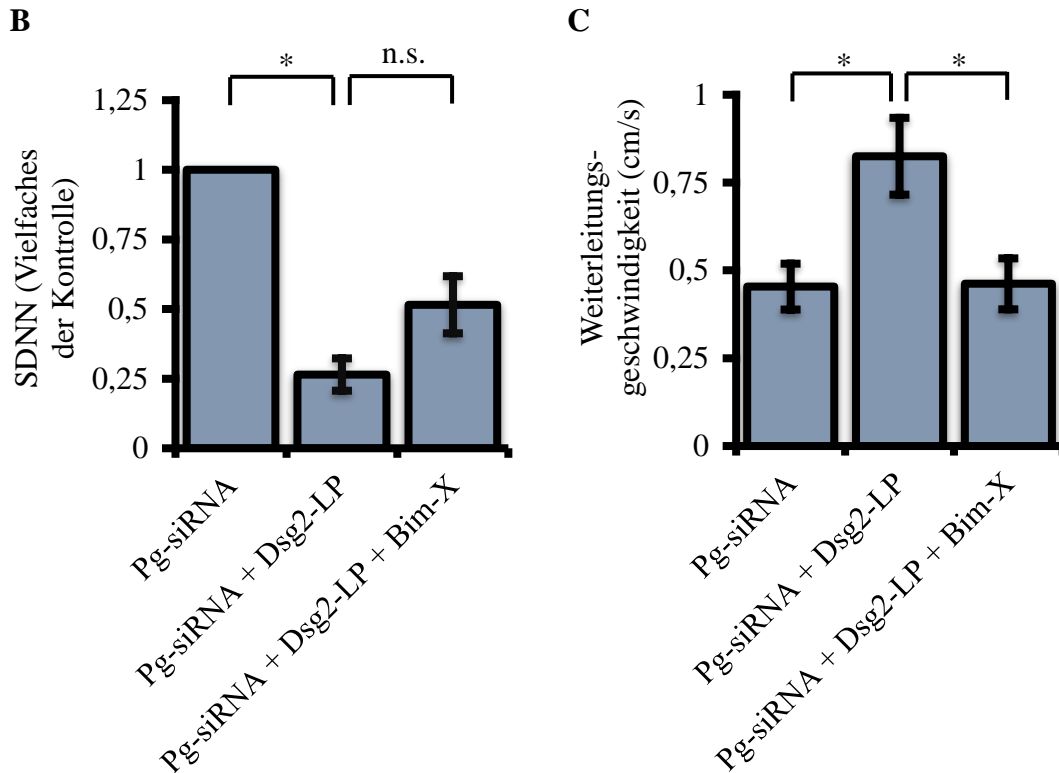
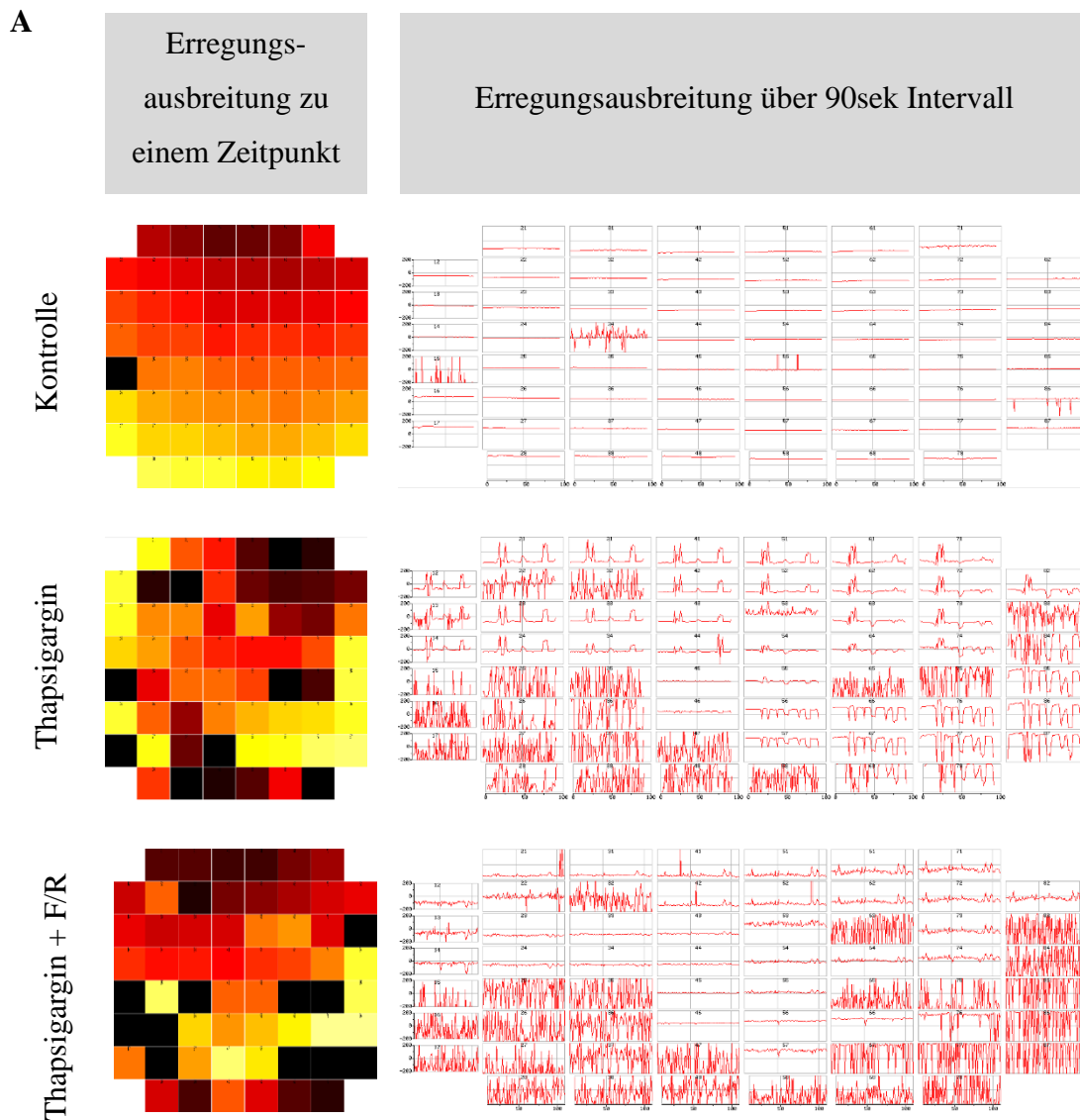


Abbildung 15: Analyse der Erregungsausbreitung der HL-1-Kardiomyozyten bei einer Depletion von Pg mit der Mikro-Elektroden-Anordnung. Für jede Kondition wurde die Messung über 90sek aufgenommen. **A** Die farbkodierten Darstellungen links sind Ausschnitte zu einem bestimmten Zeitpunkt relativ zur Referenzelektrode, die Darstellungen rechts geben den zeitlichen Versatz der Erregung auf der jeweiligen Elektrode gegenüber der Referenzelektrode als Verlauf über die 90sek an. **B** Dargestellt ist die SDNN als Faktor der Kontrolle (n.t.-siRNA). **C** Gezeigt ist die Weiterleitungsgeschwindigkeit der Erregung über den Zellrasen. Die HL-1-Zellrasen wurden mit Pg-siRNA transfiziert. Die Zellen wurden zusätzlich entweder für 24h mit Dsg2-LP 20µM oder 24h mit Dsg2-LP 20µM und Bim-X 1µM behandelt. (Pg-siRNA n=4, Pg-siRNA + Dsg2-LP n=4, Pg-siRNA + Dsg2-LP + Bim-X n=4) (Modifiziert nach Schinner, Erber et al., 2018).

Ergebnisse

Eine Inkubation des HL-1-Zellrasens mit dem SERCA2-Inhibitor Thapsigargin für 24h führte zu einer deutlichen Unregelmäßigkeit in der Erregungsausbreitung im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dieser Effekt ließ sich durch F/R nicht eindeutig rückgängig machen (siehe Abbildung 16 A). Thapsigargin erhöhte signifikant die SDNN auf das $34,7 \pm 7,2$ -fache der Kontrolle und reduzierte signifikant die Geschwindigkeit der Erregungsausbreitung auf $0,37 \pm 0,6$ cm (siehe Abbildung 16 B, C). Eine zusätzliche Inkubation mit F/R konnte die SDNN wieder signifikant reduzieren (Thapsigargin+F/R: $19,9 \pm 7,4$ -fache der Kontrolle), während es auf die Geschwindigkeit der Erregungsausbreitung keine Wirkung zeigte ($0,32 \pm 0,05$ cm/s).



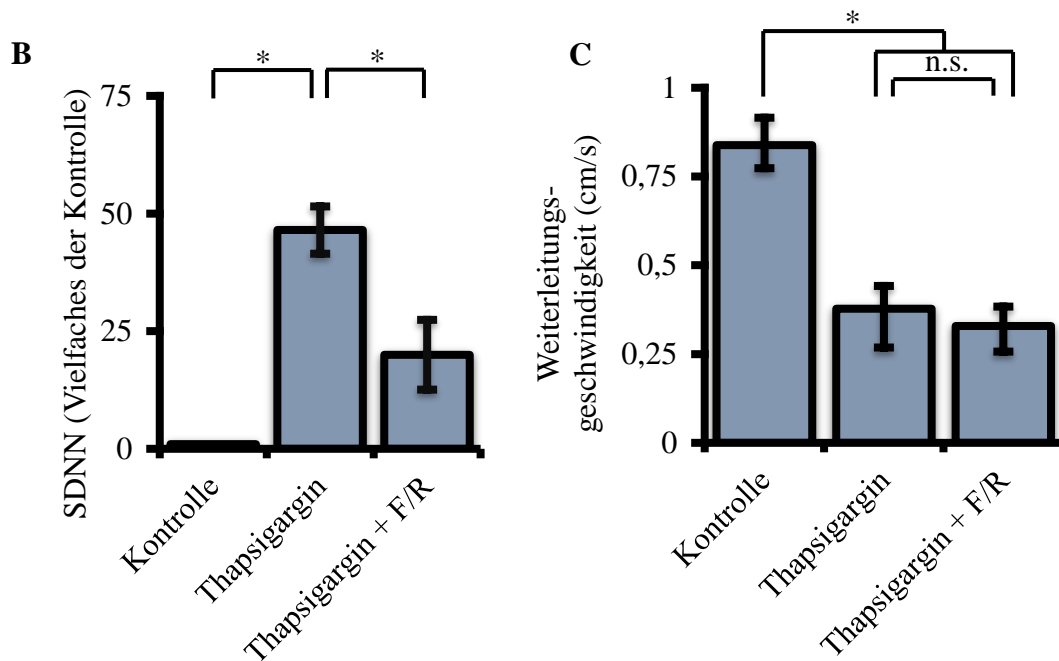


Abbildung 16: Analyse der Erregungsausbreitung der HL-1-Kardiomyozyten mit der Mikro-Elektroden-Anordnung. Für jede Kondition wurde die Messung über 90sek aufgenommen. **A** Die farbkodierten Darstellungen links sind Ausschnitte zu einem bestimmten Zeitpunkt relativ zur Referenzelektrode, die Darstellungen rechts geben den zeitlichen Versatz der Erregung auf der jeweiligen Elektrode gegenüber der Referenzelektrode als Verlauf über die 90sek an. **B** Dargestellt ist die SDNN als Vielfaches der Kontrolle (n.t.-siRNA). **C** Gezeigt ist die Weiterleitungsgeschwindigkeit der Erregung über den Zellrasen. Die HL-1-Zellrasen wurden neben der Kontrolle entweder mit Thapsigargin 100 μ M für 24h oder mit Thapsigargin 100 μ M für 24h zusammen mit F/R 5 μ M/10 μ M für die letzten 30min behandelt. (Kontrolle n=3, Thapsigargin n=3, Thapsigargin + F/R n=3)

4.5.2 Beeinflussung der PKC-abhängigen Cx43-Phosphorylierung durch Dsg2-LP bei desmosomalem Haftungsverlust

Nun war es von Interesse, ob diese funktionellen Effekte von PKC unter anderem auf die in der Literatur beschriebene Abhängigkeit der GJ-Funktion von der Cx43-Phosphorylierung durch PKC zurückgeführt werden können. Deshalb wurde mit Hilfe der Western Blot-Analyse das Vorkommen von Cx43, das am Serin 368 phosphoryliert ist, quantitativ im Verhältnis zum gesamten Cx43 nachgewiesen. Wie oben beschrieben, ist der Serinrest 368 die wichtigste Stelle am Cx43, die von PKCε phosphoryliert wird. Die direkte Aktivierung durch PKA wirkte als Positivkontrolle.

Zunächst wurden die Auswirkungen einer Inkubation der HL-1-Kardiomyozyten mit Dsg2-LP untersucht. Es zeigte sich, dass das Dsg2-LP in der Konzentration, in der es seine protektiven Wirkungen auf Zelladhäsion und Erregungsweiterleitung ausübte, eine signifikante Erhöhung des phosphorylierten Cx43 bewirkte (Dsg2-LP: 130,3±9,8% der Kontrolle). Der PKC-Inhibitor Bim-X reduzierte die Menge an phosphoryliertem Cx43 (Bim-X: 42,2±4,0% der Kontrolle) und machte auch die erhöhte Cx43-Phosphorylierung unter Dsg2-LP rückgängig (Dsg2-LP+Bim-X: 60,8±9,5% der Kontrolle) (siehe Abbildung 17 A).

Neben Dsg2-LP erhöhte auch ein Anstieg von cAMP durch F/R den Anteil des an Serin 368 phosphorylierten Cx43 (F/R: 149,0±7,8% der Kontrolle). Eine Inkubation der HL-1-Kardiomyozyten mit Trp reduzierte phosphoryliertes Cx43 leicht auf 68,9±9,3% der Kontrolle, aber nicht signifikant. Dagegen erhöhte eine Koinkubation von Trp mit F/R den Anteil am gesamten Cx43 signifikant gegenüber mit Trp behandelten Zellen auf 155,5±20,9% der Kontrolle (siehe Abbildung 17 B). Auch der SERCA-Inhibitor Thapsigargin reduzierte im Vergleich zur Kontrolle den Anteil des phosphorylierten Cx43 am gesamten Cx43 signifikant auf 37,8±15,0% der Kontrolle (siehe Abbildung 17 C).

Ergebnisse

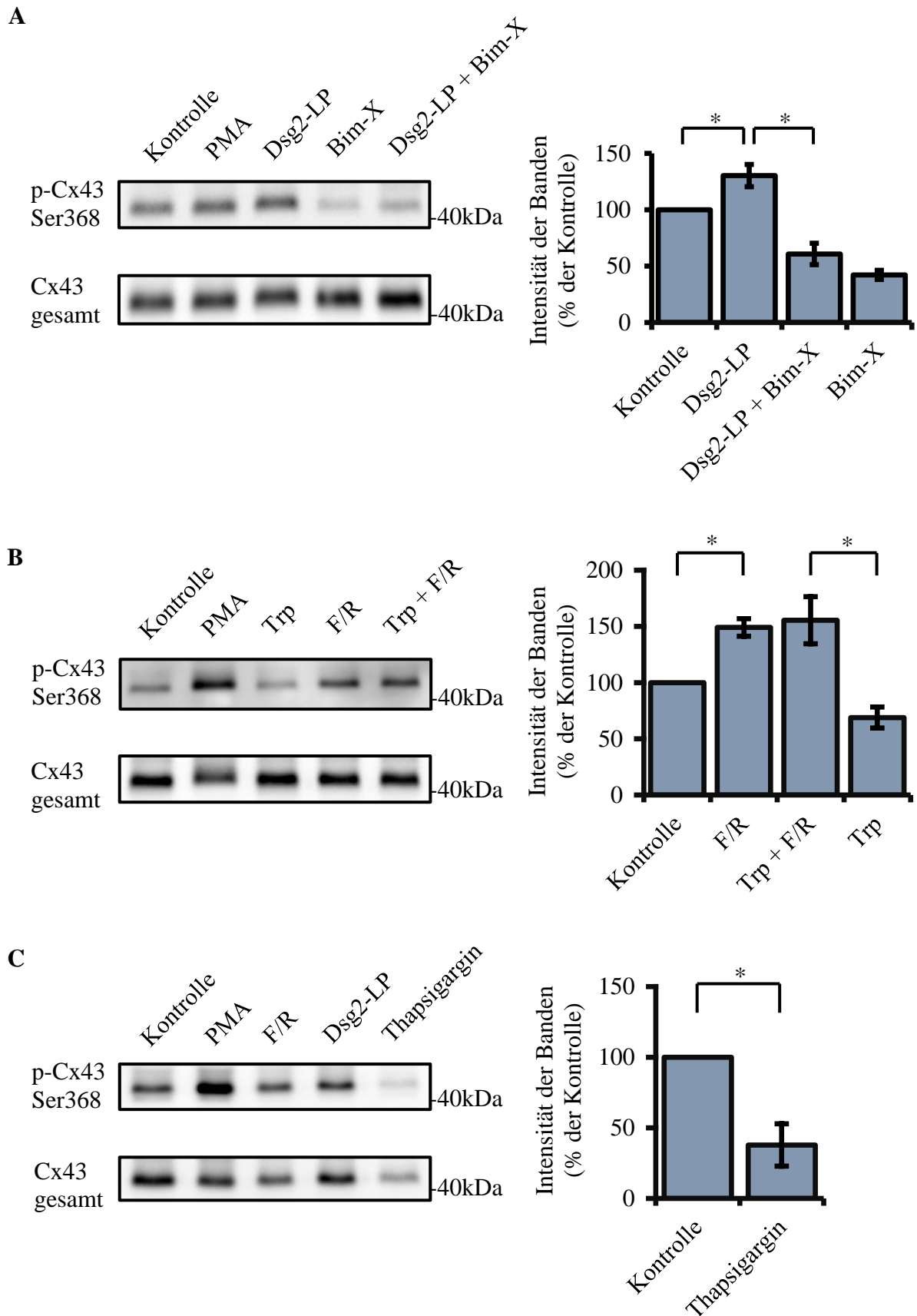


Abbildung 17: Western Blot-Analyse aus HL-1-Lysaten. Als Erstantikörper wurden Anti-p-Cx43 Ser368 rb und Anti-Cx43 rb verwendet. Das in

Ergebnisse

Kardiomyozyten vorkommende Protein α -Tubulin wurde als Ladekontrolle benutzt. Rechts neben den Western Blots ist die quantitative Auswertung der Intensität der Banden im Verhältnis zur Kontrolle dargestellt. Die Zellen wurden neben der Kontrolle **A** mit Dsg2-LP 20 μ M für 24h, Dsg2-LP 20 μ M für 24h mit Bim-X 1 μ M für 24h und Bim-X 1 μ M für 24h, sowie **B** F/R 5 μ M/10 μ M für 30min, Trp 400 μ M für 24h mit F/R 5 μ M/10 μ M für 30 min und Trp 400 μ M für 24h, als auch **C** Thapsigargin 500nM für 30min behandelt. (A: Kontrolle n=10, Dsg2-LP n=7, Bim-X n=4, Dsg2-LP + Bim-X n=4; B: Kontrolle n=7, F/R n=6, Trp + F/R n=5, Trp n=5; C: Kontrolle n=3, Thapsigargin n=3)

In Studien wurde gezeigt, dass Cx43 während seines Lebenszyklus und des Aufenthaltes in verschiedenen Zellkompartimenten an unterschiedlichen Stellen phosphoryliert wird (Musil et al., 1990; Smyth and Shaw, 2013; Solan and Lampe, 2007). Dabei wird unphosphoryliertes Cx43 mit P0, an Ser364 oder Ser365 phosphoryliertes als P1 und an Ser325, Ser328 oder Ser330 phosphoryliertes als P2 bezeichnet (Musil et al., 1990). Western Blot-Untersuchungen zeigten jedoch, dass weder bei Störung des Tryptophan-Austauschs noch durch F/R oder Thapsigargin Änderungen im Vorkommen der einzelnen Isoformen nachgewiesen werden konnten (siehe Abbildung 18).

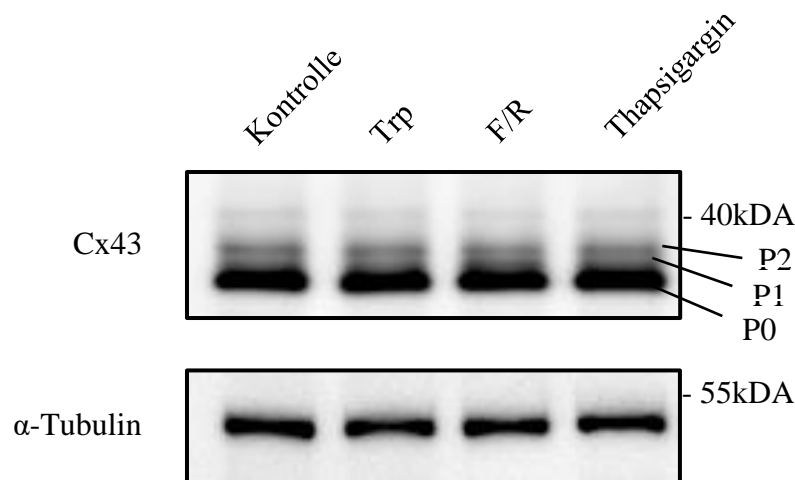


Abbildung 18: Western Blot aus HL-1-Lysaten. Das ubiquitär in Kardiomyozyten vorkommende Protein α -Tubulin wurde als Ladekontrolle benutzt. Im oberen Bild sind die drei Phospho-Isoformen von Cx43 zu sehen (P0, P1 und P2). Die Zellen wurden neben der Kontrolle mit Trp 400 μ M für 24h, F/R 5 μ M/10 μ M für 30min und Thapsigargin 100 μ M für 24h behandelt. (K n=4, Trp n=4, F/R n=4, Thapsigargin n=4)

4.6 Assoziation von Cx43, Dsg2 und β 1-AR

Mittels Immunpräzipitation sollte geklärt werden, ob die Komponenten der Desmosomen miteinander interagieren.

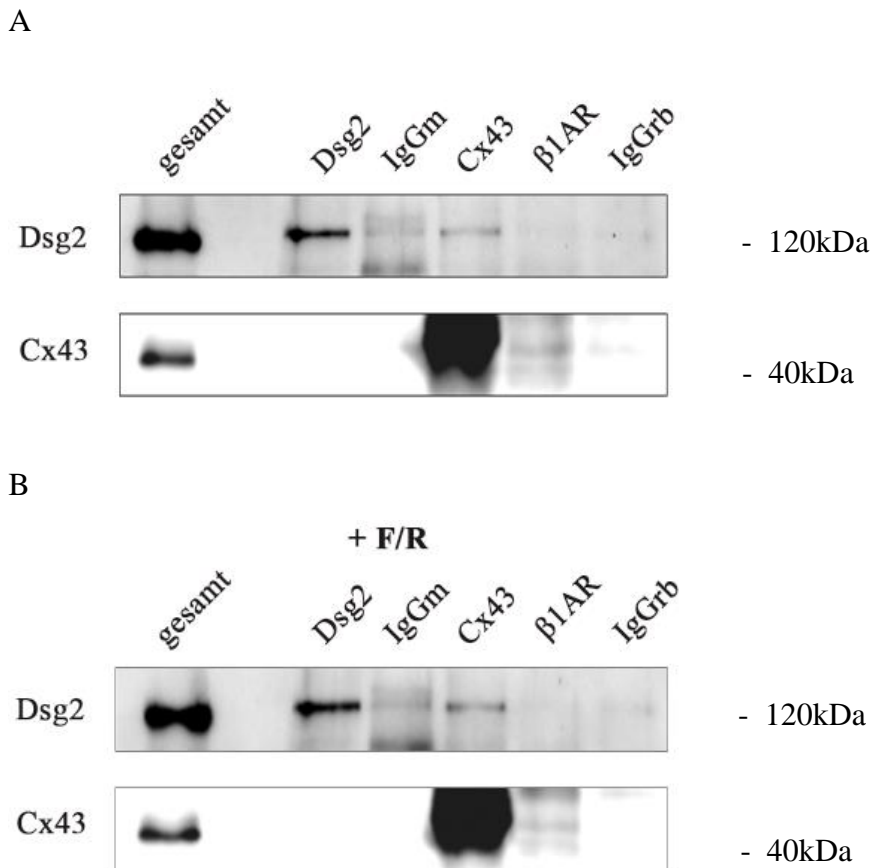


Abbildung 19: **A** Immunpräzipitation der Proteine Dsg2, Cx43 und β 1AR unter Normalbedingungen. Die Bande auf Höhe von Dsg2 in der Säule Cx43 sowie die Bande auf Höhe Cx43 in der Säule β 1AR belegen eine Assoziation von Cx43 und Dsg2 sowie β 1AR und Cx43. (Modifiziert nach Schinner, Erber et al., 2018). **B** Immunpräzipitation der Proteine Dsg2, Cx43 und β 1AR unter Stimulation mit F/R $5\mu\text{M}/10\mu\text{M}$ (F/R). Hierunter keine signifikante Veränderung. (n=4)

Zunächst zeigte sich in der Western Blot-Analyse nach Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Dsg2, Cx43 und β 1AR, dass eine Assoziation der Proteine Dsg2 und Cx43 vorhanden war (siehe Abbildung 19 A). Daneben konnte eine Interaktion von Cx43 mit β 1AR festgestellt werden. Eine direkte Verbindung von Dsg2 und β 1AR konnte nicht nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde untersucht, ob ein durch die Mediatoren Forskolin und Rolipram (F/R) erhöhter Spiegel von cAMP zu einer veränderten Assoziation zwischen den drei Proteinen führt. Dies war allerdings nicht erkennbar (siehe Abbildung 19 B). Ein Nachweis des β 1AR in der Western Blot-Analyse war nicht möglich, weil die schweren Ketten der zur Immunpräzipitation verwendeten Antikörper auf Höhe des β 1AR in der Elektrophorese laufen.

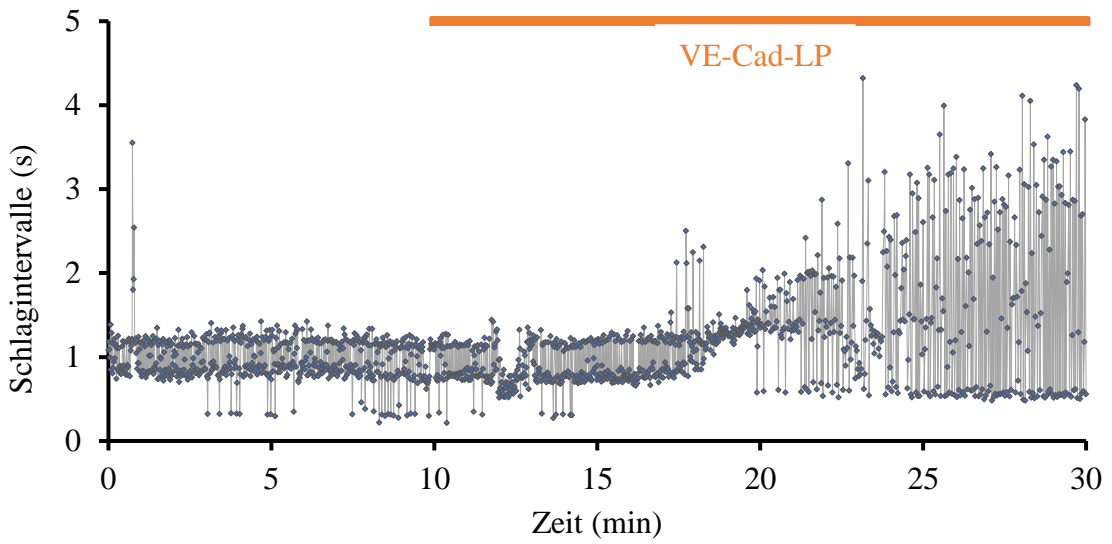
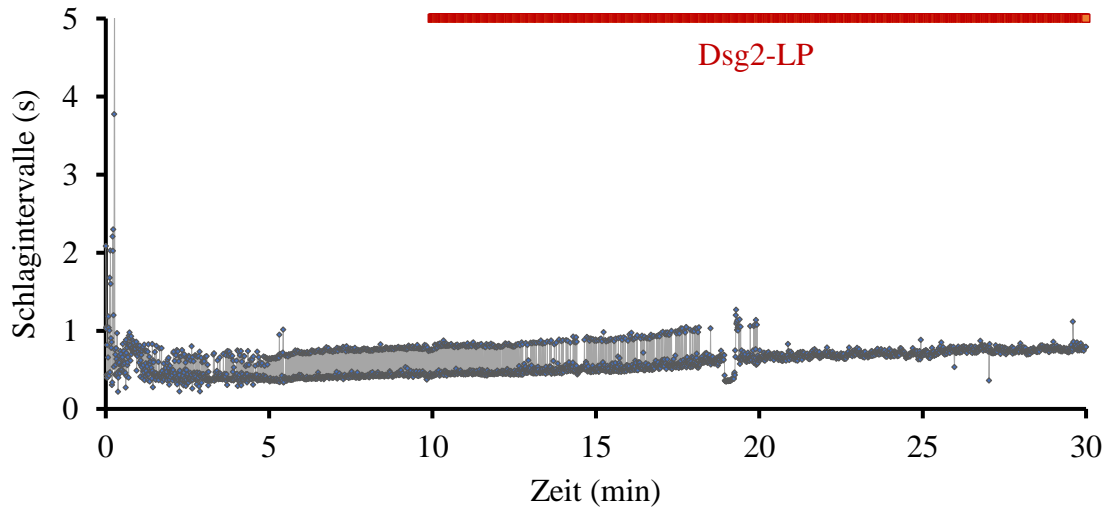
4.7 Verbesserung der Erregungsweiterleitung durch Dsg2-LP im ex-vivo Pg-Knockout-Mausmodell

Um die Wirkung von Dsg2-LP in einem Translationsansatz zu untersuchen, wurden ex-vivo-Experimente an Langendorff-perfundierten Mäuseherzen durchgeführt. Das verwendete Mausmodell ist durch eine spezielle Deletion im Pg-Gen der Kardiomyozyten charakterisiert (Schinner et al., 2017). Wie oben beschrieben, zählt eine Mutation im Gen für Pg zu den bei Menschen mit AC vorkommenden Mutationen.

Im Versuch wurden die Herzen jeweils für 10min mit physiologischem Langendorff-Puffer perfundiert und anschließend für weitere 20min mit Langendorff-Puffer, der entweder mit 20 μ M Dsg2-LP oder mit 20 μ M VE-Cad-LP als Kontrolle versetzt wurde. VE-Cad-LP ist in der Lage, VE-Cadherin-Moleküle quervernetzen, nicht jedoch Desmogleine (Heupel et al., 2009a; Heupel et al., 2009b). In den ausgewählten repräsentativen Beispielen ist während der 10min Basismessung eine deutliche Schwankung der Schlagintervalle der Pg-Knockout-Herzen zu erkennen (siehe Abbildung 20 A). Die Pg-Knockout-Herzen schlagen unter Kontrollbedingungen arrhythmisch. Nach etwa 8min Perfusion mit Dsg2-LP ist eine offensichtliche Abnahme in der Streuung der Schlagintervalle zu sehen. Bei Perfusion mit dem VE-Cad-LP ließ sich dagegen keine Abnahme in der Streuung der Schlagintervalle beobachten. Im Gegenteil war sogar eine Zunahme in der Streuung feststellbar. Um nun eine objektive Aussage über den Einfluss der beiden Peptide auf die Herzfrequenz treffen zu können, wurde die SDNN verwendet. Darin gingen die Werte aus allen Messungen ein, die den Qualitätskriterien entsprachen. Es konnte gezeigt werden, dass die SDNN nach Perfusion mit Dsg2-LP signifikant niedriger war als vor Perfusion mit Dsg2-LP und die Arrhythmie signifikant abnimmt (siehe **B**). Dagegen führte eine Perfusion mit VE-Cad-LP zu keiner signifikanten Änderung der SDNN bzw. der Arrhythmie.

Ergebnisse

A



B

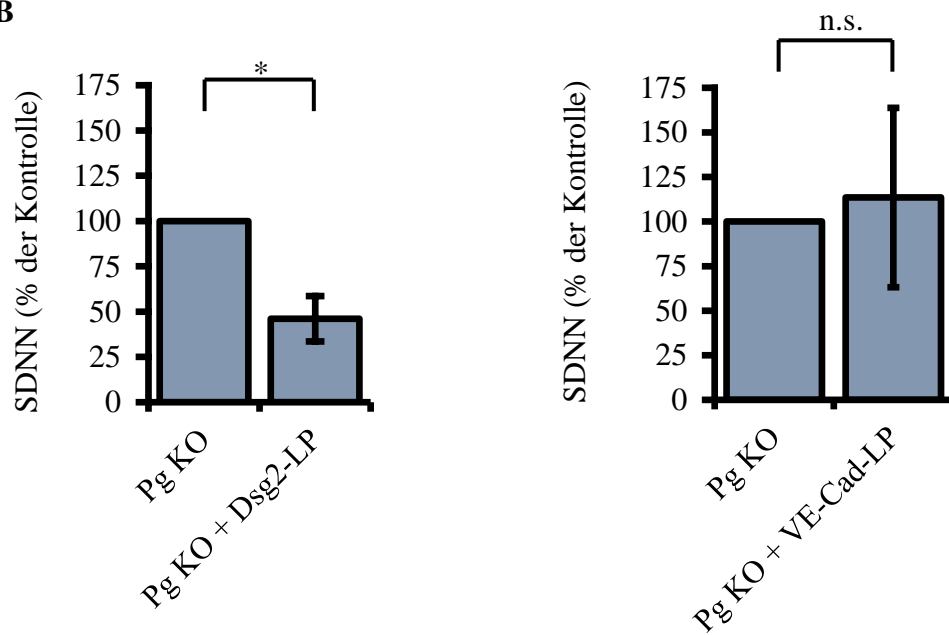


Abbildung 20: Ex-vivo-Analyse des Herzrhythmus mithilfe des Langendorff-Ansatzes. Die extrahierten Herzen von Wildtyp- und herzspezifischen Pg-Knockout-Mäusen wurden am Langendorff-Apparat befestigt und mit physiologischem Puffer perfundiert. Die Messung wurde für 30min aufgezeichnet. Diese teilte sich auf in eine 10min Basismessung und anschließend eine 20min Messung unter Zugabe von Dsg2-LP oder des VE-Cad-LP. **A** Die Dauer jedes Schlagintervalls wurde über die Zeit aufgetragen (dunkelgraue Punkte). Diese Punkte wurden durch hellgraue Linien miteinander verbunden, um die Streuung besser sichtbar zu machen. Die rote und die orange Linie auf Höhe von „5s“ entsprechen jeweils dem Zeitpunkt der Perfusion mit Dsg2-LP (rot) bzw. VE-Cad-LP (orange). **B** Der Herzrhythmus wurde mit der SDNN, der Standardabweichung der Schlagintervalle, ausgewertet. Dabei wurde die SDNN unter Zugabe von Dsg2-LP bzw. VE-Cad-LP in Verhältnis zur Messung ohne Zugabe der Peptide gesetzt. Für die SDNN der Kontrollmessung (Pg KO) wurden die Daten aus den ersten 10min der Messungen verwendet (gesamter Versuch: 0-10min), für die SDNN unter Perfusion mit Dsg2-LP bzw. VE-Cad-LP die Daten aus den letzten 10min der Messungen (gesamter Versuch: 20-30min). Dadurch waren zum einen jeweils Werte aus 10min Messung die Grundlage für die SDNN. Zum anderen zeigte das Dsg2-LP bereits nach etwa 10min Perfusion seine volle Wirkung. Konzentrationen: Dsg2-LP 20 μ M, VE-Cad-LP 20 μ M (Pg KO jeweils n=5, Pg KO + Dsg2-LP n=5, Pg KO + VE-Cad-LP n=5)

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zunächst konnte mithilfe der Immunfärbung eine Aggregation von irregulären desmosomalen Dsg2-Partikeln bei Störung der Cadherin-Haftung durch Tryptophan im Vergleich zur normalerweise gleichmäßig punktierten Lokalisation entlang der Membran sichtbar gemacht werden. Daneben zeigte sich ein Verlust des GJ-Moleküls Cx43 an der Membran. Diese Veränderungen in der Lokalisation der beiden Proteine konnten sowohl mit dem Desmoglein-vernetzenden Peptid (Dsg2-LP) als auch durch eine cAMP-Erhöhung rückgängig gemacht werden. Mithilfe der Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass die Proteine Cx43, Dsg2 und auch der β 1-adrenerge Rezeptor, der physiologisch den cAMP-Spiegel in den Kardiomyozyten erhöht, miteinander assoziiert sind. Im Dispase-basierten Dissoziationsansatz stellte sich anschließend heraus, dass sowohl eine Störung der Cadherin-Haftung durch Trp, als auch jeweils ein Expressionsverlust des desmosomalen Cadherins Dsg2 und des desmosomalen Plaque-Proteins Pg die Zellhaftung signifikant herabsetzt. Dieser Effekt konnte jedoch durch Erhöhung von cAMP durch F/R sowie durch eine Inkubation mit Dsg2-LP rückgängig gemacht werden. Daneben konnte mithilfe einer Mikro-Elektroden-Anordnung gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Trp oder ein Verlust an den beiden desmosomalen Proteinen zu einer gestörten Erregungsweiterleitung und einer Arrhythmie innerhalb eines Zellrasens aus HL-1-Kardiomyozyten führten. Hier stellte sich unter Behandlung mit F/R bzw. Dsg2-LP eine signifikante Verbesserung der Erregungsausbreitung ein. Diese protektive Wirkung von Dsg2-LP ließ sich durch den PKC-Inhibitor Bim-X umkehren. Eine Beeinflussung der Amplitude der rhythmischen Schwankungen des intrazellulären Ca^{2+} durch Trp oder F/R konnte mithilfe von FURA2-basierten Messungen ausgeschlossen werden. Western Blot-Analysen zeigten, dass eine Behandlung mit Bim-X die Phosphorylierung von Cx43 an Ser368, dem wichtigsten Angriffspunkt der PKC ϵ , signifikant reduziert, dagegen eine Behandlung mit Dsg2-LP oder F/R diese signifikant erhöht. Um die Erkenntnisse aus den Untersuchungen an HL-1-Kardiomyozyten auf ein ex-vivo Maus-Modell zu erweitern, wurden Langendorff-perfundierte Pg-Knockout-Mäuseherzen und Wildtyp-Mäuseherzen mit Dsg2-LP bzw. einem Kontrollpeptid perfundiert. Hier zeigte sich eine signifikante Abnahme der durch den Verlust von Pg bedingten Arrhythmie unter Perfusion mit Dsg2-LP.

5.2 Interpretation der Ergebnisse

5.2.1 Der Glanzstreifen als funktionelle Einheit

Aus der Literatur ist bekannt, dass im Glanzstreifen die hauptsächlich für Erregungsweiterleitung zuständigen GJs, die Adhärensjunktionen und die Desmosomen, deren Hauptfunktion der Erhalt der interzellulären Zellhaftung ist, miteinander strukturell und funktionell eine Einheit bilden (Delmar, 2004; Delmar and McKenna, 2010; Waschke, 2008). Daher wird neuerdings die Bezeichnung Connexom verwendet (Agullo-Pascual et al., 2014).

Dieses Bild der Interaktion wird bestätigt und erweitert durch die Ergebnisse der Immunpräzipitation. Danach ist Cx43 als Hauptprotein der GJs mit Dsg2 als interzellulärem Bindungsprotein der Desmosomen assoziiert. Die Vorstellung der ICD als funktionelle Einheit der Proteinkomplexe kann also durch den Zusammenhalt ihrer Bestandteile ergänzt werden. Dabei muss neben GJs, Adhärensjunktionen und Desmosomen auch der β 1-adrenerge Rezeptor als Bestandteil des Zusammenspiels berücksichtigt werden, der bereits in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe als an Glanzstreifen lokalisiert beschrieben wurde (Schlipp et al., 2014). Dies bestätigen die Befunde der Immunpräzipitation der vorliegenden Arbeit.

5.2.2 Der Mechanismus der protektiven Wirkung von Dsg2-LP und cAMP auf die Zelladhäsion

Vorhergehende Untersuchungen zeigten bereits, dass Trp die Zelladhäsion durch eine Störung der Dsg2- und N-Cadherin-Interaktion in HL-1-Kardiomyozyten reduzierte (Schlipp et al., 2014). Daneben führte ein Anstieg von intrazellulärem cAMP durch β -adrenerge Stimulation über eine Verstärkung der Dsg2-Bindungen zu einer Erhöhung der Kohäsion zwischen Kardiomyozyten (Schinner et al., 2017). Die Ergebnisse des Dispase-basierten Dissoziationsansatzes belegten nun, dass ein Anstieg von cAMP darüber hinaus den durch eine Störung des Tryptophan-Austauschs ausgelösten Verlust der Cadherin-vermittelten Zellhaftung kompensieren konnte. Einen ähnlichen Effekt zeigte auch das Dsg2-LP, das zwar im Unterschied zur cAMP-Erhöpfung allein keinen signifikanten Effekt auf die Zellhaftung hatte, jedoch in der Lage war, den

Diskussion

Haftungsverlust durch Trp rückgängig zu machen. Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen (engl. Atomic Force Microscopy, AFM) hatten im Vorfeld unter zellfreien Bedingungen gezeigt, dass Dsg2-LP den Effekt auf die homophile Dsg2-Haftung, nicht aber die N-Cadherin-Bindung aufheben kann (Schlipp et al., 2014). Daher scheint der protektive Effekt von Dsg2-LP auf die Zellhaftung über eine Stabilisierung der desmosomalen Haftung vermittelt zu sein. Um den Effekt noch eindeutiger zu charakterisieren, wurde small interfering RNA (siRNA) eingesetzt. Damit wurde die Expression jeweils eines der beiden desmosomalen Proteine Dsg2 und Pg auf etwa 10-20% des ursprünglichen Wertes herabgesetzt. Da die bei der AC zugrundeliegenden Mutationen auch Gene dieser beiden desmosomalen Proteine betreffen, konnte somit eine weitere Annäherung an die Pathophysiologie der AC erzielt werden. So führte ein Expressionsverlust von Dsg2 und Pg zu einer reduzierten Zellhaftung der HL-1-Kardiomyozyten. Der Einsatz von Dsg2-LP konnte diese Auswirkung rückgängig machen. Für diesen protektiven Effekt des Dsg2-LP auf die Zellhaftung scheint die direkte Verstärkung der Dsg2-Interaktionen ausschlaggebend zu sein.

So zeigten vorhergehende Studien zur Wirkungsweise eines VE-Cadherin-verbindenden Peptids (Heupel et al., 2009a) und Untersuchungen zu Dsg2-LP (Heupel et al., 2009b; Schlipp et al., 2014) mithilfe des AFM, dass die jeweiligen verbindenden Peptide in der Lage sind, homophile Verbindungen zwischen den entsprechenden benachbarten Proteinen zu stärken, indem direkte Bindungen mit diesen eingegangen werden. Bezogen auf die vorliegenden Untersuchungen wäre eine direkte Verstärkung der Dsg2-Bindungen mithilfe des Dsg2-LP demnach in der Lage, einen Haftungsverlust in HL-1-Kardiomyozyten, ausgelöst entweder durch Trp oder eine Depletion von Dsg2 oder Pg, zu kompensieren. Dieser Erklärungsansatz scheint auch für die Untersuchungen zu gelten, bei denen ein Haftungsverlust mittels siRNA für Dsg2 herbeigeführt wurde. Da bei Einsatz von siRNA nur ein Expressionsverlust von ca. 80 % erreicht werden kann, scheint eine Verstärkung der verbliebenen Dsg2-Interaktionen ausreichend für eine signifikante Verbesserung der reduzierten Zelladhäsion zu sein. Ungeklärt ist jedoch, ob das Dsg2-LP an bereits bestehende Dsg2-Interaktionen bindet und diese so verstärkt oder ob durch das Dsg2-LP neue Dsg2-Dsg2-Interaktionen induziert werden oder sogar heterophile Interaktionen mit Dsg2 oder N-Cadherin. Entsprechende Untersuchungen werden in unserem Labor gerade durchgeführt.

Interessanterweise war der Effekt von Dsg2-LP im Unterschied zur Zellhaftung bei der GJ-Funktion nicht für die Behandlung mit Trp oder Depletion von Dsg2 und Pg gleich. Dsg2-LP hemmte bei Trp-Behandlung und bei Pg-Depletion sowohl die Erhöhung der SDNN als auch die Reduktion der Ausbreitungsgeschwindigkeit (Abbildung 13 B, C und 14 B, C). Bei Dsg2-Depletion wurde dagegen die Weiterleitung nicht signifikant verbessert (Abbildung 14 C). Diese Daten deuten an, dass für eine Regulation der GJ eine Mindestmenge an Dsg2 vorhanden sein muss. Zusammen mit der Immunpräzipitation könnte dies auf eine direkte Stabilisierung der GJs durch Dsg2 hinweisen. Dieser Unterschied war auch für die cAMP-Erhöhung durch F/R nachweisbar, was andeuten könnte, dass Dsg2 für den Effekt von cAMP nötig ist.

Aus der Literatur ließe sich eventuell noch ein weiterer Erklärungsansatz ableiten. Arbeiten an Keratinozyten im Zusammenhang mit dem Morbus Darier ergaben, dass Mutationen im Gen der SERCA2 bzw. Veränderungen in der Aktivität der PKC Einfluss auf die Zellhaftung in Keratinozyten nehmen (Hobbs et al., 2011). Mithilfe des Dissoziationsversuchs konnten diese Erkenntnisse auch auf HL-1-Kardiomyozyten übertragen werden. So erhöhte der PKC-Aktivator PMA die Zelladhäsion zwischen den Kardiomyozyten, während der SERCA-Inhibitor Thapsigargin diese reduzierte. Diese Funktion der SERCA- bzw. PKC-Aktivität wird in Keratinozyten vor allem ihrem Eingriff in den Ca²⁺-vermittelten Auf- und Abbau der Desmosomen zugeschrieben (Dhitavat et al., 2004; Hobbs et al., 2011; Nekrasova and Green, 2013). Ob die positive Wirkung von Dsg2-LP auf die Zelladhäsion in Kardiomyozyten eventuell auch über die SERCA- bzw. PKC-Aktivität vermittelt wird, wäre ein interessanter Fokus für weitere Untersuchungen.

5.2.3 Rolle der PKC für den Funktionsmechanismus des Dsg2-LP

Dsg2-LP wirkte sich bei einem Verlust desmosomaler Haftung protektiv auf die Erregungsweiterleitung aus. Im Wesentlichen ergeben sich dafür zwei sich ergänzende Erklärungsansätze. Zum einen kann die Wirkung von Dsg2-LP mit dem Bild der Glanzstreifen als funktionelle Einheit nachvollzogen werden. Während ein Funktionsverlust der Desmosomen die Integrität der Glanzstreifen stört und sich direkt negativ auf die Funktion und Lokalisation der GJs auswirkt, könnte ein Aufrechterhalten

der desmosomalen Funktion und Struktur durch den Einsatz von Dsg2-LP diesen Mechanismus verhindern. Für diese These spricht, dass eine pathologische Aggregation von Dsg2 unter Zugabe von Trp mit dem Verlust von Cx43 an der Membran einhergeht, wohingegen eine Wiederherstellung der physiologischen gleichmäßig punktuellen Verteilung von Dsg2 bei Einsatz von Dsg2-LP mit einer Relokalisation von Cx43 an der Membran verbunden ist.

Zum anderen muss in Betracht gezogen werden, dass die Verbesserung der Funktion der GJs durch Dsg2-LP über Signalwege vermittelt wird. In der Literatur wird eine positive Wirkung einer Aktivierung der PKC und damit einer Phosphorylierung von Cx43 am Serinrest 368 auf eine geregelte, GJ-vermittelte Erregungsweiterleitung beschrieben (Ek-Vitorin et al., 2006; Kwak et al., 1995; Lampe et al., 2000; Nassal et al., 2016). Um einen PKC-abhängigen Weg der Verbesserung der GJ -Funktion nachweisen zu können, wurde der PKC-Inhibitor Bim-X eingesetzt. Für eine Beteiligung der PKC in der Funktionskaskade des Dsg2-LP sprechen zunächst die Ergebnisse der Western Blot-Untersuchungen. Um eventuelle Wirkungen der PKC auf die GJs nachweisen zu können, wurde dabei mit dem Serinrest 368 eine wichtige Phosphorylierungsstelle der PKC am Cx43 untersucht. Eine Inkubation der HL-1-Kardiomyozyten mit Dsg2-LP erhöhte den Anteil des am Serinrest 368 phosphorylierten Cx43 am gesamten Cx43 signifikant im Vergleich zur Kontrolle, wohingegen der Einsatz des PKC-Inhibitors Bim-X diesen signifikant verringerte. Darüber hinaus konnte auch funktionell eine zentrale Rolle der PKC nachgewiesen werden. So machte eine Reduzierung der PKC-Aktivität durch Bim-X die protektive Wirkung des Dsg2-LP auf die gestörte Erregungsweiterleitung bei Pg-Depletion rückgängig. Unklar bleibt, über welchen Mechanismus das Dsg2-LP seine stimulierende Wirkung auf die PKC-Aktivität ausübt, und ob die Cx43-Phosphorylierung an Ser368 in diesem Kontext relevant ist. Als weiteres muss bedacht werden, dass im Organismus verschiedene Isoformen der PKC vorhanden sind. Dieser Aspekt wurde bei den vorliegenden Untersuchungen nur ansatzweise berücksichtigt, da der PKC-Inhibitor Bim-X nicht spezifisch auf eine bestimmte Isoform der PKC wirkt. Ein protektiver Effekt im ischämischen Herzen spricht dagegen für eine Beteiligung der PKC ϵ (Cross et al., 2002).

5.2.4 Beeinflussung der Funktion und Lokalisation der Gap Junctions durch desmosomale Haftung

Die MEA-Analysen an den HL-1-Kardiomyozyten zeigten, dass eine Reduktion der Zelladhäsion bzw. ein Verlust desmosomaler Haftung durch Trp oder durch eine Depletion von Dsg2 oder Pg die Erregungsweiterleitung in einem HL-1-Zellverband signifikant stört bzw. eine Arrhythmie induziert. Mithilfe des GJ-Inhibitors Carbenoxolon konnte ein erster Anhalt gefunden werden, dass bei beiden experimentellen Ansätzen zur Abschwächung desmosomaler Haftung eine Behinderung der GJ-Funktion ursächlich für die gestörte Erregungsweiterleitung ist. GJs besitzen eine zentrale Stellung in der interzellulären Weiterleitung elektrischer Signale im Herzmuskel. So wirkt sich der Einsatz von Carbenoxolon ähnlich auf die Erregungsweiterleitung bzw. die Arrhythmie innerhalb des Zellverbands aus wie Trp oder eine Depletion von Dsg2 oder Pg. Dass sich eine Interferenz mit dem Haftungsmechanismus eines desmosomalen Proteins bzw. dessen Verlust auf die Funktion der GJs auswirken kann, kann durch die Ergebnisse der Immunpräzipitation erklärt werden, wonach deren Komponenten Dsg2 und Cx43 miteinander assoziiert sind. Des Weiteren stehen diese Ergebnisse auch in Übereinstimmung mit Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die z. B. eine Abhängigkeit der Funktion und Lokalisation der GJs von der Expression des desmosomalen Proteins Plakophilin-2 gezeigt haben (Oxford et al., 2007).

Um der durch Tryptophan bedingten Störung der Erregungsweiterleitung und der Arrhythmie, die in den MEA-Analysen festgestellt wurde, weiter nachzugehen, wurden mithilfe von Immunfärbungen die Lokalisation von Dsg2 und Cx43 untersucht. Dabei wurden mit Dsg2 als interzellulärem Bindungsprotein der Desmosomen und Cx43 als Hauptprotein der GJs die Lokalisation zentraler Proteine der Glanzstreifen analysiert. Wie aus Vorarbeiten bekannt ist, führt eine Störung des Tryptophan-Austauschs zu einer Aggregation von irregulären Dsg2-Partikeln an der Membran (Schlipp et al., 2014). Interessanterweise zeigte sich darüber hinaus ein fast vollständiger Verlust von Cx43 an der Membran. Dies ist ein Hinweis dafür, dass die Störung der Erregungsweiterleitung durch eine aus dem desmosomalen Haftungsverlust folgende gestörte Lokalisation von Cx43 und damit auch gestörte Funktion der GJs vermittelt sein könnte.

Ein Verlust desmosomaler Interaktion bewirkt also zusammenfassend neben einer reduzierten Zellhaftung und einer Aggregation des desmosomalen Proteins Dsg2 auch

einen Verlust des GJ-Proteins Cx43 an der Membran von Kardiomyozyten sowie eine gestörte GJ-vermittelte Erregungsweiterleitung. Dies verdeutlicht erneut, dass die Bestandteile der Glanzstreifen nicht isoliert betrachtet werden dürfen, da sie räumlich, mechanisch und funktionell miteinander interagieren (Agullo-Pascual et al., 2014).

5.2.5 Die protektive Wirkung von cAMP auf die Erregungsweiterleitung

Da die Ergebnisse des Dissoziationsversuchs zeigten, dass eine Erhöhung des intrazellulären cAMP die Trp-induzierte Störung der desmosomalen Haftung kompensieren kann, stellte sich die Frage, ob sich dadurch auch protektive Effekte auf die verlangsamte Erregungsausbreitung und die entstandene Arrhythmie unter Trp nachweisen ließen. Es zeigte sich, dass eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch F/R die SDNN als Wert der Arrhythmie signifikant erniedrigte, während sich die Weiterleitungsgeschwindigkeit signifikant erhöhte. Zu diesen Erkenntnissen über die Abhängigkeit der Funktion der GJs von der desmosomalen Haftung passen auch die Ergebnisse der Immunfluoreszenz. Während sich unter alleiniger Behandlung mit Trp eine Aggregation von Dsg2-Fragmenten und ein Verschwinden von Cx43 von der Membran zeigte, machte eine Stimulation mit F/R dies nahezu vollständig rückgängig, indem sie zu einer Relokalisation von Cx43 an der Membran und einer physiologischen punktuellen Verteilung von Dsg2 an der Membran führte.

Dabei müssen zwei Punkte beachtet werden: zum einen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Verbesserung der Funktion der GJs durch die positiven Effekte von cAMP auf die desmosomale Haftung bzw. deren Wiederherstellung vermittelt wird. Hierbei wäre wiederum das Bild der Glanzstreifen als funktionelle Einheit maßgeblich. Dies würde sich auch auf Daten vorhergehender Arbeiten stützen, wonach die desmosomale Haftung durch erhöhtes cAMP verstärkt werden kann (Schinner et al., 2017). Zum anderen muss aber auch eine direkte Beeinflussung der GJs durch erhöhtes cAMP berücksichtigt werden. So belegen Untersuchungen, dass beta-adrenerge Stimulation über eine Erhöhung von cAMP zu einer verbesserten Permeabilität und einer verstärkten Ausbildung von GJs an der Membran führt (Campbell et al., 2014). Über welche Signalwege diese Funktion von cAMP im Herzmuskel vermittelt wird, ist in der Literatur noch unklar. Am naheliegendsten erscheint, dass sich beide Erklärungsansätze ergänzen.

Im Gegensatz zum HL-1-Zellverband, der mit Trp behandelt wurde oder bei dem eine Depletion von Dsg2 oder Pg herbeigeführt wurde, zeigte eine Erhöhung des intrazellulären cAMP auf einen HL-1-Zellverband, der mit Carbenoxolon behandelt wurde, keine positive Wirkung auf die gestörte Erregungsweiterleitung. Dies ist jedoch durch die Tatsache zu erklären, dass Carbenoxolon ein spezifischer GJ-Hemmer ist, der unabhängig von der desmosomalen Zellhaftung oder der Höhe des intrazellulären cAMP-Spiegels die GJ-Funktion blockiert.

Die FURA2-basierten Messungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration machen ebenfalls deutlich, dass unter Trp eine Arrhythmie der HL-1-Kardiomyozyten nachgewiesen werden kann und sich diese unter Einfluss von F/R verbessert. Daneben sprechen die Daten auch dafür, dass die Höhe der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eher unbeeinflusst von Trp und F/R zu sein scheint. Dies deutet darauf hin, dass sowohl Trp als auch F/R nicht in den intrazellulären Ca^{2+} -Stoffwechsel eingreifen. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass intrazelluläres Ca^{2+} am Auf- und Abbau desmosomaler Strukturen beteiligt ist (Hobbs et al., 2011).

5.2.6 Reduktion der Arrhythmie durch Dsg2-LP im ex-vivo Pg-Knockout-Mausmodell

Ex-vivo Untersuchungen am Mausmodell, bei dem spezifisch in den Herzmuskelzellen das Gen von Pg ausgeschaltet wurde, zeigten, dass durch Einsatz von Dsg2-LP die Arrhythmie reduziert werden konnte. Dies wird sowohl qualitativ durch Betrachtung der Schwankungsbreite der gemessenen Schlagintervalle im zeitlichen Verlauf, die sich bei den betreffenden Herzen unter Einsatz von Dsg2-LP deutlich reduzierte, belegt, als auch quantitativ durch Betrachtung der Standardabweichung der Schlagintervalle. Dieser Wert, der ein anerkannter Parameter zur Messung des Grades der Arrhythmie ist (de Sousa et al., 2010), konnte durch Einsatz von Dsg2-LP bei den Pg-Knockout-Hezen signifikant reduziert werden. Um zu prüfen, ob dieser Effekt spezifisch auf das Dsg2-LP zurückzuführen ist und sich eine Reduktion der Arrhythmie nicht durch Einsatz eines beliebigen anderen Peptids bzw. auch ohne Einsatz eines Peptids im 30-minütigen Verlauf der Perfusion hervorrufen lässt, wurden die Pg-Knockout-Hezen mit einem VE-Cadherin verbindenden Peptid (VE-Cad-LP) perfundiert. Hierbei stellte sich qualitativ

Diskussion

und quantitativ keine Verbesserung der Arrhythmie ein. Die Effekte können somit auf das Dsg2-LP zurückgeführt werden.

Dabei bleibt ungeklärt, auf welche Weise das Dsg2-LP seine anti-arrhythmogene Wirkung auf die Mäuseherzen ausübt. Am naheliegendsten ist, dass sich das Dsg2-LP über die Herzkranzgefäße, deren Abzweigungen und schließlich die Kapillaren im Herzgewebe verteilt. Für seine Funktion müsste das Peptid schließlich die Endothelbarriere überwinden, um in den Interzellularraum der Herzmuskelzellen zu gelangen, wo es seine Bindung mit den Dsg2-Resten eingehen kann. Diese Wirkweise würde am ehesten mit den Ergebnissen der Untersuchungen an den HL-1-Kardiomyozyten übereinstimmen. Dort kann das Dsg2-LP direkt mit den Proteinen an der Oberfläche der Zellen interagieren, da keine Gefäßwand überwunden werden muss. Dem Dsg2-LP scheint es also im ex-vivo Versuch möglich zu sein, die Gefäßwand zu penetrieren.

Im therapeutischen Einsatzgebiet von zyklischen Peptiden ist gerade dieser Punkt eine der größten Herausforderungen für die Wirksamkeit eines Peptids im Organismus. Besonders wichtig für die Fähigkeit eines Peptids, die Endothelbarriere zu überwinden sind zum einen seine molekulare Größe, wobei es kleineren Peptiden leichter fällt (Bechara and Sagan, 2013; Zorzi et al., 2017). Um zu testen, ob es dem Dsg2-LP möglich ist, die Gefäßwand zu überwinden und in das Gewebe zu diffundieren, wurde das Dsg-LP kovalent an Biotin gebunden, um es im Weiteren mittels seiner Wechselwirkung mit Streptavidin sichtbar zu machen. Während jedoch seine Verteilung in den Gefäßen sichtbar gemacht werden konnte, war es nicht möglich, biotinyliertes Dsg2-LP an der Oberfläche der Herzzellen nachzuweisen. Es bleibt aber unklar, ob dabei das Biotin am Dsg2-LP gebunden bleibt, oder isoliert in den Blutgefäßen zurückbleibt.

5.3 Diskussion der Methoden

Wenn die bisherigen Ergebnisse der Langendorff-Perfusion betrachtet werden, ergibt sich im Hinblick auf weiterführende murine in-vivo Versuche sowie einen eventuellen zukünftigen therapeutischen Einsatz des Dsg2-LP auf humaner Ebene eine wichtige Limitation. So wurde bei der zeitlich begrenzten Langendorff-Perfusion versuchsbedingt ein metabolischer Abbau des Peptids bzw. seine therapeutische Halbwertszeit nicht

Diskussion

berücksichtigt. Da das Peptid stetig über die Aorta direkt in die Herzkranzgefäße appliziert wurde, wurde ein körpereigener Abbau des Dsg2-LP umgangen. Für zukünftige Untersuchungen wäre deshalb die Frage nach der biologischen Halbwertszeit des Dsg2-LP von großer Bedeutung.

Einen weiteren Diskussionspunkt stellt die Verwendung von HL-1-Zellen als Kardiomyozytenzelllinie dar. Als erstes muss bedacht werden, dass die von William C. Claycomb entdeckten HL-1-Zellen aus dem Vorhof von Mäuseherzen gewonnen werden (Claycomb et al., 1998). Dies muss bei der Bewertung der Aussagefähigkeit der Experimente berücksichtigt werden. Denn die AC ist eine Erkrankung, deren tödliche Folgen sich nach heutigen Erkenntnissen vor allem auf Veränderungen an der rechten und/oder auch linken Herzkammer zurückführen lassen (Romero et al., 2013). Ein erwähnenswerter Aspekt ist zum Beispiel die unterschiedliche Expression der Connexine, die zum großen Teil die GJs bilden und so essentiell für die Erregungsweiterleitung sind. So besitzen GJs in Kardiomyozyten aus dem Vorhof verhältnismäßig mehr Cx45, dafür aber weniger Cx43 als GJs in Kardiomyozyten aus den Ventrikeln, was die Geschwindigkeit der Erregungsweiterleitung herabsetzt (Dias et al., 2014; Kreuzberg et al., 2006). Besonders problematisch erscheint die Tatsache, dass HL-1-Zellen weitgehend unpolarisiert zu sein scheinen und an allen Abschnitten der Zellmembran desmosomale Kontakte und GJs ausbilden. Deshalb werden die Befunde dieser Arbeit in unserem Labor aktuell an murinen Herzschnittkulturen nachvollzogen.

5.4 Ausblick

Da die bisherigen Untersuchungen einen positiven Effekt des Einsatzes von Dsg2-LP bei Pg-defizienten HL-1-Kardiomyozyten und einem ex-vivo Pg-Knockout-Mausmodell zeigten, steht es nun in Aussicht, die verwendeten Modelle auf ein höheres physiologisches Niveau zu heben. Interessant wäre es dabei vor allem, das Dsg2-LP in-vivo in Mäusen mit einem kardialen Defekt im Pg-Gen einzusetzen und funktionelle Veränderungen direkt in vivo beispielsweise mittels Echokardiographie zu analysieren. Von Interesse wären dabei die typischen, bei einer echokardiographischen Untersuchung bestimmten Parameter, wie die links- und rechtsventrikuläre Funktion, das links- und rechtsventrikuläre endsystolische und enddiastolische Volumen, die Ejektionsfraktion, linksventrikuläre Wanddicke sowie Flussgeschwindigkeiten. In Mäusen mit einem gleichzeitigen Fehlen von Plakoglobin und β -Catenin waren diese Parameter pathologisch verändert (Swope et al., 2012). Ein auf die vorliegende Studie bezogener möglicher Versuchsansatz wäre etwa der Vergleich von Kontrolltieren mit einem kardialen Verlust an Pg sowie Tieren mit einem kardialen Verlust an Pg, denen das Dsg2-LP zugefügt wurde. Um die Wirkung des Dsg2-LP im längeren Verlauf beurteilen zu können, wären dabei mehrmalige echokardiographische Bestimmungen der kardialen Parameter sinnvoll. Bevor die funktionellen Auswirkungen auf die Herzfunktion in vivo untersucht werden können, muss die oben genannte Frage nach der biologischen Halbwertszeit des Peptids geklärt werden bzw. müssen eventuell notwendige Anpassungen am Peptiddesign vorgenommen werden.

Des Weiteren würde der Einsatz elektronenmikroskopischer Bildgebung Aufschluss über eventuelle ultrastrukturelle Veränderungen an den Zellkontakten der Kardiomyozyten geben. Vorarbeiten zeigten bereits, dass eine Störung desmosomaler Haftung mit Dsg-Single Peptide und Trp Einfluss auf den ultrastrukturellen Aufbau der Zellkontakte nehmen. In HL-1-Kardiomyozyten führte dies zu Irregularitäten innerhalb der Junctionen (Schlipp et al., 2014). Aufschlussreich wäre hierbei zum einen zusätzlich die elektronenmikroskopische Analyse der Glanzstreifen von Pg-defizienten Mäuseherzen sowie die Analyse von Pg-defizienten HL-1-Kardiomyozyten nach Behandlung mit Dsg2-LP nach unterschiedlichen Applikationszeiten.

6 Zusammenfassung

Der Glanzstreifen ist mit seinen Bestandteilen, den Desmosomen, den Adhärensjunktionen, den Gap Junctions und dem beta-adrenergen Rezeptor essentiell für die interzelluläre Zellhaftung, die interzelluläre Erregungsweiterleitung sowie die Anpassung an β -adrenerge Stimulation in Kardiomyozyten. Die Arrhythmogene Kardiomyopathie ist eine hereditäre Herzerkrankung, bei der es aufgrund von Mutationen in Genen desmosomaler Proteine zu schweren Herzrhythmusstörungen kommen kann, die im schlimmsten Fall zum plötzlichen Herztod führen. Als zwei häufig betroffene desmosomale Proteine wurden Desmoglein-2 und Plakoglobin identifiziert. Vorliegende Daten aus der Forschung an Kardiomyozyten zeigten, dass die Desmoglein-2-Interaktion essentiell für die Adhäsion und Funktion von Kardiomyozyten ist. Des Weiteren konnte in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe einem Dsg-spezifischen verbindenden Peptid ein protektiver Effekt auf die Zellhaftung bei einem desmosomalen Funktionsverlust zugeschrieben werden, sowie auch adrenerger Stimulation eine positive Wirkung auf die Zelladhäsion.

In dieser Arbeit sollten nun die Zusammenhänge zwischen desmosomaler Zellhaftung und der Erregungsweiterleitung in Kardiomyozyten charakterisiert werden. Dabei sollte untersucht werden, ob eine Verstärkung der Zellhaftung durch das Dsg2-spezifische verbindende Peptid (Dsg2-LP) oder durch adrenerge Stimulation bei desmosomalem Haftungsverlust einen protektiven Effekt auf die gestörte Erregungsweiterleitung hat. Anschließend sollte der Einsatz des Dsg2-LP in einem ex-vivo-Pg-Knockout-Mausmodell untersucht werden.

Zunächst wurde in HL-1-Kardiomyozyten ein desmosomaler Haftungsverlust durch eine Störung des Tryptophan-Austauschs sowie durch eine Depletion der beiden desmosomalen Proteine Dsg2 und Pg ausgelöst. Dies führte zu einer gestörten Lokalisation und Funktion der für die Erregungsweiterleitung zuständigen Gap Junctions. Diese Auswirkungen auf Lokalisation und Funktion der Gap Junctions konnten durch den Einsatz des Dsg2-LP sowie durch eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels nahezu vollständig rückgängig gemacht werden. Ferner konnte der Proteinkinase C eine wichtige Funktion in der Wirkungsweise des Dsg2-LP nachgewiesen werden. In einem ex-vivo-Pg-Knockout-Mausmodell konnte die Arrhythmie durch eine Perfusion mit dem Dsg2-LP reduziert werden.

Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte somit ein tieferer Einblick in die Modulation der Adhäsion und Erregungsweiterleitung in Kardiomyozyten gegeben werden. Die Ergebnisse bekräftigen die Sichtweise, dass der Glanzstreifen als funktionelle Einheit gesehen werden muss, in der die einzelnen Bestandteile ihre Funktionen nicht als isolierte Elemente ausüben, sondern miteinander interagieren und damit auch funktionell und strukturell voneinander abhängig sind. Darüber hinaus konnte mit den Versuchen am ex-vivo-Pg-Knock-Out-Mausmodell ein erster Hinweis auf einen möglichen zukünftigen therapeutischen Einsatz des Dsg2-LP bei Patienten mit Arrhythmogener Kardiomyopathie gegeben werden.

7 Literaturverzeichnis

Agullo-Pascual, E., Cerrone, M., and Delmar, M. (2014). Arrhythmogenic cardiomyopathy and Brugada syndrome: diseases of the connexome. *FEBS Lett* 588, 1322-1330.

Al-Amoudi, A., and Frangakis, A.S. (2008). Structural studies on desmosomes. *Biochemical Society Transactions* 36, 181-187.

Asimaki, A., Tandri, H., Huang, H., Halushka, M.K., Gautam, S., Basso, C., Thiene, G., Tsatsopoulou, A., Protonotarios, N., McKenna, W.J., *et al.* (2009). A New Diagnostic Test for Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine* 360, 360:1075-1084.

Bass-Zubek, A.E., Hobbs, R.P., Amargo, E.V., Garcia, N.J., Hsieh, S.N., Chen, X., Wahl, J.K., 3rd, Denning, M.F., and Green, K.J. (2008). Plakophilin 2: a critical scaffold for PKC alpha that regulates intercellular junction assembly. *The Journal of Cell Biology* 181, 605-613.

Bechara, C., and Sagan, S. (2013). Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Letters* 587, 1693-1702.

Bell, R.M., Mocanu, M.M., and Yellon, D.M. (2000). Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Methods in Molecular Biology* 50, 940-950.

Borrmann, C.M., Grund, C., Kuhn, C., Hofmann, I., Pieperhoff, S., and Franke, W.W. (2006). The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. II. Colocalizations of desmosomal and fascia adhaerens molecules in the intercalated disk. *European Journal of Cell Biology* 85, 469-485.

Busby, R.W., Bryant, A.P., Bartolini, W.P., Cordero, E.A., Hannig, G., Kessler, M.M., Mahajan-Miklos, S., Pierce, C.M., Solinga, R.M., Sun, L.J., *et al.* (2010). Linaclotide, through activation of guanylate cyclase C, acts locally in the gastrointestinal tract to elicit enhanced intestinal secretion and transit. *European Journal of Pharmacology* 649, 328-335.

Campbell, A.S., Johnstone, S.R., Baillie, G.S., and Smith, G. (2014). beta-Adrenergic modulation of myocardial conduction velocity: Connexins vs. sodium current. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 77, 147-154.

Carthew, R.W., and Sontheimer, E.J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642-655.

Chatterjee, D., Fatah, M., Akdis, D., Spears, D.A., Koopmann, T.T., Mittal, K., Rafiq, M.A., Cattanach, B.M., Zhao, Q., Healey, J.S., *et al.* (2018). An autoantibody identifies arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy and participates in its pathogenesis. *Eur Heart J* 39, 3932-3944.

Claycomb, W., Lanson, J., Nicholas, A., Stallworth, B.S., Egeland, D.B., Delcarpio, J.B., Bahinski, A., and Izzo, N.J. (1998). HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Cell Biology* 95, 2979-2984.

Corrado, D., Link, M.S., and Calkins, H. (2017). Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine* 376, 61-72.

Corrado, D., Wichter, T., Link, M.S., Hauer, R.N., Marchlinski, F.E., Anastasakis, A., Bauce, B., Basso, C., Brunckhorst, C., Tsatsopoulou, A., *et al.* (2015). Treatment of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: An International Task Force Consensus Statement. *Circulation* 132, 441-453.

Craik, D.J., Fairlie, D.P., Liras, S., and Price, D. (2013). The future of peptide-based drugs. *Chemical Biology & Drug Design* 81, 136-147.

Cross, H.R., Murphy, E., Bolli, R., Ping, P., and Steenbergen, C. (2002). Expression of activated PKC epsilon (PKC epsilon) protects the ischemic heart, without attenuating ischemic H(+) production. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 34, 361-367.

Darrow, B.J., Fast, V.G., Kléber, A.G., Beyer, E.C., and Saffitz, J.E. (1996). Functional and Structural Assessment of Intercellular Communication. *Circulation Research* 79, 174-183.

- de Sousa, M.R., Barbosa, M.P.T., Lombardi, F., and Ribeiro, A.L.P. (2010). Standard Deviation of normal interbeat intervals as a risk marker in patients with left ventricular systolic dysfunction: A meta-analysis. *Int J Cardiol* *141*, 311-313.
- Delmar, M. (2004). The intercalated disk as a single functional unit. *Heart Rhythm* *1*, 12-13.
- Delmar, M., and McKenna, W.J. (2010). The cardiac desmosome and arrhythmogenic cardiomyopathies: from gene to disease. *Circulation Research* *107*, 700-714.
- Delva, E., Tucker, D.K., and Kowalczyk, A.P. (2009). The desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *1*, a002543.
- Dhitavat, J., Fairclough, R.J., Hovnanian, A., and Burge, S.M. (2004). Calcium pumps and keratinocytes: lessons from Darier's disease and Hailey–Hailey disease. *British Journal of Dermatology* *150*, 821-828.
- Dias, P., Desplantez, T., El-Harasis, M.A., Chowdhury, R.A., Ullrich, N.D., Cabestrero de Diego, A., Peters, N.S., Severs, N.J., MacLeod, K.T., and Dupont, E. (2014). Characterisation of connexin expression and electrophysiological properties in stable clones of the HL-1 myocyte cell line. *PLoS One* *9*, e90266.
- Duquesnes, N., Derangeon, M., Métrich, M., Lucas, A., Mateo, P., Li, L., Morel, E., Lezoualch, F., and Crozatier, B. (2010). Epac stimulation induces rapid increases in connexin43 phosphorylation and function without preconditioning effect. *Cardiovascular Physiology* *460*, 731-741.
- Ek-Vitorin, J.F., King, T.J., Heyman, N.S., Lampe, P.D., and Burt, J.M. (2006). Selectivity of connexin 43 channels is regulated through protein kinase C-dependent phosphorylation. *Circulation Research* *98*, 1498-1505.
- Fontaine, G., Frank, R., Tonet, J., Guiraudon, G., Cabrol, C., Chomette, G., and Grosogeat, Y. (1984). Arrhythmogenic right ventricular dysplasia: a clinical model for the study of chronic ventricular tachycardia. *Japanese circulation journal* *48*, 515-538.

Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Padilla, F., Rodriguez-Sinovas, A., and Mirabet, M. (2002). Gap junction-mediated intercellular communication in ischemic preconditioning. *Cardiovascular Research* 55, 456-465.

Gerull, B., Heuser, A., Wichter, T., Paul, M., Basson, C.T., McDermott, D.A., Lerman, B.B., Markowitz, S.M., Ellinor, P.T., MacRae, C.A., *et al.* (2004). Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nature Genetics* 36, 1162-1164.

Graves, B.M., Simerly, T., Li, C., Williams, D.L., and Wondergem, R. (2012). Phosphoinositide-3-kinase/akt - dependent signaling is required for maintenance of $[Ca^{2+}]_i$, ICa , and Ca^{2+} transients in HL-1 cardiomyocytes. *Journal of Biomedical Science* 19, 1-9.

Harrison, O.J., Brasch, J., Lassoa, G., Katsambaa, P., Ahlsena, G., Honiga, B., and Shapiro, L. (2016). Structural basis of adhesive binding by desmocollins and desmogleins. *PNAS* 113, 7160-7165.

Heupel, W.M., Efthymiadis, A., Schlegel, N., Müller, T., Baumer, Y., Baumgartner, W., Drenckhahn, D., and Waschke, J. (2009a). Endothelial barrier stabilization by a cyclic tandem peptide targeting VE-cadherin transinteraction in vitro and in vivo. *Journal of Cell Science* 122, 1616-1625.

Heupel, W.M., Müller, T., Efthymiadis, A., Schmidt, E., Drenckhahn, D., and Waschke, J. (2009b). Peptides Targeting the Desmoglein 3 Adhesive Interface Prevent Autoantibody-induced Acantholysis in Pemphigus. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 8589-8595.

Hirst, R., Charlotte, H., Kazuyoshi, H., and David, L. (2005). Measurement of $[Ca^{2+}]_i$ in Whole Cell Suspensions Using Fura-2. *Methods in Molecular Biology* 312, 37-45.

Hobbs, R.P., Amargo, E.V., Somasundaram, A., Simpson, C.L., Prakriya, M., Denning, M.F., and Green, K.J. (2011). The calcium ATPase SERCA2 regulates desmoplakin dynamics and intercellular adhesive strength through modulation of PKC α signaling. *The FASEB Journal* 25, 990-1001.

- Hoth, M., Wischmeyer, E., and Behrends, J. (2012). Herz. Duale Reihe Physiologie, 72-107.
- Kaestner, L., Scholz, A., and Lipp, P. (2015). Conceptual and technical aspects of transfection and gene delivery. *Bioorg Med Chem Lett* 25, 1171-1176.
- Kant, S., Holthofer, B., Magin, T.M., Krusche, C.A., and Leube, R.E. (2015). Desmoglein 2-Dependent Arrhythmogenic Cardiomyopathy Is Caused by a Loss of Adhesive Function. *Circulation: Cardiovascular Genetics* 8, 553-563.
- Kaplan, S.R., Gard, J.J., Protonotarios, N., Tsatsopoulou, A., Spiliopoulou, C., Anastasakis, A., Squarcioni, C.P., McKenna, W.J., Thiene, G., Basso, C., *et al.* (2004). Remodeling of myocyte gap junctions in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy due to a deletion in plakoglobin (Naxos disease). *Heart Rhythm* 1, 3-11.
- Kirchhof, P., Fabritz, L., Zwiener, M., Witt, H., Schafers, M., Zellerhoff, S., Paul, M., Athai, T., Hiller, K.H., Baba, H.A., *et al.* (2006). Age- and training-dependent development of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in heterozygous plakoglobin-deficient mice. *Circulation* 114, 1799-1806.
- Klinker, K.P., and Borgert, S.J. (2015). Beyond Vancomycin: The Tail of the Lipoglycopeptides. *Clinical Therapeutics* 37, 2619-2636.
- Kreuzberg, M.M., Willecke, K., and Bukauskas, F.F. (2006). Connexin-mediated cardiac impulse propagation: connexin 30.2 slows atrioventricular conduction in mouse heart. *Trends in Cardiovascular Medicine* 16, 266-272.
- Kroger, C., Loschke, F., Schwarz, N., Windoffer, R., Leube, R.E., and Magin, T.M. (2013). Keratins control intercellular adhesion involving PKC-alpha-mediated desmoplakin phosphorylation. *The Journal of Cell Biology* 201, 681-692.
- Kwak, B.R., van Veen, T.A.B., Analbers, L.J.S., and Jongsma, H.J. (1995). TPA Increases Conductance but Decreases Permeability in Neonatal Rat Cardiomyocyte Gap Junction Channels. *Experimental Cell Research* 220, 456-463.

Lampe, P.D., TenBroek, E.M., Burt, J.M., Kurata, W.E., Johnson, R.G., and Lau, A.F. (2000). Phosphorylation of Connexin43 on Serine368 by Protein Kinase C Regulates Gap Junctional Communication. *The Journal of Cell Biology* 149, 1503-1512.

Leo-Macias, A., Agullo-Pascual, E., and Delmar, M. (2016). The cardiac connexome: Non-canonical functions of connexin43 and their role in cardiac arrhythmias. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 50, 13-21.

Lüllmann-Rauch, R.P., F., (2015). *Histologie*. 238-260.

Manyari, D.E., Klein, G.J., Gulamhusein, S., Boughner, D., Guiraudon, G.M., Wyse, G., Mitchell, B.L., and Kostuk, W.J. (1983). Arrhythmogenic right ventricular dysplasia: a generalized cardiomyopathy. *Circulation* 68, 251-257.

Marcus, F.I., McKenna, W.J., Sherrill, D., Basso, C., Baucé, B., Bluemke, D.A., Calkins, H., Corrado, D., Cox, M.G., Daubert, J.P., *et al.* (2010). Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: proposed modification of the Task Force Criteria. *European Heart Journal* 31, 806-814.

Moncayo-Arlandi, J., and Brugada, R. (2017). Unmasking the molecular link between arrhythmogenic cardiomyopathy and Brugada syndrome. *Nature Reviews Cardiology* 14, 744.

Musil, L.S., Cunningham, B.A., Edelman, G.M., and Goodenough, D.A. (1990). Differential Phosphorylation of the Gap Junction Protein Connexin43 in Junctional Communication-competent and -deficient Cell Lines. *The Journal of Cell Biology* 111, 2077-2088.

Nassal, M.M., Werdich, A.A., Wan, X., Hoshi, M., Deschenes, I., Rosenbaum, D.S., and Donahue, J.K. (2016). Phosphorylation at Connexin43 Serine-368 Is Necessary for Myocardial Conduction During Metabolic Stress. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 27, 110-119.

Nekrasova, O., and Green, K.J. (2013). Desmosome assembly and dynamics. *Trends Cell Biol* 23, 537-546.

- Nicolaou, K.C., Boddy, C.N.C., Bräse, S., and Winssinger, N. (1999). Chemistry, Biology, and Medicine of the Glycopeptide Antibiotics. *Angewandte Chemie* 38, 2096 - 2152.
- Nielsen, M.S., Axelsen, L.N., Sorgen, P.L., Verma, V., Delmar, M., and Holstein-Rathlou, N.H. (2012). Gap junctions. *Compr Physiol* 2, 1981-2035.
- Oxford, E.M., Musa, H., Maass, K., Coombs, W., Taffet, S.M., and Delmar, M. (2007). Connexin43 remodeling caused by inhibition of plakophilin-2 expression in cardiac cells. *Circulation Research* 101, 703-711.
- Pasdar, M., Li, Z., and Chan, H. (1995). Desmosome Assembly and Disassembly Are Regulated by Reversible Protein Phosphorylation in Cultured Epithelial Cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 30, 108-121.
- Ponikowski, P., Voors, A.A., Anker, S.D., Bueno, H., Cleland, J.G., Coats, A.J., Falk, V., Gonzalez-Juanatey, J.R., Harjola, V.P., Jankowska, E.A., *et al.* (2016). 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 18, 891-975.
- Protonotarios, N., Tsatsopoulou, A., Patsourakos, P., Alexopoulos, D., Gezerlis, P., Simitsis, S., and Scampardonis, G. (1986). Cardiac abnormalities in familial palmoplantar keratosis. *British Heart Journal* 56, 321-326.
- Rampazzo, A. (2006). Genetic bases of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Heart International* 2, 17-26.
- Romero, J., Mejia-Lopez, E., Manrique, C., and Lucariello, R. (2013). Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy (ARVC/D): A Systematic Literature Review. *Clinical Medicine Insights: Cardiology* 7, 97-114.
- Saguner, A.M., Brunckhorst, C., and Duru, F. (2014). Arrhythmogenic ventricular cardiomyopathy: A paradigm shift from right to biventricular disease. *World Journal of Cardiology* 6, 154-174.

- Schinner, C., Erber, B.M., Yeruva, S., and Waschke, J. (2018). Regulation of cardiac myocyte cohesion and gap junctions via desmosomal adhesion. *Acta Physiol (Oxf)*, e13242.
- Schinner, C., Vielmuth, F., Rotzer, V., Hiermaier, M., Radeva, M.Y., Co, T.K., Hartlieb, E., Schmidt, A., Imhof, A., Messoudi, A., *et al.* (2017). Adrenergic Signaling Strengthens Cardiac Myocyte Cohesion. *Circulation Research* 120, 1305-1317.
- Schlipp, A., Schinner, C., Spindler, V., Vielmuth, F., Gehmlich, K., Syrris, P., McKenna, W.J., Dendorfer, A., Hartlieb, E., and Waschke, J. (2014). Desmoglein-2 interaction is crucial for cardiomyocyte cohesion and function. *Cardiovascular Research* 104, 245-257.
- Schmitz, F., and Aumüller, G. (2014). Herz und Herzbeutel. *Duale Reihe Anatomie*, 578-613.
- Smyth, J.W., and Shaw, R.M. (2013). Autoregulation of connexin43 gap junction formation by internally translated isoforms. *Cell Rep* 5, 611-618.
- Solan, J.L., and Lampe, P.D. (2007). Key connexin 43 phosphorylation events regulate the gap junction life cycle. *J Membr Biol* 217, 35-41.
- Spindler, V., Eming, R., Schmidt, E., Amagai, M., Grando, S., Jonkman, M.F., Kowalczyk, A.P., Muller, E.J., Payne, A.S., Pincelli, C., *et al.* (2018). Mechanisms Causing Loss of Keratinocyte Cohesion in Pemphigus. *J Invest Dermatol* 138, 32-37.
- Spindler, V., Rotzer, V., Dehner, C., Kempf, B., Gliem, M., Radeva, M., Hartlieb, E., Harms, G.S., Schmidt, E., and Waschke, J. (2013). Peptide-mediated desmoglein 3 crosslinking prevents pemphigus vulgaris autoantibody-induced skin blistering. *J Clin Invest* 123, 800-811.
- Spindler, V., and Waschke, J. (2018). Pemphigus-A Disease of Desmosome Dysfunction Caused by Multiple Mechanisms. *Front Immunol* 9, 136.
- Swope, D., Cheng, L., Gao, E., Li, J., and Radice, G.L. (2012). Loss of cadherin-binding proteins beta-catenin and plakoglobin in the heart leads to gap junction remodeling and arrhythmogenesis. *Molecular and Cellular Biology* 32, 1056-1067.

Thiene, G., Basso, C., Danieli, G.-A., Rampazzo, A., Corrado, D., and Nava, A. (1997). Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy: A Still Underrecognized Clinic Entity. *TCM* 7, 84-90.

van der Zwaag, P.A., Jongbloed, J.D., van den Berg, M.P., van der Smagt, J.J., Jongbloed, R., Bikker, H., Hofstra, R.M., and van Tintelen, J.P. (2009). A genetic variants database for arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Hum Mutat* 30, 1278-1283.

Veeraraghavan, R., Hoeker, G.S., Alvarez-Laviada, A., Hoagland, D., Wan, X., King, D.R., Sanchez-Alonso, J., Chen, C., Jourdan, J., Isom, L.L., *et al.* (2018). The adhesion function of the sodium channel beta subunit (beta1) contributes to cardiac action potential propagation. *Elife* 7.

Vielmuth, F., Spindler, V., and Waschke, J. (2018). Atomic Force Microscopy Provides New Mechanistic Insights into the Pathogenesis of Pemphigus. *Front Immunol* 9, 485.

Waschke, J. (2008). The desmosome and pemphigus. *Histochemistry Cell Biology* 130, 21-54.

Waschke, J., Böckers, T.M., and Paulsen, F. (2015). *Sobotta Lehrbuch. Elsevier.*

Welsch, U. (2014). *Lehrbuch Histologie. Elsevier.*

Wichter, T., Paul, M., Wollmann, C., Acil, T., Gerdes, P., Ashraf, O., Tjan, T.D., Soeparwata, R., Block, M., Borggreffe, M., *et al.* (2004). Implantable cardioverter/defibrillator therapy in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: single-center experience of long-term follow-up and complications in 60 patients. *Circulation* 109, 1503-1508.

Zorzi, A., Deyle, K., and Heinis, C. (2017). Cyclic peptide therapeutics: past, present and future. *Current Opinion in Chemical Biology* 38, 24-29.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

µm	Mikrometer
µmol/L	Mikromol pro Liter
Abb.	Abbildung
AFM	Atomic Force Microscopy (Rasterkraftmikroskopie)
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AC	Arrhythmogene Kardiomyopathie
β1-AR	β1-adrenerger Rezeptor
Bim-X	Bisindolylmaleimide X
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cm ²	Quadratzentimeter
CV	Conduction velocity (Geschwindigkeit der Erregungsweiterleitung)
Cx43	Connexin 43
Dsg	Desmoglein
Dsg2-LP	Dsg2-linking-peptide
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
F/R	Forskolin/Rolipram
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde

Anhang

HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
ICD	Intercalated Disc
IgG	Immunglobulin G
IgGm	Immunglobulin G der Maus
IgGrb	Immunglobulin des Kaninchens
KD	Knockdown
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
mA	Milliampere
MEA	Microelectrode Array
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mol/l	Mol pro Liter
mV	Millivolt
n.t.	non target
NGS	Normales Ziegenserum ("normal goat serum")
Nm	Nanometer
Pg	Plakoglobin
Phe	Phenylalanin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PPL	Prestained Protein Ladder
rpm	rates per minute (Umdrehungen pro Minute)

Anhang

SDNN	Standard deviation of NN-intervals (Standardabweichung der Schlagintervalle)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SERCA	Calciumpumpe des sarkoendoplasmatischen Retikulums
siRNA	small-interfering Ribonucleinacid
SR	Sarkoendoplasmatisches Retikulum
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Trp	Tryptophan
v. a.	vor allem
VE-Cad-LP	VE-Cadherin-linking peptide
z. B.	zum Beispiel

8.2 Zusammensetzung der Lösungen und Chemikalien

Name	Rezept und Herstellung
2% Formalinlösung	6g Paraformaldehyd in 300ml PBS bei 60°C lösen
Aprotinin-Lösung (1.000-fach)	10g Aprotinin-Pulver in 10ml dest. Wasser lösen; je 1:1.000 eingesetzt
BSA/NGS	3g BSA-Pulver, 1g NGS-Pulver in 100ml PBS lösen
Dissoziationspuffer	50mg (\cong 25 U) Dispase II in 10ml HBSS lösen und 100 μ l (\cong 0,65 U) Liberase DH auf Eis zugeben
ECL-Lösung I	500 μ l Luminol-Lösung (250mmol/l in DMSO), 220 μ l PCA-Lösung, 5ml Tris-HCl (1mol/l in dest. Wasser, pH 8,5) mit dest. Wasser auf 50ml auffüllen
ECL-Lösung II	32 μ l H ₂ O ₂ , 5 ml Tris-HCl (1mol/l in dest. Wasser, pH 8,5) mit dest. Wasser auf 50 ml auffüllen
Elektrophorese-Puffer	30g Tris-Base, 14g Glycin, 10g SDS mit dest. Wasser auf 2 Liter auffüllen
Fibronectin/ Gelatine-Lösung	0,1g Gelatine in 500ml dest. Wasser lösen und autoklavieren. Anschließend 1ml Fibronectin (1mg/ml) zugeben
FURA2-Messpuffer	8,2g NaCl, 0,26g KCl, 0,29g CaCl ₂ , 0,06g NaH ₂ PO ₄ , 0,17g NaHCO ₃ , HEPES und 0,9g D + Glukose in 1 Liter Wasser auflösen
HBSS	9,83g HBSS-Pulver, 0,35g NaHCO ₃ in 1 Liter dest. Wasser lösen
HL-1-Medium	87ml Claycomb-Medium, 10ml fötales Kälberserum, 1ml L-Glutamin-Lösung (200 mmol/l in dest. Wasser), 1ml Penicillin/Streptomycin
HL-1-Waschmedium	93ml Claycomb-Medium, 5ml fötales Kälberserum, 1ml L-Glutamin-Lösung (200mmol/l in dest. Wasser), 1ml Penicillin/Streptomycin

Anhang

IP-Puffer	0,071g Na ₂ HPO ₄ , 0,4383g NaCl, 500µl Triton X-100, 0,125g SDS, 0,5g Natriumdesoxycholat mit dest. Wasser auf 50ml auffüllen und mit HCl auf pH 7,2 einstellen
Lämmli-Puffer	0,757g Tris-Base, 2g SDS, 12,6g Glycerol, 0,01g Bromphenolblau in 100ml dest. Wasser lösen und mit HCl pH 6,9 einstellen
Langendorff-Perfusionspuffer	27,558g NaCl, 8,359g NaHCO ₃ , 1,401g KCl, 0,641g KH ₂ PO ₄ , 0,788g MgSO ₄ , 1,501g CaCl ₂ , 0,584g EDTA, 0,88g Pyruvat, 7,6g D-Glucose und 7,5µl Noradrenalin-Lösung (10mmol/l in dest. Wasser) mit dest. Wasser auf 4 Liter auffüllen; vor Experiment filtrieren und mit Carbogen begasen
Langendorff-Präparationspuffer	3,44g NaCl, 1,0452g NaHCO ₃ , 0,18g KCl, 0,08g KH ₂ PO ₄ , 0,10g MgSO ₄ , 0,18g CaCl ₂ und 1375U Heparin mit dest. Wasser auf 500ml auffüllen, vor Experiment filtrieren und auf Eis kühlen
Leupeptin-Lösung (1.000-fach)	10g Leupeptin-Pulver in 10ml dest. Wasser lösen; je 1:1.000 eingesetzt
NPG-Lösung	0,3g N-Propylgallat mit 12g Glycerol auf 50 °C erwärmen und mit PBS auf 20g auffüllen
PBS	8g NaCl, 0,2g KCl, 1,36g Na ₂ HPO ₄ , 0,2g KH ₂ PO ₄ in 1 Liter dest. Wasser lösen
PCA-Lösung	0,3 g PCA-Pulver in 20 ml DMSO lösen
Penicillin/Streptomycin	6,05g Penicillin G, 13g Streptomycinsulfat mit PBS auf 1 Liter auffüllen
Pepstatin-Lösung (1.000-fach)	10g Pepstatin-Pulver in 10ml Ethanol lösen; Je 1:1.000 eingesetzt
Phosphataseinhibitormischung (10-fach)	1 Tbl. PhosSTOP gelöst in 1ml des entsprechenden Puffers; je 1:10 eingesetzt
PMSF-Lösung (100-fach)	5g PMSF-Pulver in 280ml Ethanol lösen; je 1:100 eingesetzt

Anhang

Proteaseinhibitorenmischung (2-fach)	1 Tbl. cOmplete Protease Inhibitor Cocktail gelöst in 50ml dest. Wasser; Je 1:1 eingesetzt
Sammelgel	1,55ml dest. Wasser, 0,3ml Polyacrylamidlösung (30 % in dest. Wasser), 0,65ml Tris-HCl (0,5mol/l in dest. Wasser, pH 6,8), 25µl SDS-Lösung (10% in dest. Wasser), 11,25µl APS-Lösung (10% in dest. Wasser), 5,625µl TEMED
SDS-Lysepuffer (2-fach)	0,595g HEPES, 0,074g EDTA, 0,105g NaF, 10ml SDS-Lösung (10% in dest. Wasser) mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen und mit HCl pH auf 7,6 einstellen; vor dem jeweiligen Experiment mit Proteaseinhibitormischung 1:1 versetzen
TBS	2,42g Tris-Base, 8g NaCl in 1 Liter dest. Wasser lösen und mit HCl auf pH 7,6 einstellen
TBS-Tween	950µl Tween-20 in 2 Liter TBS lösen
Transfer-Puffer	15,15g Tris-Base, 73,2g Glycin, 5g SDS, 1 Liter Methanol mit dest. Wasser auf 5 Liter auffüllen
Trenngel 10 %	2,025ml dest. Wasser, 1,675ml Polyacrylamidlösung (30% in dest. Wasser), 1,25ml Tris-HCl (1,5mol/l in dest. Wasser, pH 8,8), 50µl SDS-Lösung (10% in dest. Wasser), 22,5µl APS-Lösung (10 % in dest. Wasser), 11,25µl TEMED
Triton-Puffer	0,98g MES, 0,95g EGTA, 0,102g MgCl ₂ , 500µl Triton X-100 mit dest. Wasser auf 100ml auffüllen
Trypsin/EDTA	0,6g Trypsin, 0,2g EDTA mit PBS auf 1 Liter auffüllen und mit HCl auf pH 7,2 einstellen
Waschpuffer I	0,910g Tris-Base, 1,315g NaCl, 0,006g EDTA, 750µl Tween-20 mit dest. Wasser auf 150ml auffüllen und mit HCl auf pH 7,5 einstellen

Anhang

Waschpuffer II	1,817g Tris-Base, 1,753g NaCl, 18,030g Harnstoff, 750µl Tween-20 mit dest. Wasser auf 150ml auffüllen und mit HCl auf pH 7,5 einstellen
Waschpuffer III	1 ml Triton X-100 in 100ml PBS lösen

Tabelle 4: Rezepte

Name	Hersteller
2-Mecaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Agar	Sigma-Aldrich, München
Aprotinin-Pulver	Carl Roth, Karlsruhe
APS	Merck, Darmstadt
ATP	Sigma-Aldrich, München
BDM	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
BSA-Pulver	Sigma-Aldrich, München
Claycomb-Medium	Sigma-Aldrich, München
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
D-Glukose	VWR, Ismaning
Dispase II	Sigma-Aldrich, München
DMEM/ F12	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe
DTT	AppliChem, Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich, München
Ethanol	VWR, Ismaning
Ethanolamin	Sigma-Aldrich, München
fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich, München
Fibronectin	Sigma-Aldrich, München
Gelatine (Rinderhaut)	Sigma-Aldrich, München
Glutaraldehyd (25%)	Merck, Darmstadt
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich, München
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HBSS-Pulver	AppliChem, Darmstadt
HCl	AppliChem, Darmstadt
HEPES	Sigma-Aldrich, München
KCl	AppliChem, Darmstadt

Anhang

KH ₂ PO ₄	Carl Roth, Karlsruhe
Leupeptin-Pulver	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, München
Liberase DH	Roche, Mannheim
Luminol	AppliChem, Darmstadt
Lysozym	Carl Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, München
Methanol	AppliChem, Darmstadt
MgCl ₂	Carl Roth, Karlsruhe
MgHPO ₄	Alfa Aesar, Karlsruhe
MgSO ₄	Carl Roth, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaCl	AppliChem, Darmstadt
NaF	Merck, Darmstadt
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcyanoborhydrid	Sigma-Aldrich, München
Natriumdesoxycholat	Carl Roth, Karlsruhe
NGS-Pulver	Jackson Immuno Research, West Grove, USA
Niedrig-temperaturig schmelzende (low melt) Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Noradrenalin	Sigma-Aldrich, München
PCA-Pulver	Sigma-Aldrich, München
Penicillin G	AppliChem, Darmstadt
Pepstatin-Pulver	Carl Roth, Karlsruhe
PhosSTOP	Roche, Mannheim
PMSF-Pulver	Sigma-Aldrich, München
Polyacrylamidlösung (30 %)	Sigma-Aldrich, München
PPL-Marker	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pyruvat	Sigma-Aldrich, München
reduziertes Gluthation	Sigma-Aldrich, München
rekombinante humane PKC α	Abcam, Cambridge, UK
rekombinante murine katalytische PKA-Untereinheit α	New England Biolabs, Frankfurt am Main
SDS	Carl Roth, Karlsruhe
Sulfo-NHS-Biotin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TEMED	Merck, Darmstadt
Tetradecanoylphorbolacetat	Sigma-Aldrich, München
Triethylamin	Sigma-Aldrich, München
Tris-Base	AppliChem, Darmstadt

Anhang

Trypsin	Serva, Heidelberg
Tween-20	AppliChem, Darmstadt
Xylol	VWR, Ismaning
Zitronensäure-Monohydrat	AppliChem, Darmstadt

Tabelle 5: Chemikalien

8.3 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. Jens Waschke für die Überlassung des Themas und das Vertrauen, dass er dabei in mich gesetzt hat. Ich bedanke mich für die enge Betreuung, die stetige Motivation und die Hilfe bei Planung und Gestaltung der Arbeit. Dankend erwähnen möchte ich des Weiteren die unvergesslichen Laborausflüge und die Ermöglichung der Teilnahme an wissenschaftlichen Kongressen. Schließlich hat all dies auch mein Interesse an der Forschung für meinen zukünftigen Lebensweg geweckt.

Daneben gilt mein Dank allen anderen Mitarbeitern des Labors, vor allem Frau Angelika Antonius und Frau Martina Hitzenbichler, die mir fortwährend geduldig bei den alltäglichen Laborproblemen mit Rat und Tat zur Seite standen. Bedanken möchte ich mich außerdem bei Frau Camilla Schinner, die mir als Kollegin der Arbeitsgruppe lehrreiche Ratschläge zuteilwerden ließ und für eine äußerst produktive Arbeitsatmosphäre sorgte. Weiterhin danke ich Frau Dr. Angela Wölfel für die vorbildliche Einarbeitung in das Thema und ihr weiterhin offenes Ohr. Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. Volker Spindler, der sich immer wertvoll an den Diskussionen und Fragestellungen meiner Arbeit beteiligte. Hervorheben möchte ich zudem meine studentischen Mitstreiter Lukas und Elias für aufschlussreiche Diskussionen, die Unterstützung sowie die bis heute bestehende Freundschaft, die den Spaß an der Arbeit auch in schwierigen Zeiten nicht zu kurz kommen ließ.

Ich danke meinen Freunden für ihr Verständnis und die gemeinsamen Momente, die meine Arbeit und das Studium zu einer wunderschönen Zeit machten.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei meinen Eltern. Ihr habt mir während meiner Doktorarbeit, vor allem aber auch in allen anderen Phasen meines Studiums Eure bedingungslose Unterstützung geschenkt. Ohne Euch wäre das alles in dieser Form sicher so nicht möglich gewesen. Ihr standet immer hinter mir.

Abschließend bedanke ich mich bei Carolin. Für Deine emotionale Unterstützung, sowie das Bewusstsein, dass alle kleineren und größeren Schwierigkeiten während der Arbeit nicht die Freude im Alltag nehmen können.

Danke.

8.4 Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Erber, Bernd Markus

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

« Modulation der Adhäsion und Erregungsweiterleitung in Kardiomyozyten »

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 11.01.2020

Bernd Erber

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand