



**Kardio restriktiver Knockout desmosomaler Proteine führt zu einer
Beeinträchtigung der elektromechanischen Kopplung ohne
mitochondriale Dysfunktion bei arrhythmogener Kardiomyopathie**

**Cardio restrictive knockout of desmosomal proteins causes
impaired electromechanical coupling without mitochondrial
dysfunction in arrhythmogenic cardiomyopathy**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Sektion Biomedizin

Vorgelegt von

Christina Albrecht

aus

Edmonton, Canada

Würzburg, 2023





**Kardiorestriktiver Knockout desmosomaler Proteine führt zu einer
Beeinträchtigung der elektromechanischen Kopplung ohne
mitochondriale Dysfunktion bei arrhythmogener Kardiomyopathie**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Sektion Biomedizin

Eingereicht von **Christina Albrecht** am:
Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende:	Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen
1. Betreuerin:	Prof. Dr. Brenda Gerull
2. Betreuer:	Prof. Dr. Christoph Maack
3. Betreuerin:	Prof. Dr. Kristina Lorenz
4. Betreuer:	Prof. Dr. Kai Schuh

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Kardio restriktiver Knockout desmosomaler Proteine führt zu einer Beeinträchtigung der elektromechanischen Kopplung ohne mitochondriale Dysfunktion bei arrhythmogener Kardiomyopathie“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 31. August 2023

Christina Albrecht

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Cardio restrictive knockout of desmosomal proteins causes impaired electromechanical coupling without mitochondrial dysfunction in arrhythmogenic cardiomyopathy” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process, neither in identical nor similar form.

Würzburg, 31st of August 2023

Christina Albrecht

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Anatomie und Funktion des Herzens.....	1
1.2	Molekulare Grundlagen der Glanzstreifenarchitektur	2
1.2.1	Elektrochemische Zell-Zell-Kommunikation: Gap Junctions	4
1.2.2	Mechanische Zell-Zell-Verbindungen: Desmosomen und Fasciae adhaerentes	5
1.3	Elektromechanische (EC) Kopplung.....	6
1.4	Kardiale mitochondriale (Patho-)Physiologie	8
1.4.1	Dynamik des kardialen Energie-Metabolismus	8
1.4.2	Substratverarbeitung.....	8
1.4.3	Oxidative Phosphorylierung und Energiebereitstellung.....	10
1.4.4	Mitochondriale Reaktive Sauerstoffspezies Produktion und Elimination	12
1.4.5	Kardiale mechano-energetische-Kopplung	14
1.4.6	Auswirkungen von oxidativem Stress auf das Herz	15
1.5	Arrhythmogene Kardiomyopathie	16
1.5.1	Hintergründe und klinisches Bild.....	16
1.5.2	Grenzen von Diagnostik und Therapie.....	17
1.6	Pathophysiologie der ACM	19
1.6.1	Genetische Grundlagen	19
1.6.2	Mögliche Pathomechanismen der ACM.....	21
1.7	PKP2-Mutation – Stand der Forschung	24
1.8	JUP-Mutation – Stand der Forschung	27
1.9	Charakterisierung der verwendeten Mausmodelle	29
1.10	Fragestellung und Zielsetzung	30
2	Material	33
2.1	Material für die RNA-Analysen	33
2.2	Material für die Kardiomyozytenisolation	34
2.3	Material für die Fluoreszenz- und Kontraktilitätsmessungen am IonOptix®-System	35

2.4	Material für die Mitochondrienisolation	36
2.5	Material für die Respirations- und Fluoreszenzmessungen am Oroboros®-System.....	37
2.6	Sonstiges Verbrauchsmaterial und Laborgeräte.....	38
3	Methoden	39
3.1	Tierhaltung	39
3.2	Generierung herzspezifischer, konditioneller Knockouts im Mausmodell	39
3.3	Kontrolle des Knockouts auf RNA-Ebene	41
3.3.1	Isolierung und Reinigung der totalen RNA.....	41
3.3.2	cDNA-Synthese	42
3.3.3	Quantitative Real-Time PCR.....	43
3.4	Kardiomyozytenisolation.....	45
3.5	Fluoreszenz- und Kontraktilitätsmessungen mit dem IonOptix®-System	48
3.5.1	Versuchsvorbereitung	49
3.5.2	Versuchsdurchführung.....	50
3.5.3	Stressprotokoll	51
3.5.4	Messung der Kontraktilitätsparameter	52
3.5.5	Messung des Redoxstatus.....	53
3.5.6	Messung der zytosolischen Kalziumkonzentration und des mitochondrialen Membranpotenzials	54
3.6	Ermittlung der zellulären Arrhythmie-Neigung	56
3.7	Isolation der Mitochondrien	57
3.8	Respirations- und Fluoreszenzmessungen mit dem Oroboros®-System	59
3.8.1	Grundlagen der Clark-Elektrode	59
3.8.2	Polarographische Atmungsmessung an isolierten Mitochondrien.....	60
3.8.3	Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzials.....	63
3.8.4	Messung der mitochondrialen H ₂ O ₂ -Emission	63
3.9	Auswertung und Statistik der Ergebnisse	64
4	Ergebnisse	65
4.1	RNA-Analysen.....	65
4.2	Ergebnisse der Messungen am IonOptix®-System	66
4.2.1	Kontraktilitätsmessungen	66
4.2.1.1	Plakophilin 2	66

4.2.1.2	Plakoglobin.....	70
4.2.2	Messung der zytosolischen Kalziumkonzentration.....	71
4.2.2.1	Plakophilin 2.....	72
4.2.2.2	Plakoglobin.....	76
4.2.3	Messung des Redoxstatus und mitochondrialen Membranpotentials ...	78
4.2.3.1	Plakophilin 2.....	78
4.2.3.2	Plakoglobin.....	82
4.3	Zelluläre Arrhythmie-Neigung.....	84
4.3.1.1	Plakophilin 2.....	84
4.3.1.2	Plakoglobin.....	85
4.4	Ergebnisse der Messungen am Oroboros®-System	86
4.4.1.1	Plakophilin 2.....	86
4.4.1.2	Plakoglobin.....	88
5	Diskussion.....	91
5.1	EC-Kopplung	91
5.2	Zelluläre Arrhythmie Neigung	96
5.3	Mitochondriale Funktion	97
5.4	Rolle der mitochondrialen Transhydrogenase	104
5.5	Gegenüberstellung beider Mausmodelle	105
5.6	Limitationen	106
6	Schlussfolgerung	111
7	Danksagung.....	115
I	Abbildungsverzeichnis	117
II	Tabellenverzeichnis	119
III	Anhang	120
IV	Bibliographie	123
V	Lebenslauf	138

Zusammenfassung

Arrhythmogene Kardiomyopathie (ACM) ist eine genetische Herzerkrankung, die durch Herzinsuffizienz, ventrikuläre Arrhythmien und plötzlichen Herztod gekennzeichnet ist. Mutationen in desmosomalen Proteinen der Zelladhäsion, wie Plakophilin 2 (PKP2) und Plakoglobin (PG), sind die häufigste Ursache der familiären ACM. Wie gestörte Zelladhäsion zum ACM-Phänotyp führt, ist jedoch nur teilweise geklärt. Potentielle Mechanismen sind eine gestörte Kalzium-(Ca²⁺)-Homöostase, mitochondrialer oxidativer Stress und metabolische Störungen. Ziel dieser Studie ist es, die mitochondriale Energetik und die Ca²⁺-Homöostase in kardio-restriktiven PKP2-Knockout-Mäusen (KO) im Alter von 4, 8 und 12 Wochen sowie in PG-Knockout-Mäusen im Alter von 6 Wochen zu untersuchen. Vier Wochen alte PKP2-KO-Mäuse zeigten frühe Anzeichen von ACM, während alle anderen Altersgruppen typische Kennzeichen von ACM rekapitulierten. Kontraktilität, die damit verbundenen Ca²⁺-Transienten, der Redoxstatus und das mitochondriale Membranpotenzial ($\Delta\Psi_m$) isolierter Kardiomyozyten wurden mit einem IonOptix-System bei elektrischer und β -adrenerger Stimulation untersucht. Alle desmosomalen KO-Kardiomyozyten zeigten eine verringerte diastolische Sarkomerlänge, was auf eine diastolische Dysfunktion hinwies. In allen PKP2 KO Kardiomyozyten lag außerdem ein erhöhter intrazellulärer Ca²⁺-Spiegel vor, während in den PG KO-Kardiomyozyten das intrazelluläre Ca²⁺ unverändert war. PKP2 KO- und PG KO-Kardiomyozyten wiesen keine Ca²⁺-Sensibilisierung der Myofilamente auf. Zur weiteren Bewertung der mitochondrialen Funktion wurde eine hochauflösende Respirometrie in isolierten Herzmitochondrien bei gleichzeitiger Überwachung von $\Delta\Psi_m$ in PKP2 KO und PG KO Mäusen durchgeführt, welche in allen Versuchs- und Kontrollgruppen vergleichbar war. Im Verlauf der Versuche blieb der Redoxstatus stabil und es konnte kein Exzess reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) festgestellt werden. Daraus konnte gefolgert werden, dass weder PKP2 KO noch PG KO-Mäuse eine beeinträchtigte mitochondriale Atmung aufwiesen. Diese Studie zeigt, dass isolierte PKP2 KO- oder PG KO-Kardiomyozyten EC-Kopplungsdefekte ohne mitochondriale Dysfunktion aufwiesen. Eine mitochondriale Dysfunktion konnte als treibender Faktor für die Progression des ACM-Phänotyps in den vorgestellten Mausmodellen ausgeschlossen werden. Weitere Studien sind erforderlich, um die mitochondriale Funktion im Zusammenhang mit ACM zu entschlüsseln.

Summary

Arrhythmogenic Cardiomyopathy (ACM) is a genetic heart disease characterized by cardiac failure, ventricular arrhythmias, and sudden cardiac death. Mutations in desmosomal cell adhesion proteins, such as plakophilin 2 (PKP2) and Plakoglobin (PG), are the most common cause of familial ACM. However, how disturbed cell adhesion leads to the ACM phenotype is only partially understood. Hypotheses include that disturbed cell adhesion and impaired calcium (Ca^{2+}) homeostasis impact mitochondrial function as a source of oxidative stress, ultimately causing electrical instability and metabolic dysfunction. The goal of this study is to investigate mitochondrial energetics and Ca^{2+} homeostasis in cardio-restricted PKP2 knockout (KO) mice at the age of 4, 8 and 12 weeks and PG knockout mice at the age of 6 weeks, mimicking early to advanced disease states. Four-week-old PKP2 KO mice showed early signs of ACM while all other age groups recapitulated hallmarks of ACM: systolic dysfunction, right ventricular dilation, and cardiac fibrosis. Contractility associated Ca^{2+} transients, redox state, and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) of isolated cardiomyocytes upon electrical and β -adrenergic stimulation were investigated with an IonOptix system. All age groups of PKP2 KO cardiomyocytes had decreased diastolic sarcomere length, indicating diastolic dysfunction, and elevated intracellular Ca^{2+} levels. 6-week-old PG KO cardiomyocytes showed a diastolic dysfunction in the same manner, while Ca^{2+} levels did not differ. In addition, no Ca^{2+} sensitization of myofilaments was detected in PKP2 KO or PG KO mice. To further assess mitochondrial function, high-resolution respirometry was performed with simultaneous monitoring of $\Delta\Psi_m$ in isolated cardiac mitochondria from PKP2 KO and PG KO mice. For all groups and controls, addition of ADP increased O_2 consumption and dissipated $\Delta\Psi_m$ to a similar extent, implying that neither PKP2 KO nor PG KO mice exhibit impaired mitochondrial respiration. During the experiments, the redox status remained stable, and no excess of reactive oxygen species (ROS) was detected. This study demonstrates that isolated PKP2 or PG KO cardiomyocytes exhibit EC-coupling defects without mitochondrial dysfunction. Mitochondrial dysfunction can be excluded as the driving factor of ACM phenotype progression in the mouse models presented in this study. Further studies are needed to unravel ACM-related mitochondrial biology.

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Funktion des Herzens

Das Herz von Säugetieren kann als ein System aus zwei hintereinander geschalteten Pumpen betrachtet werden: der rechte Vorhof und die rechte Herzkammer, die das sauerstoffarme Blut aus den Venen in den Lungenkreislauf zur Oxygenierung pumpen, und der linke Vorhof und die linke Herzkammer, die das Blut aus dem Lungenkreislauf in die Arterien pumpen, welche das oxygenierte Blut zur Versorgung in die Körperperipherie weiterleiten. Atrioventrikuläre (AV) Klappen verhindern den Rückfluss des Blutes aus den Kammern in die Vorhöfe: rechts die Trikuspidalklappe und links die Mitralklappe. Semilunare Gefäßklappen trennen jeden Ventrikel von seiner großen Arterie: die Pulmonalklappe zwischen dem rechten Ventrikel und der Pulmonalarterie; die Aortenklappe zwischen dem linken Ventrikel und der Aorta. Kurz hinter der Aortenklappe befinden sich die Mündungen der Herzkranzgefäße, welche das Herzgewebe versorgen. Alle vier Klappen liegen in einer Ebene innerhalb eines bindegewebigen "Skeletts", das die Vorhöfe und Kammern voneinander trennt. Dieses Bindegewebeskelett (Anulus fibrosus) dient als Isolator, der verhindert, dass elektrische Impulse zwischen den Vorhöfen und den Herzkammern weitergeleitet werden^{1,2}.

Die Zeit vom Ende einer Kontraktion des Herzmuskels bis zum Ende der nächsten Kontraktion wird als Herzzyklus bezeichnet und kann in unterschiedliche Phasen unterteilt werden. Die Füllung der Ventrikel erfolgt über die Vorhöfe in der Erschlaffungsphase der Ventrikel (Diastole). Dabei strömt 70% des Blutes passiv durch die Relaxation der Ventrikel und den somit erzeugten Druckabfall in die Ventrikel ein. Lediglich 30% des Blutes wird am Ende der Diastole aktiv durch die Vorhofkontraktion in die Ventrikel befördert. Es folgt die Kontraktionsphase der Ventrikel (Systole), in welcher ein Druckanstieg innerhalb der Ventrikel durch Kontraktion erzeugt wird. Übersteigt der ventrikuläre Druck den der nachgeschalteten Kreisläufe (Lungen- bzw. Körperkreislauf) öffnen sich die Gefäßklappen und ein Teil des Füllvolumens wird in die jeweiligen Kreisläufe ausgeworfen. Am Ende der Systole relaxiert der Ventrikel wieder, sodass die Füllung wiederbeginnen kann^{1,2}.

Die äußere Oberfläche des Herzens wird von Epikard ausgekleidet, einer Schicht aus Plattenepithelzellen, die ein Netzwerk aus fibrösem Bindegewebe überlagert und mit

dem Herzbeutel (Perikard) verbunden ist. Die innerste Schicht des Herzens ist das Endokard, eine weitere Bindegewebsschicht, welche die Hohlräume der Vorhöfe und der Ventrikel auskleidet. Das Myokard, zwischen Epi- und Endokard gelegen, bildet den größten Teil des Herzens und enthält vor allem Kardiomyozyten aber auch vereinzelt Bindegewebe. Letzteres wird von Fibroblasten dargestellt und trägt zur Zugfestigkeit und Steife des Herzens bei. Das Ventrikel-Myokard bildet makroskopisch überlappende Muskelfaserbündel, die sich spiralförmig von der Basis des Herzens bis zu seiner Spitze erstrecken. Aufgrund der vorherrschenden Druckverhältnisse (Aortendruck ca. 80mmHg vs. Pulmonalarteriendruck ca. 8mmHg) entspricht der linke Ventrikel etwa die dreifachen Muskelmasse und der doppelten Dicke des rechten Ventrikels^{1,2}.

Innerhalb des menschlichen Herzens kann man zwei Arten von Herzmuskelzellen unterscheiden: Zellen des Arbeitsmyokards, welche auf die Kontraktion spezialisiert sind, und Zellen des Erregungsleitungssystems, welche für die Schrittmachertätigkeit und die elektrische Leitung zuständig sind^{1,2}. Die elektrische Stimulation geht vom Sinusknoten aus, einem Kollektiv von spezialisierten Herzmuskelzellen, die autonom Aktionspotentiale erzeugen können und somit den primären Schrittmacher des Herzens bilden. Dieser ist an der Spitze des rechten Vorhofs lokalisiert. Das erzeugte Aktionspotential bildet eine Welle an Depolarisationen, welche über die Vorhöfe den AV-Knoten erreichen. Dieser leitet die Stimulation an das AV-Bündel weiter, welches den Anulus fibrosus durchdringt und somit normalerweise den einzigen Leitungsweg zwischen den Vorhöfen und den Herzkammern darstellt. Dabei handelt es sich um eine schnell leitende Struktur, die aus Purkinje-Zellen besteht und sich innerhalb des Interventrikularseptums in ein rechtes und ein linkes Bündel verzweigt. Letztere leiten die Impulse an die Herzmuskelzellen weiter, welche die elektrische Aktivität in mechanische Kontraktion übersetzen (siehe 1.3)^{1,2}.

1.2 Molekulare Grundlagen der Glanzstreifenarchitektur

Eine synchronisierte Kontraktion des Herzens beruht auf der symbiotischen Kopplung zweier physiologischer Prinzipien: die Bildung und Ausbreitung elektrischer Impulse und die mechanische Leistung³.

Eine bahnbrechende Entdeckung für das Verständnis, wie die individuelle Aktivität vieler einzelner Kardiomyozyten als funktionelle Einheit zur Gesamtleistung des Herzes führt, war die Identifizierung von Strukturen, die als Glanzstreifen bzw. Disci intercalares bekannt sind (Abb. 1). Glanzstreifen sind Zell-Zell-Kontakte aus mehreren

Komponenten, die sowohl der mechanischen Integration als auch der interzellulären Kommunikation und Erregungsausbreitung zwischen Kardiomyozyten dienen⁴.

Klassischerweise werden drei Hauptbestandteile der Glanzstreifen unterschieden⁵: (1.) Gap Junctions stellen eine metabolisch und elektrisch Verbindung zwischen benachbarten Kardiomyozyten dar; (2.) Desmosomen und (3.) Fasciae adhaerentes (Abb. 1) bilden stabile Zellverbindungen und übertragen Zugkräfte⁶. Außerdem sind wichtige Ionenkanäle, wie Natriumkanäle zur Impulserzeugung,⁷⁻⁹ als auch multifunktionale Ankerproteine an den Glanzstreifen lokalisiert¹⁰. Nachdem lange Zeit davon ausgegangen wurde, dass diese Bestandteile unabhängig voneinander funktionieren würden, versteht man heute unter Glanzstreifen ein großes makromolekulares Netzwerk interagierender Proteine^{3,5}.

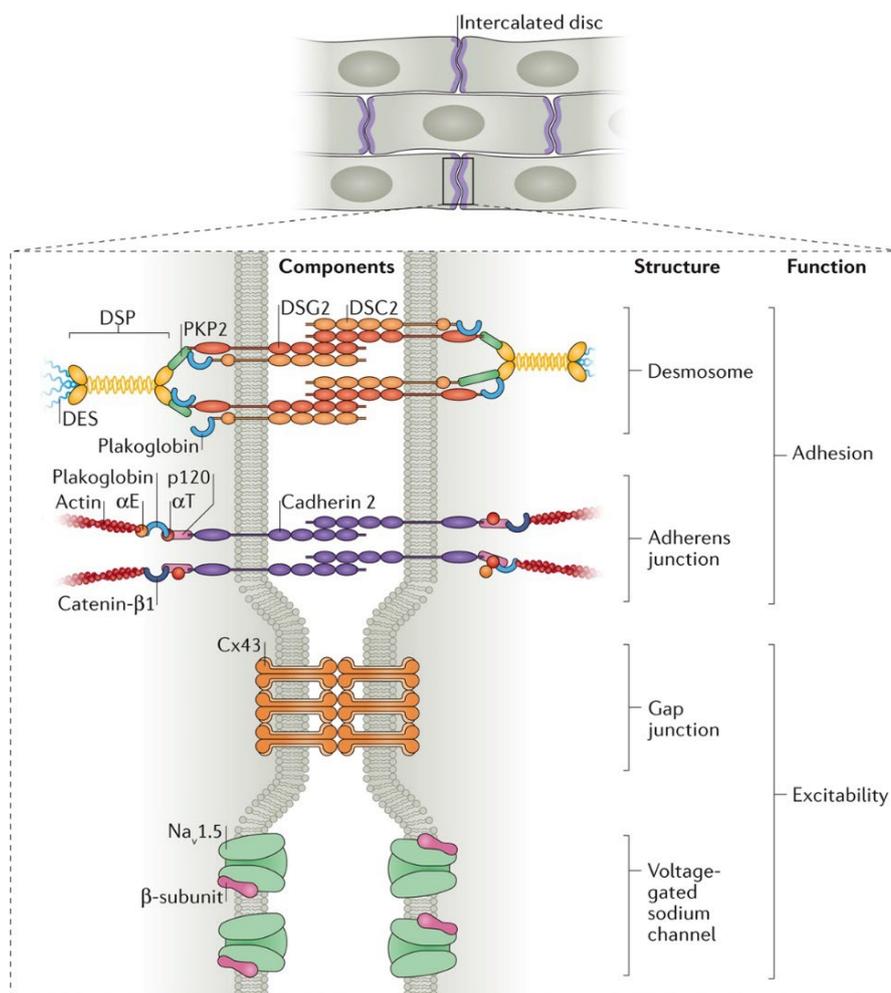


Abb. 1: Die Bestandteile der Glanzstreifen

Der Glanzstreifen (intercalated disc) ist eine Membranregion, die sich an den Enden des Kardiomyozyten befindet und die elektrische und mechanische Kopplung des Herzgewebes steuert. Es finden sich vier verschiedene Strukturen: Adherens Junction und Desmosomen, die an der Adhäsion (adhesion) der Kardiomyozyten beteiligt sind, sowie Gap Junctions und spannungsgesteuerte Natriumkanäle (Voltage-gated sodium channel), die an der elektrischen Ausbreitung und Erregbarkeit (Excitability) beteiligt sind. αE , Catenin- $\alpha 1$; αT , Catenin- $\alpha 3$; Cx43, Connexin 43; DES, Desmin; DSC2, Desmocollin 2; DSG2, Desmoglein 2; DSP, Desmoplakin; $Na_v1.5$, porenbildende Einheit des spannungsabhängigen Na^+ -Kanals; PKP2, Plakophilin 2; p120, p120 Catenin; ZO-1, Tight Junction Protein ZO-1. Reproduziert mit Erlaubnis von Springer Nature¹¹.

1.2.1 Elektrochemische Zell-Zell-Kommunikation: Gap Junctions

Zellen kommunizieren durch den Austausch von chemischen und elektrischen Signalen untereinander. Gap Junctions (auch als Nexus bezeichnet) bilden dynamische interzelluläre Poren oder Kanäle aus Connexinen. Jeweils sechs Connexinmoleküle interagieren miteinander, um zwei Halbkanäle (hexamere Hemikanäle oder Connexone) zu bilden, welche den interzellulären Spalt (engl.: Gap) überbrücken. Diese interzellulären Kanäle ermöglichen die elektrische und metabolische Kopplung zwischen zwei benachbarten Zellen, indem sie kleine Moleküle (<1000 Da) vom Zytoplasma einer Zelle zur anderen transportieren¹². Je nach Körperzelle werden unterschiedliche Connexin-Isoformen exprimiert; die im Herzen am häufigsten vorkommende Isoform ist dabei Connexin43 (Cx43)¹³. Im Arbeitsmyokard gruppieren sich die interzellulären Kanäle zu Gap Junction Clustern, die sich hauptsächlich an den Glanzstreifen befinden^{13,14}. Untersuchungen ergaben, dass in Kardiomyozyten die Gap Junctions umgebenden Membranzone (sog. Perinexus) nicht angedockte Connexone enthält, die aus Cx43 bestehen. Diese ist eine spezielle Membranzone für die Integration von Kanal-, Junctions- und Signaltransduktionsmolekülen^{15,16}.

Die Funktionen der Gap Junctions sind sehr vielfältig und umfassen unter anderem den Austausch von Stoffwechselprodukten und elektrischen Signalen zwischen den Zellen. Im Herzen vermitteln Gap Junctions die elektrische Kopplung zwischen Kardiomyozyten, indem hauptsächlich über sie das Aktionspotential übertragen wird. Diese Zell-zu-Zell-Pfade bilden somit die Grundlage für eine geordnete Ausbreitung der Erregungswelle, wodurch eine synchrone Kontraktion zustande kommt. Man spricht wegen dieser funktionellen Koppelung der Kardiomyozyten auch von einem funktionellen Synzytium^{17,18}. Veränderungen der Gap Junctions sind bekannte Merkmale menschlicher Herzinsuffizienz und anderer Herzerkrankungen mit Arrhythmie-Tendenz. Diese Veränderungen können als struktureller Umbau, Störungen in der Verteilung der Gap Junctions und/oder quantitative Veränderung der exprimierten Connexine vorkommen und eine verzögerte bzw. unterbrochene Reizweiterleitung als Folge haben^{18,19}. Der normale Herzrhythmus, die synchronisierte Herzkontraktion sowie eine physiologische Signaltransduktion hängen folglich grundlegend von der Kopplung der Herzmuskelzellen durch Gap Junctions ab.

1.2.2 Mechanische Zell-Zell-Verbindungen: Desmosomen und Fasciae adhaerentes

Die mechanische Verankerung von Zellen untereinander erfolgt über sogenannte Adhäsionskontakte. Man unterscheidet hierbei zwei funktionelle Gruppen, die Adhärenz-Verbindungen (Fascia adhaerens) und Desmosomen.

Fascia adhaerens verankern Zellen, indem sie die Zellmembran mit dem Aktin-Zytoskelett verbinden. Im Herzen gehören zu den Bestandteilen dieses Komplexes Cadherine (N-Cadherin-Homodimere). Sie bilden als Transmembranproteine einerseits mit dem extrazellulären Anteil die Verbindung zur benachbarten Zelle. Andererseits binden und regulieren sie die zytoplasmatischen Catenine (α -, β - und γ -Catenin [Plakoglobin]), die intrazellulär die Verbindung zum eigenen Aktin-Zytoskelett herstellen¹². Fascia adhaerens spielen auch eine wichtige Rolle bei der Mechanotransduktion, d.h. sie nehmen Spannungskräfte des Zytoskeletts wahr und vermitteln über nachgeschaltete Signalwege eine morphologische Anpassung der Zelle²⁰.

Desmosomen sind wichtige Zelladhäsionsverbindungen, die Zellmembranen an Intermediärfilamente verankern und somit das Zytoskelett angrenzender Zellen miteinander verbinden. Der interzelluläre Teil des kardialen Desmosoms wird von den Cadherinen Desmoglein-2 und Desmocollin-2 gebildet, die sich auf heterologe Weise verbinden. Diese Transmembranproteine binden an die zytoplasmatischen Plaque-Proteine Plakoglobin (PG) und Plakophilin-2 (PKP2), Mitglieder der Armadillo-Familie. Letztlich stellt Desmoplakin, ein Mitglied der Plakin-Familie, die Verbindung zwischen PG und PKP2 und den Desmin-Filamenten des Zytoskeletts her^{5,12}.

Da Desmosomen intrazellulär mit dem Zytoskelett verbunden sind, bilden sie die Adhäsionen in einem Netzwerk, das den Geweben mechanische Festigkeit verleiht. Somit sind Desmosomen besonders häufig in Geweben, die ständig mechanischen Kräften ausgesetzt sind, wie der Epidermis und dem Herzmuskel, zu finden. Wenn die desmosomale Adhäsion versagt, wie es bei bestimmten genetischen und Autoimmunkrankheiten der Fall ist, können strukturelle Gewebeschäden auftreten²¹. Ein Beispiel hierfür ist die blasenbildende Hauterkrankung Pehigus vulgaris²². Jedoch ist noch nicht abschließend geklärt, ob diese Erkrankung allein durch desmosomale Instabilität verursacht wird, oder noch weitere Signaltransduktionswege zum Krankheitsgeschehen beitragen²¹. Neben der Aufrechterhaltung der mechanischen Stabilität konnten den einzelnen desmosomalen Proteinen nämlich auch eine Reihe

von Interaktionen in verschiedenen Signaltransduktionsvorgängen nachgewiesen werden (siehe Kapitel 1.7 und 1.8).

Molekulare Untersuchungen der Glanzstreifen konnte in adulten Kardiomyozyten eine Kolokalisation von desmosomalen und Adhärenzverbindungs-Proteinen nachweisen. Im Laufe der embryonalen Entwicklung vereinigen sich diese beiden Adhäsionskontakte zu einem herzspezifischen Mischtyp, den *Area composita*. Die *Area composita* ist mit über 90% die vorherrschende Haftverbindung in Glanzstreifen. Dazwischen finden sich Gap Junctions sowie einzelne separate Desmosomen²³. Dieser Aufbau gewährleistet die koordinierte Kopplung von Herzerregung und Herzkontraktion²⁴.

1.3 Elektromechanische (EC) Kopplung

Das menschliche Herz schlägt im Durchschnitt 10^9 -mal im Laufe eines Lebens²⁵. Der Begriff der elektromechanischen-(EC)-Kopplung beschreibt dabei die Prozesse, welche die elektrische Erregung in die Entwicklung mechanischer Arbeit im Herzen umsetzen.

Die EC-Kopplung wird durch die Ausbreitung eines Aktionspotenzials im Herzmuskel eingeleitet. Die hierdurch erzeugte Depolarisation öffnet L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (LTCC), welche in den Transversal (T)-Tubuli, Ausstülpungen der Zellmembran, lokalisiert sind. Der daraus resultierende Eintritt einer geringen Menge Ca^{2+} führt zu einem lokalen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) im dyadischen Raum – die Region, welche durch T-Tubuli und das Sarkoplasmatisch Retikulum (SR) begrenzt wird. Dies bewirkt die Öffnung von Ryanodinrezeptoren (RyR2) im SR mit einer umso größeren Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Das Zusammenspiel zwischen LTCC und RyR2 wird durch die enge Nachbarschaft beider Kanäle in den Dyaden zwischen T-tubulärem Sarkolemm und dem junctionalen SR erleichtert. Dieser Prozess wird auch als Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung bezeichnet und trägt zu einem Anstieg des $[\text{Ca}^{2+}]_c$ um das Zehnfache ($\sim 1 \mu\text{M}$) bei²⁶. Dieses Ca^{2+} steht nun den Myofilamenten zur Verfügung, wo Ca^{2+} an Troponin C (TnC) bindet und somit eine Konformationsänderung im Tropomyosin bewirkt. Dies ermöglicht die Interaktion des Aktin-Myosin-Komplexes. Die Aktin- und Myosinfilamente gleiten übereinander und ziehen die beiden Enden eines Sarkomers zusammen. Die sich daraus ergebende Zellverkürzung der Kardiomyozyten führt summiert zur Kontraktion des gesamten Herzens. Die Relaxation wird durch eine zelluläre Repolarisation eingeleitet, wodurch der nach intrazellulär gerichtete Ca^{2+} -Strom inaktiviert wird. Die Ca^{2+} -Menge, die über

die LTCC in die Zelle gelang, wird während der Diastole hauptsächlich über den sarkolemmalen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) exportiert, während das Ca^{2+} , das aus dem SR freigesetzt wurde, von der SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA) wieder aufgenommen wird. Darüber hinaus trägt die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase in geringem Umfang zum Ca^{2+} -Abbau bei. Nach Dissoziation des Ca^{2+} von TnC entspannen die Myofilamente (siehe Abb. 2)²⁶⁻²⁹.

Weiterhin wurde postuliert, dass auch Mitochondrien während der Diastole zytosolisches Ca^{2+} entfernen²⁶. Jedoch besteht die vorherrschende Meinung, dass Mitochondrien Ca^{2+} über den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter (MCU) während der Systole akkumulieren und während der Diastole freisetzen³⁰. Ohnehin sind die mitochondrialen Ca^{2+} -Ströme im Vergleich zu denen von SERCA und NCX relativ gering und daher für die zytosolische Ca^{2+} -Dynamik wahrscheinlich unbedeutend. Dagegen spielen die mitochondrialen Ca^{2+} -Ströme für die metabolische Anpassung an eine erhöhte kardiale Arbeitsbelastung eine entscheidende Rolle³¹.

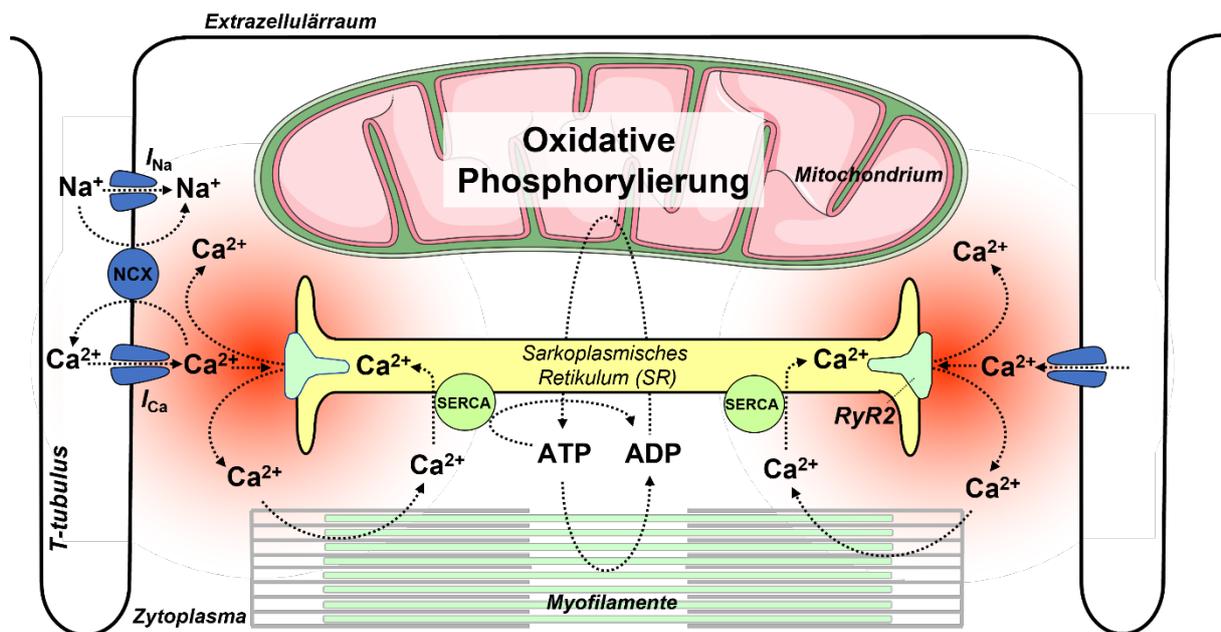


Abb. 2: Elektromechanische Kopplung in Kardiomyozyten

Transversal(T)-Tubulus; spannungabhängiger Ca^{2+} -(I_{Ca}) und Na^+ -Einstrom (I_{Na}); RyR2, Ryanodinrezeptor 2; SR, Sarkoplasmatisches Retikulum; SERCA, SR- Ca^{2+} -ATPase; NCX, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher; ATP, Adenosintriphosphat; ADP, Adenosindiphosphat. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von C. Maack und M. Kohlhaas.

1.4 Kardiale mitochondriale (Patho-)Physiologie

Das Herz macht nur ~0,5 % des Körpergewichts aus, ist aber für etwa 8 % des Adenosintriphosphat-(ATP)-Verbrauchs verantwortlich und damit das stoffwechselreichste Organ des Körpers. Im Herzen selbst wird nur ausreichend Energie gespeichert, um den Pumpvorgang für einige Herzschläge zu gewährleisten, wobei der gesamte ATP-Vorrat selbst in Ruhe etwa alle 10 s erneuert wird³². Dies erklärt auch, warum Kardiomyozyten eine der Mitochondrien-reichsten Zellarten des Körpers sind³³. Die bioenergetischen Wege, die zur Erzeugung von ~90% des zellulären ATPs beitragen, finden fast ausschließlich in Mitochondrien statt. Hierunter zählen der Citratzyklus, die mitochondriale Fettsäureoxidation (β -Oxidation) und insbesondere die oxidative Phosphorylierung. Mitochondrien sind somit für die Zelle essenziell zur Deckung des immensen Energiebedarfs für elektrische und mechanische Prozesse in Kardiomyozyten³⁴. Weitere Funktionen dieser Zellorganelle sind die Erzeugung und Regulierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die Pufferung zytosolischen Ca^{2+} und die Regulierung der zellulären Apoptose durch die mitochondriale Permeabilitätstransitions-pore (mPTP)³⁵.

1.4.1 Dynamik des kardialen Energie-Metabolismus

Der kardiale Metabolismus ist zu 95% von der ATP-Produktion durch mitochondriale oxidative Phosphorylierung abhängig^{36,37}. Im gesunden Herzen steht die oxidative ATP-Produktion durch hochkomplexe Signalkaskaden und enzymatische Prozesse im Gleichgewicht mit der ATP-Hydrolyse. Während das Herz im Ruhezustand mit lediglich ~15-25 % seiner maximalen oxidativen Kapazität arbeitet, kann diese bei erhöhtem Energiebedarf schnell rekrutiert werden, um konstante ATP-Spiegel zu gewährleisten³⁸. Dieser dynamische Prozess, der chemische Energieträger in mechanische Arbeit konvertiert, kann in drei essenzielle Schritte aufgeteilt werden: Substratverarbeitung, oxidative Phosphorylierung, sowie ATP-Transfer und -Verbrauch durch Prozesse wie die EC-Kopplung³⁹.

1.4.2 Substratverarbeitung

Grundlage der Substratverwertung ist die Verarbeitung von Nahrung in Energiesubstrate (freie Fettsäuren, Kohlenhydrate wie Glukose und Laktose), deren zelluläre Aufnahme, die Aufspaltung dieser Komponenten sowie die Einspeisung der resultierenden Zwischenprodukte in den Citratzyklus³⁹. Obwohl freie Fettsäuren die Plasmamembran durchqueren können (Flip-Flop), wird ihre Aufnahme hauptsächlich

durch Fettsäure-bindende Plasmamembranproteine (FABP3, FABP4) erleichtert. Zytosolische mittel- und kurzkettige Fettsäuren können die Mitochondrienmembran passieren, während langkettige Fettsäuren zu Fett-Acyl-Coenzym A (CoA) verestert und über den Carnitin-Shuttel in die Mitochondrien transportiert werden. Acyl-CoA wird dann der β -Oxidation zugeführt, wobei Acetyl-CoA und die Redox-Äquivalente Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH_2) entstehen^{40,41}. Glukose wird durch Glukosetransporter (GLUT1 und GLUT4) in das Zytosol transportiert⁴². Nach der Aufnahme werden bei der Glykolyse Pyruvat, NADH und geringe Mengen an ATP auf Substratebene erzeugt. Pyruvat wird entweder im Zytosol in Laktat umgewandelt oder in die mitochondriale Matrix transportiert und durch die Pyruvat-Dehydrogenase unter Entstehung von Acetyl-CoA und NADH katalysiert³⁸. Der Zwischenmetabolit Acetyl-CoA wird in dem Citratzyklus durch eine Reihe chemischer Reaktionen zu NADH und FADH_2 oxidiert, welche als Grundlage für die oxidative Phosphorylierung dienen³³. Die Verfügbarkeit von Nährstoffen sowie von NADH und FADH_2 steuert vorwiegend die Aktivität des Citratzyklus (siehe Abb. 3). In Kardiomyozyten bildet mitochondriales Ca^{2+} eine zusätzliche Regulierungsebene des Citratzyklus, dessen physiologische Bedeutung in 1.4.3 erörtert wird²⁷.

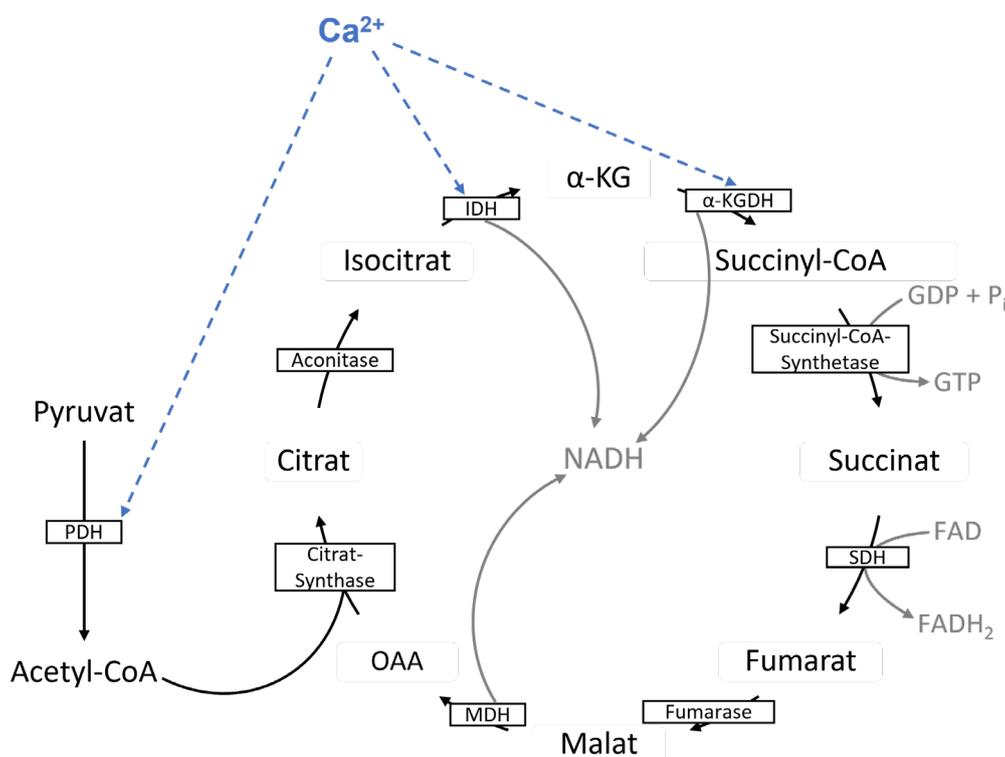


Abb. 3: Der Citratzyklus

IDH, Isocitratdehydrogenase; α -KG, α -Ketoglutarat; α -KGDH, α -Ketoglutaratdehydrogenase; CoA, Coenzym A; GDP, Guanosindiphosphat; P_i, Phosphat; GTP, Guanosintri-phosphat; SDH, Succinatdehydrogenase; MDH, Malatdehydrogenase; OAA, Oxalacetat; PDH, Pyruvatdehydrogenase; Ca^{2+} , Kalzium; NADH, reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid; FAD/ FADH_2 , oxidiertes/reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid.

Grundsätzlich kann das Herz zur ATP-Produktion alle Klassen von Energiesubstraten benutzen, jedoch gibt es je nach Entwicklungsstatus unterschiedliche Präferenzen: während der Fetalzeit sind Laktat und Glukose die Hauptquellen. Nach der Geburt erfährt das Herz eine metabolische Anpassung, indem es die Substratoxidation von Glukose auf Fettsäuren umstellt. Somit wird die β -Oxidation von freien Fettsäuren zur primären Substrat-Quelle der ATP-Produktion. Letztlich bezieht das Herz seine Energie zu ca. 60-80% aus Fettsäuren und 20-40% aus Kohlenhydraten^{38,43}. Unter pathologischen Bedingungen verschiebt sich der Stoffwechsel des Herzens von der Fettsäuren-Oxidation zurück zu einer erhöhten Glukose-Abhängigkeit, wie im fetalen Herzen^{33,44}. Infolge eines Ungleichgewichts zwischen Glukoseaufnahme und Glukoseoxidation in Kombination mit einer verminderten Fettsäuren-Oxidation wird die Kapazität des mitochondrialen oxidativen Stoffwechsels erschöpft und letztendlich schrumpft die kardiale Energiebereitstellung³⁸.

1.4.3 Oxidative Phosphorylierung und Energiebereitstellung

Die ATP-Produktion findet an der mitochondrialen Atmungskette statt, die aus fünf in die innere mitochondriale Membran (IMM) integrierte Proteinkomplexen besteht. Diese fungiert als Elektronentransportkette (ETC) und nutzt eine Reihe von Elektronentransferreaktionen, um zelluläres ATP durch oxidative Phosphorylierung zu erzeugen³³. Glukose, Fettsäuren und Aminosäuren werden katabolisiert und das gemeinsame Endprodukt Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingespeist. Der Citratzyklus ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und somit in unmittelbarer Nähe zur ETC. Im Citratzyklus werden Redoxäquivalente in Form von NADH und FADH₂ erzeugt (siehe Abb. 3). NADH wird durch den Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase) und FADH₂ durch den Komplex II (Succinat-Dehydrogenase) oxidiert und geben jeweils ein Elektronenpaar an das in der IMM ansässigen Ubichinon ab. Die Elektronen von Komplex I bzw. II werden durch eine Reihe von Elektronenträgern mit zunehmendem Reduktionspotential (Komplex I/II \rightarrow Ubichinon \rightarrow Komplex III \rightarrow Cytochrom C \rightarrow Komplex IV; siehe Abb. 4) zu molekularem Sauerstoff geleitet, der als terminaler Elektronenakzeptor fungiert und zu Wasser reduziert wird⁴⁵. Die durch den Elektronenfluss an Komplex I, III und IV erzeugte Energie wird genutzt, um Protonen (H⁺) aus der Matrix in den Intermembranraum zu translozieren. Diese Protonenverschiebung erzeugt über der IMM eine protonenmotorische Kraft (Δp), die sich aus Protonenkonzentration (ΔpH) und elektrochemischen Protonengradienten, auch bekannt als das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m$), zusammensetzt. Die

F1-Fo-ATP-Synthase (Komplex V) nutzt die Δp als Antrieb, um die ADP-Phosphorylierung zu katalysieren und damit die Umwandlung von Energie, die aus der Oxidation von Nährstoffen gewonnen wird, in die Phosphatbindung von ATP zu übertragen - ein Prozess bekannt als oxidative Phosphorylierung. Der konstante Elektronenfluss entlang der ETC wird dabei durch NADH und FADH_2 aus dem Citratzyklus aufrechterhalten^{45,46}.

Die mitochondriale Kreatinkinase katalysiert die Übertragung der energiereichen Phosphatbindung in ATP auf Kreatin zur Bildung von Phosphokreatin und ADP. Phosphokreatin diffundiert aus den Mitochondrien zu den Myofibrillen, wo die myofibrilläre Kreatinkinase die Neubildung von ATP aus Phosphokreatin katalysiert. Das freie Kreatin diffundiert anschließend zurück in die Mitochondrien. Das Kreatinkinasesystem fungiert somit als Energiepuffer. Wenn der Energiebedarf das Energieangebot übersteigt, sinkt der Phosphokreatinspiegel, wodurch das ATP auf einem normalen Niveau gehalten wird, während der freie ADP-Spiegel ansteigt. Übersteigt der Energiebedarf das Angebot hemmt der erhöhte Gehalt an freiem ADP die Funktion zahlreicher intrazellulärer Enzyme und führt zum Versagen des Kontraktionsmechanismus des Herzens³⁹.

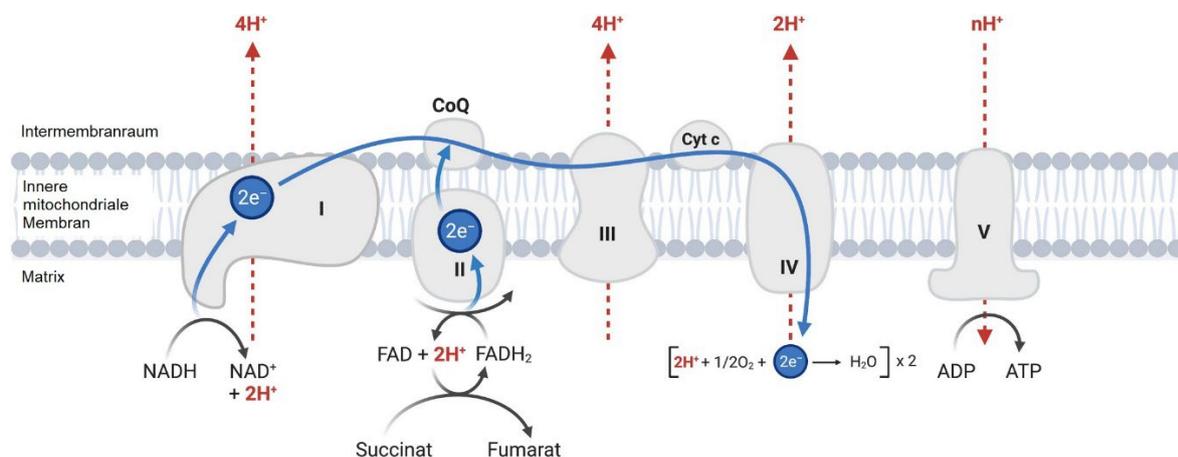


Abb. 4: Die mitochondriale Elektronentransportkette

Die Abb. zeigt die Elektronenübertragungswege (blau) und die Protonenverschiebung (rot) in der mitochondrialen ETC. Elektronen (e^-) werden durch NADH im Komplex I (NADH-Dehydrogenase) und FADH_2 aus der Succinat-Oxidation im Komplex II (Succinat-Dehydrogenase) in die ETC eingespeist. Die Elektronen werden dann von Coenzym Q (CoQ) auf den Komplex III (Cytochrom-c-Reduktase) und schließlich über Cytochrom c (Cyt c) auf den Komplex IV (Cytochrom-c-Oxydase) übertragen, wo sie zur Reduktion von Sauerstoff (O_2) zu Wasser (H_2O) verwendet werden. Durch die Übertragung von Elektronen in Verbindung mit der Verlagerung von Protonen (H^+) durch die innere mitochondriale Membran entsteht ein elektrochemischer Protonengradient, der die ATP-Synthese in Komplex V (F1-Fo-ATP-Synthase) antreibt. NAD/NADH, oxidiertes/reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid; FAD/FADH_2 , oxidiertes/reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid; ATP, Adenosintriphosphat. Reproduziert und übersetzt nach⁴⁷.

1.4.4 Mitochondriale Reaktive Sauerstoffspezies Produktion und Elimination

Die ETC hat keinen 100%-igen Wirkungsgrad. Elektronen können über die IMM in die Matrix entweichen und dort mit Sauerstoff (O_2) zu hochreaktiven freien Radikalen reagieren. Freie Radikale, wie Superoxid ($\bullet O^{2-}$) und das Produkt seiner Dismutation, Wasserstoffperoxid (H_2O_2), werden unter dem Begriff reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zusammengefasst. Die ETC gilt als Hauptquelle von ROS in Kardiomyozyten^{45,48}.

Pathologische Stimuli und Defekte der ETC, welche Veränderungen im mitochondrialen Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) hervorrufen, als auch ein geringer ATP-Bedarf, wodurch eine Anhäufung von Redoxäquivalenten den Rückfluss von Elektronen in der ETC begünstigen, erhöhen die Produktion von ROS. Die wesentlichen Orte der ROS-Bildung in Mitochondrien befinden sich an den Komplexen I und III der ETC, wo $\bullet O^{2-}$ durch das Übertragen eines Elektrons auf O_2 entstehen. Die Bildung von $\bullet O^{2-}$ wird durch die obigen, beschriebenen Prozesse begünstigt. Unter physiologischen Bedingungen wird $\bullet O^{2-}$ effizient durch die Mangan-abhängige Superoxid-Dismutase zu H_2O_2 umgewandelt. H_2O_2 wird anschließend durch die Glutathion-Peroxidase und Peroxiredoxin eliminiert⁴⁹. Diese Enzyme werden NADPH (Nicotamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) abhängig regeneriert. Das NADPH stammt dabei unter anderem aus enzymatischen Reaktionen, die ihre Substrate vom Citratzyklus beziehen (Isocitrat-Dehydrogenase, Malat-Dehydrogenase, Nikotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase [Nnt]). Somit ist der Citratzyklus nicht nur für die ATP-Produktion, sondern auch für die Regeneration der aktiven Formen der H_2O_2 -abbauenden Enzyme in der mitochondrialen Matrix und damit für die Abfangfunktion von ROS essenziell. Wird die Zellatmung unter Belastung durch ADP beschleunigt, werden NADH und die ETC stärker oxidiert, was die Produktion von $\bullet O^{2-}$ an der ETC verringert. Dies entzieht der Nnt NADH, welches die Nnt unter physiologischen Bedingungen zu NADPH umwandelt, um das antioxidative System zu speisen⁵⁰. Daher begrenzt die Oxidation von NADH die Regeneration von NADPH, wodurch die antioxidative Kapazität verringert wird (siehe Abb. 5). Übersteigt die ROS-Produktion die Entgiftungskapazität der Zelle, entsteht oxidativer Stress^{46,48,51}. Das Konzept des Redox-optimierten-ROS-Gleichgewichts von Aon et al. bietet einen Ansatz, der mitochondriale ROS-Produktion und -Eliminierung mit dem metabolischen Zustand einer Zelle in Einklang bringt⁵². Nach diesem Modell hält ein intermediärer Redox-Zustand mit geringer ROS-Produktion an der ETC, aber ausreichenden Mengen an

reduziertem NADPH zur Regeneration der H_2O_2 -eliminierenden Systeme, die letztlich mitochondriale H_2O_2 -Emission minimal. Extreme wie eine starke Reduktion oder starke Oxidation bewirken beide eine Netto-ROS-Emission; entweder, da die ROS-Produktion die antioxidative Kapazität überwiegt, oder durch das Erschöpfen der H_2O_2 -Abfangkapazität bei vergleichsweise niedriger ROS-Produktion. Dieses Redox-optimierte-ROS-Gleichgewicht unterstreicht die entscheidende Rolle von Ca^{2+} -induzierter Stimulation des Citratzyklus bei dynamischen Belastungsänderungen zur Aufrechterhaltung der mitochondrialen antioxidativen Kapazität^{28,48,53}.

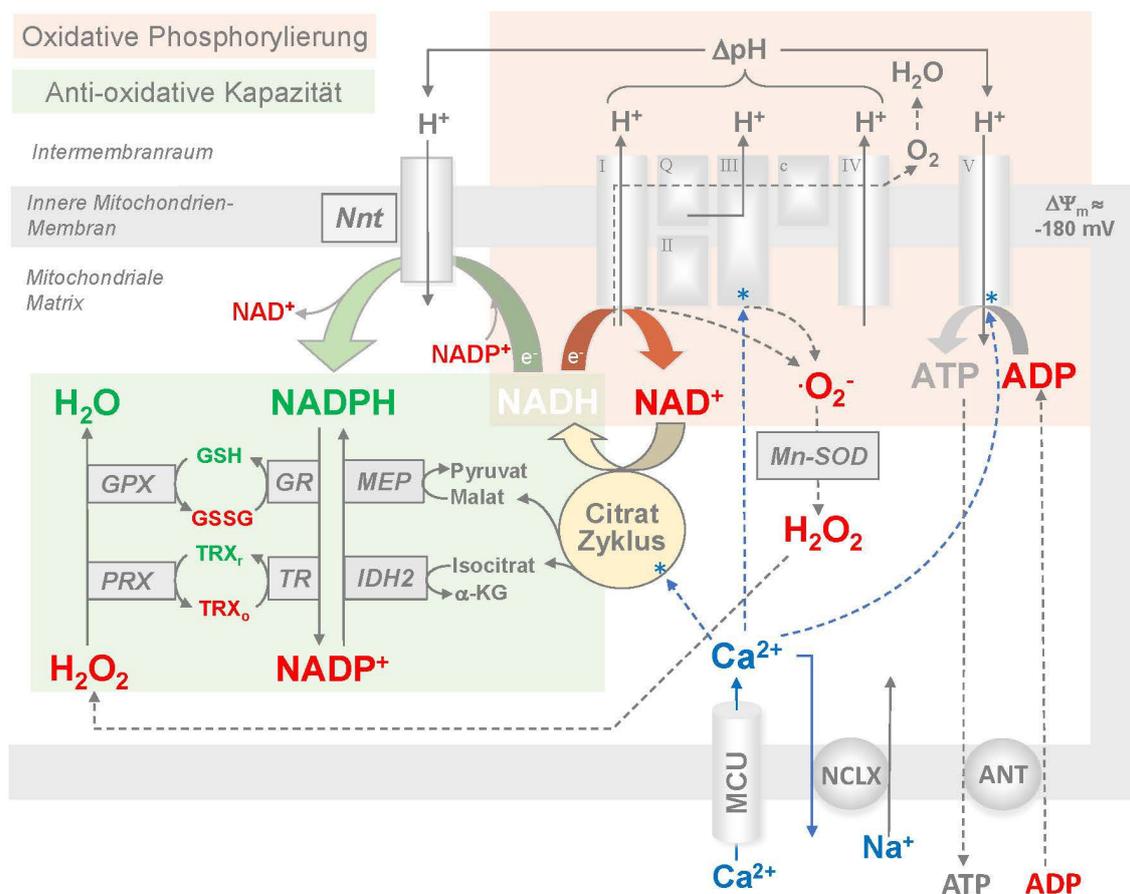


Abb. 5: Mitochondriale ROS-Produktion und -Elimination

* markiert Stellen der Ca^{2+} -induzierten Aktivierung. Nnt, Nikotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase; GPX, Glutathion Peroxidase; GR, Glutathion Reduktase; GSH und GSSG, reduziertes und oxydiertes Glutathion; PRX, Peroxisredoxin; TR, Thioredoxin Reduktase; TRX_r und TRX_o, reduziertes und oxydiertes Thioredoxin; MEP, Malatdehydrogenase; IDH2, Isocitratdehydrogenase Typ 2; e^- , Elektron; Mn-SOD, Mangan-abhängige Superoxiddismutase; MCU, Mitochondrialer Ca^{2+} -Uniporter; NCLX, mitochondrialer Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher; ANT, Adeninnukleotidaustauscher. Reproduziert und übersetzt mit Erlaubnis von Wolters Kluwer Health, Inc.³⁰.

1.4.5 Kardiale mechano-energetische-Kopplung

Bei körperlicher Anstrengung kann das Herz-Zeit-Volumen auf das 4- bis 6-fache gesteigert werden. Diese Anpassung wird weitgehend durch β -adrenerge Stimulation über das sympathische Nervensystem getragen. Die Aktivierung β -adrenerger Rezeptoren induziert die Phosphorylierung wichtiger Zielproteine über die Proteinkinase A. Phosphorylierung der LTCC und RyR2 erhöht den einwärtsgerichteten Ca^{2+} -Strom sowie die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Über die Phosphorylierung von Phospholamban wird die Hemmung der SERCA aufgehoben. Folglich wird die Amplitude der $[\text{Ca}^{2+}]_c$ -Transienten erhöht und die Ca^{2+} -Wiederaufnahme im SR beschleunigt. Insgesamt bewirkt damit die β -adrenerge Stimulation die Erhöhung der Herzfrequenz, die Steigerung der kontraktilen Kraft und die Beschleunigung der Relaxation - was als positive chronotrope, inotrope bzw. lusitrope Effekte bezeichnet wird^{54,55}.

Diese durch Sympathikus-Aktivierung induzierten Veränderungen der EC-Kopplung werden begleitet durch einen raschen Anstieg des ATP-Verbrauchs. Um die ATP-Produktion an die sich konstant ändernde Arbeitsbelastung des Herzens anzupassen, werden der mitochondriale Redoxstatus und der Elektronenfluss entlang der Atmungskette durch verschiedene Faktoren streng kontrolliert. Zwei der wichtigsten regulatorischen Faktoren in dieser Hinsicht sind Ca^{2+} und ADP. Das bei Herzmuskelarbeit anfallende ADP stimuliert an der F1/Fo-ATP-Synthase die ATP-Produktion und beschleunigt den Elektronenfluss entlang der ETC. Infolgedessen wird der Redoxstatus von mitochondrialem NADH und FADH_2 vorübergehend oxidiert. Gleichzeitig kommt es durch eine β -adrenerge Stimulation auch zu erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_c$ und einem Anstieg der mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme über den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter (MCU). In der Matrix stimuliert Ca^{2+} die Pyruvat-, α -Ketoglutarat- und Isocitrat-Dehydrogenasen zur Regeneration von NADH und FADH_2 , aber auch Komplex III der ETC und die F1/Fo-ATP-Synthase zur Steigerung des Elektronenflusses und der ATP-Synthese. Darüber hinaus sind die durch Ca^{2+} stimulierten Citratzyclusprodukte (Isocitrat, Malat und NADH) für die Regeneration von reduziertem NADPH erforderlich, welches die mitochondrialen H_2O_2 -Entgiftungssysteme in ihrer aktiven Form aufrechterhält (siehe Abb. 5).

Folglich wirken ADP und Ca^{2+} als komplementäre Regulatoren der oxidativen Phosphorylierung, welche die ATP-Regeneration effizient an den Energieverbrauch anpasst und somit ATP-Konzentrationen, den Redoxstatus und H_2O_2 -Elimination bei Anstieg der kardialen Arbeitslast weitgehend konstant halten^{28,48}. Jedoch ist es auch

allgemein anerkannt, dass eine mitochondriale Ca^{2+} -Überladung zu einer anhaltenden Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) führt. Die mPTP ist eine Pore in der IMM, welche die Freisetzung von Ionen und gelösten Stoffen aus der Mitochondrienmatrix ermöglicht, dadurch kollabiert das $\Delta\Psi_m$ und löst letztlich den programmierten Zelltod aus⁵⁶. Darüber hinaus fördert eine mitochondriale Ca^{2+} -Überladung eine übermäßige ROS-Produktion und oxidativen Stress⁵⁷.

1.4.6 Auswirkungen von oxidativem Stress auf das Herz

Oxidativer Stress wird mit der abnormalen Funktion intrazellulärer Organellen, einschließlich des SR und der Mitochondrien, in Verbindung gebracht⁵⁸.

Ist die mitochondriale O_2 -Verbrauchskapazität gestört, wird das $\Delta\Psi_m$ destabilisiert und die ATP-Produktion vermindert⁵⁹. Unzureichende ATP-Level in Kardiomyozyten vermindern die kontraktile Kapazität der Zelle durch die Beeinträchtigung der EC-Kopplung und stören die elektrische Erregungsleitung durch die Öffnung von sarkolemmalen, ATP-sensitiven K^+ -Kanälen⁴⁶. Diese Kanäle bilden so genannte „metabolische Senken“, in welchen Kardiomyozyten sich in einem nicht erregbaren Zustand befinden⁶⁰. Auch oxidativer Stress durch ROS führt über verschiedene Wege zu Repolarisations- und Leitungsanomalien, welche zu Herzrhythmusstörungen führen können⁵⁸. ROS können die Funktion wichtiger Ionenkanäle, wie RyR2, LTCC und NCX, direkt über Oxidation oder indirekt über Phosphorylierung durch Aktivierung von Proteinkinasen alterieren⁵⁷. Darüber hinaus beeinträchtigt oxidativer Stress die Gap-Junction-Leitfähigkeit, verringert die Cx43-Menge und stört damit die elektrische Kopplung zwischen den Kardiomyozyten^{61,62}. Durch Induktion von SR- Ca^{2+} -Freisetzungseignissen und Erhöhung des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels nimmt ROS ebenso Einfluss auf die Ca^{2+} -Homöostase⁶². Es konnte auch ein funktionaler Zusammenhang zwischen mitochondrialer Dysfunktion und dem fibrotischen Umbau des Herzens gefunden werden. Über die Relokalisation von Cx43-Hemikanälen und die Aktivierung von Pannexin-1-Kanälen durch ROS kann ATP in den extrazellulären Raum freigesetzt werden und nach Umwandlung in Adenosin über den Adenosin-2A-Rezeptor profibrotische Signalwege aktivieren^{63,64}. Weiterhin aktiviert $\bullet\text{O}_2^-$ die Expression des transformierenden Wachstumsfaktors (TGF)- β_1 , der die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten und die anschließende Ablagerung von extrazellulärer Matrix fördert⁶⁵.

1.5 Arrhythmogene Kardiomyopathie

1.5.1 Hintergründe und klinisches Bild

Die arrhythmogene Kardiomyopathie (ACM) ist eine lebensbedrohliche Herzmuskelerkrankung und eine der häufigsten Ursachen für den plötzlichen Herztod bei jungen, gesunden Jugendlichen und Erwachsenen⁶⁶⁻⁶⁹. Gemäß der WHO zählt die Erkrankung zu den primären Kardiomyopathien und wird in 30-50% der Fälle autosomal-dominant vererbt, wobei Penetranz und Expressivität stark variieren⁷⁰⁻⁷². Die Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung liegt zwischen 1:1000 und 1:5000, jedoch gehen Experten von einer hohen Dunkelziffer aus^{73,74}. Das klinische Spektrum der ACM ist variabel, zeichnet sich jedoch durch zwei Hauptproblematiken aus, die somit namensgebend für die Erkrankung waren: Zum einen führt ACM zu strukturellen Veränderungen des Myokards, welche vorwiegend im rechten Ventrikel beobachtet werden - jedoch auch den linken Ventrikel betreffen können. Zum anderen prägen ventrikuläre, lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen das Krankheitsbild⁶⁷.

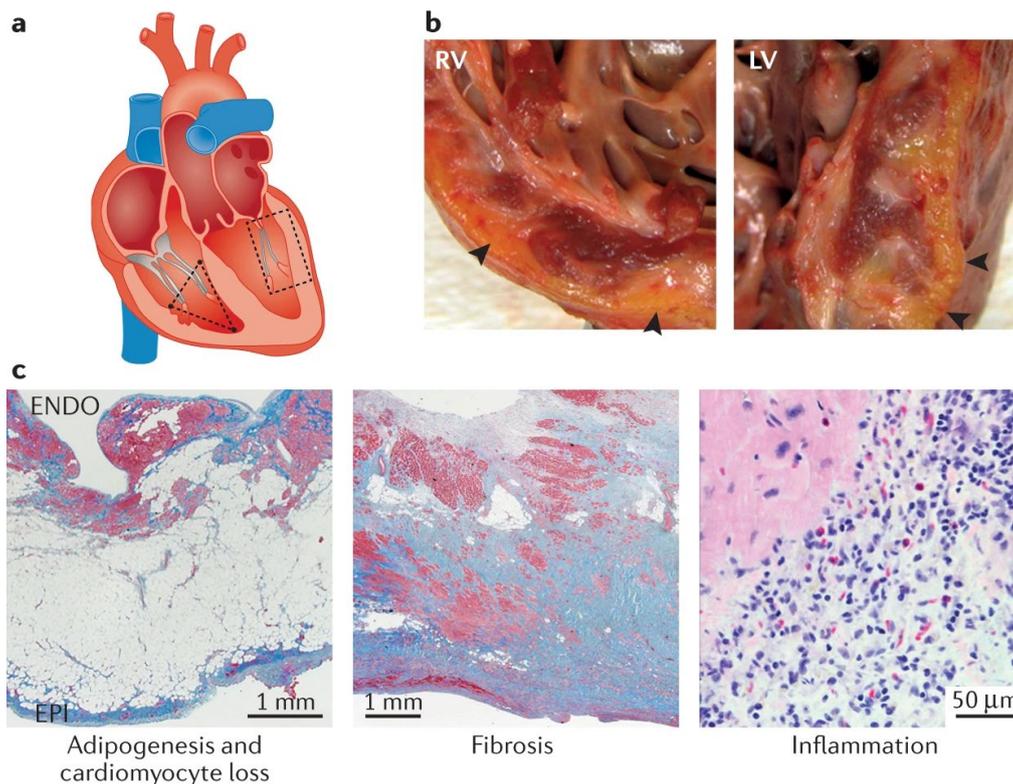


Abb. 6: Histologische Merkmale der ACM

A: Illustration der am häufigsten betroffenen ventrikulären Regionen. Die rechtsventrikuläre Erkrankung betrifft vor allem den Einstromtrakt, die Spitze und das Infundibulum, das so genannte Dysplasiedreieck (gestricheltes Dreieck). Bei der linksdominanten Erkrankung sind häufig die inferioren und inferolateralen Wände betroffen (gestricheltes Rechteck). **B:** Aufnahmen des rechten Ventrikels (RV) und des linken Ventrikels (LV) mit Hervorhebung der epikardialen Fettablagerungen (schwarze Pfeilspitzen). **C:** Histologische Merkmale der ACM einschließlich Adipogenese und Kardiomyozytensatz (links; Trichromfärbung), Fibrose (Mitte; Trichromfärbung) und Inflammation (rechts; Hämatoxylin- und Eosinfärbung). ENDO, Endokard; EPI, Epikard. Reproduziert mit Erlaubnis von Springer Nature⁷⁵.

Pathohistologisch zeigt sich ein progressiver Verlust von Herzmuskelzellen und deren Ersatz durch Fett- und Bindegewebe. Der Umbau beginnt typischerweise subepikardial und kann sich im Verlauf transmural ausdehnen (siehe Abb. 6). Makroskopisch imponiert ein dilatierter, ausgedünnter rechter Ventrikel mit Wandbewegungsstörungen und der Gefahr, Aneurysmata auszubilden^{67,70,76,77}.

Es wurden drei Phasen der ACM-Progression beschrieben³: (1) eine frühe, präklinische Phase, in der die Patienten asymptomatisch sind und subtile ventrikuläre Anomalien (Elektrokardiogramm-Veränderungen einschließlich T-Wellen-Inversionen) unbemerkt bleiben können, wenn kein hoher Verdachtsindex besteht⁷⁸; (2) eine desmaskierte Phase, in der sich Symptome ventrikulärer Arrhythmien (VA) entwickeln und (3) eine progressive Phase, die durch zunehmende kontraktile Dysfunktion im Verlauf zu einer biventrikulären Herzinsuffizienz führt^{3,79}. Elektrische Störungen der Impulserzeugung und -weiterleitung können zu jedem Zeitpunkt des Krankheitsverlaufs zu plötzlichem Herztod führen, wobei einigen Berichten zufolge sich ACM in bis zu 20-50 % der Fälle in Form von plötzlichem Herztod manifestiert⁸⁰. Problematisch ist, dass dies auch die präklinische Phase einschließt, in der Herzrhythmusstörungen und/oder SCD leider meist die erste Manifestation der Krankheit sind. Diese Herzrhythmusstörungen treten vor allem bei jungen, ansonsten gesunden Individuen unter körperlicher Belastung auf^{3,81-83}.

Da strukturelle und elektrokardiographische Veränderungen meist zuerst rechtsventrikulär auftreten, wurde die Erkrankung ursprünglich arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie genannt. Neben der klassischen rechtsdominanten Form wurden zunehmend linksdominante und biventrikuläre Formen beobachtet^{84,85}. Der allgemeiner gefasste Begriff der arrhythmogenen Kardiomyopathie spiegelt die Bandbreite der Phänotypen, die bei dieser Kardiomyopathie auftreten, besser wider und hat sich deshalb in neueren wissenschaftlichen Arbeiten weitestgehend durchgesetzt⁸⁶.

1.5.2 Grenzen von Diagnostik und Therapie

Wie der Name ACM schon sagt, wird der Phänotyp durch das Vorhandensein sowohl einer abnormen elektrischen (arrhythmogenen), als auch einer strukturellen (Kardiomyopathie) Komponente bestimmt. Leider gibt es keinen ausreichend sensitiven und spezifischen Test, der eine sichere Diagnosestellung der ACM erlaubt. Daher wurde 2010 eine Reihe spezifischer „Task-Force“-Kriterien für die ACM-Diagnose entwickelt. Diese umfassen Haupt- und Nebenkriterien in sechs Kategorien

(Depolarisations- und Repolarisationsanomalien, Arrhythmie, Bildgebung, Histologie und Familiengeschichte/Genetik), anhand derer eine sichere (definitive), eine wahrscheinliche (borderline) und eine mögliche (possible) ACM-Diagnose unterschieden werden⁸⁷. Diese umfassende diagnostische Bewertung von ACM ist komplex und zeitaufwändig und leider trotzdem oft zu spät, d.h. die Diagnosestellung erfolgt oft erst nach dem Auftreten lebensbedrohlicher Herzrhythmusstörungen (siehe Abb. 7)³.

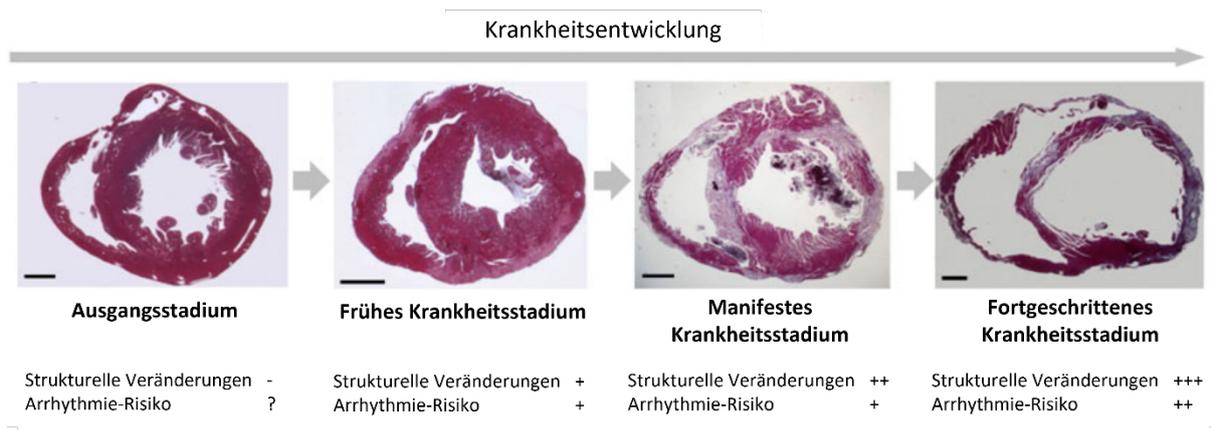


Abb. 7: Krankheitsentwicklung ACM

Überblick über die verschiedenen Stadien des Krankheitsverlaufs mit Schwerpunkt auf den strukturellen Umbau und den Folgen für das Arrhythmie-Risiko. Reproduziert und übersetzt mit Erlaubnis von Oxford University Press³.

Bis heute gibt es keine kurative Behandlung für ACM. Daher konzentrieren sich die derzeitigen Behandlungsstrategien auf die Linderung der Symptome, die Verlangsamung des Fortschreitens der Krankheit und SCD zu verhindern⁸⁸. Präventive Maßnahmen umfassen die Implantation eines Kardioverter-Defibrillators (ICD), regelmäßige Verlaufskontrollen sowie die Vermeidung größerer körperlicher Anstrengung. Zusätzlich kann eine medikamentöse Behandlung (Betablocker, Antiarrhythmika der Klasse III) aufgenommen werden, wobei diese in Studien - im Gegensatz zu einem ICD - bisher keinen Überlebensvorteil gezeigt haben^{89,90}. Im Spätstadium gehören medikamentöse Herzinsuffizienz-Behandlung und schließlich eine Herztransplantation zu Therapieoptionen³.

Die klinische Präsentation von ACM reicht von asymptomatischen Mutationsträgern über gering symptomatische Patienten bis hin zum plötzlichen Herztod^{91,92}. Infolgedessen haben viele Studien versucht, klinische Merkmale zu definieren, die ein frühes Arrhythmierisiko bestimmen. Dennoch erlaubt der heutige Stand der Wissenschaft noch keine optimale Risikostratifizierung, weshalb das therapeutische Vorgehen für leicht symptomatische Patienten bzw. für enge Familienangehörige und

asymptomatische Träger einer ACM assoziierten Mutation oft im Ermessen des behandelnden Arztes getroffen wird^{92,93}.

Zusammenfassend sind die diagnostischen, therapeutischen und prognostischen Möglichkeiten für Betroffene derzeit noch stark limitiert. Echte Fortschritte in Behandlungsstrategien werden nur durch ein besseres Verständnis der Krankheit zugrundeliegenden Pathomechanismen auf zellulärer Ebene möglich sein. Insbesondere die Aufklärung von Mechanismen, die bereits in der präklinischen Phase der Erkrankung in Erscheinung treten, kann der Identifizierung von Hochrisikopatienten dienen und womöglich zu präventiven Ansätzen für den weiteren Krankheitsfortschritt führen³.

1.6 Pathophysiologie der ACM

1.6.1 Genetische Grundlagen

ACM wurde erstmals 1982 durch Marcus et al. als „arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie“ beschrieben⁸¹. Seitdem ist bei der Mehrzahl der ACM-Patienten eine familiäre Vorgeschichte aufgedeckt worden und in etwa 60% der Patienten eine genetische Mutation nachgewiesen (Abb. 8). Bislang sind 25 Gene bekannt, die mit ACM assoziiert sind⁹⁴. Die Vererbung erfolgt meist autosomal-dominant, wobei die Penetranz und Expressivität der Erkrankung stark variieren⁹⁵. Darüber hinaus gibt es zwei Formen, die autosomal rezessiv sind: im Plakoglobin (*JUP*) verursacht eine homozygote Mutation die Naxos-Krankheit⁹⁶; im Desmoplakin (*DSP*) das Carvajal-Syndrom⁹⁷. Beide Erkrankungen weisen einen kardio-kutanen Phänotyp auf: neben ACM-Merkmalen sind Betroffene durch wolliges Haar und palmoplantare Keratodermie gekennzeichnet.

Für die autosomal-dominanten Formen wurden in genetischen Studien Mutationen in fast allen bekannten Komponenten des desmosomalen Komplexes festgestellt: Plakophilin-2 (*PKP2*), Desmoglein-2 (*DSG2*), Desmocollin-2 (*DSC2*), Plakoglobin (*JUP*) und Desmoplakin (*DSP*). Diese stellen mit circa 50% die weitaus größte Gruppe der pathogenen Mutationen dar^{98,99}. Darüber hinaus gibt es nicht-desmosomale Gene, die ebenfalls nachweislich ACM verursachen; hauptsächlich Gene, die für Komponenten Ca^{2+} -Signalübertragung, der Kernmembran und des Zytoskeletts kodieren (Abb. 8). Damit hat sich das Bild der ACM von einer Erkrankung der Desmosomen dahin verschoben, dass man heute eher von einer Störung der gesamten Glanzstreifen-Architektur ausgeht¹⁰⁰. Das genetische Screening wird durch

die unvollständige Krankheitspenetranz, variable Expressivität und das Vorhandensein mehrerer, potenziell pathogener Mutationen in einem oder mehreren Genen (d.h. compound und digenetische Heterozygotie) bei Personen mit ACM erschwert⁹⁵. Da wahrscheinlich noch nicht alle ursächlichen Mutationen bekannt sind, schließt ein negativer Gentest eine ACM nicht aus⁹¹. Ebenso muss sich bei unterschiedlichen Trägern der gleichen pathogenen Mutation die Erkrankung nicht bzw. nicht im gleichen Maße manifestieren. Ursachen für diese variable Penetranz und Expressivität sind noch nicht vollständig verstanden; diskutiert wird unter anderem körperliche Belastung sowie andere genetische Kofaktoren¹⁰¹.

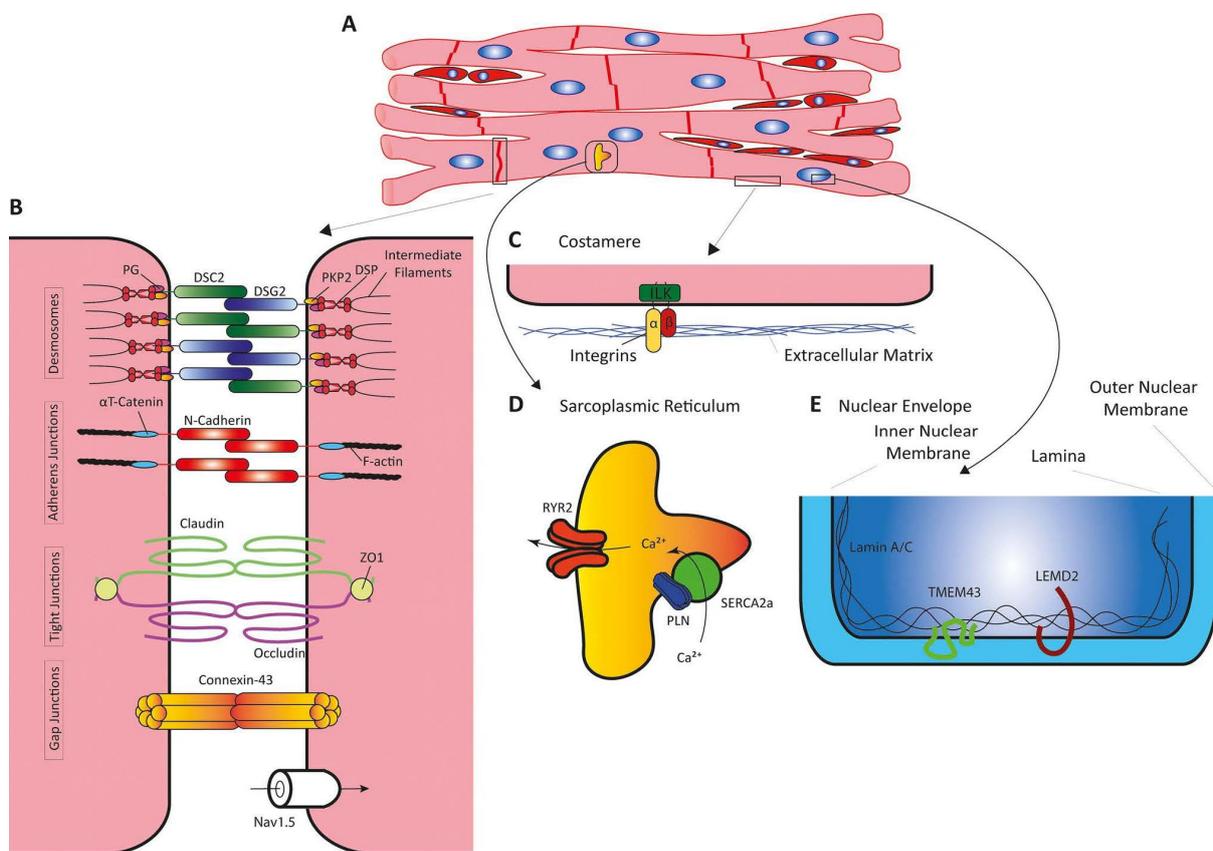


Abb. 8: Darstellung der mit ACM-assozierten Gene

A: Subzelluläre Lokalisation der an ACM beteiligten Proteine. Die Abb. zeigt schematisch an der ACM beteiligte Multiproteinkomplexe, die in den Glanzstreifen (B), in den Costameren (C), im sarkoplasmatischen Retikulum (D) oder in der Kernhülle (E) lokalisiert sind. DSC2, Desmuocollin-2; DSG2, Desmoglein-2; DSP, Desmoplakin; PG, Plakoglobin; PKP2: Plakophilin-2; ZO1, Zonula occludens-1; Nav1.5, Untereinheit- α 5 des spannungsgesteuerten Na^+ -Kanals; ILK, Integrin-linked Kinase; RYR2, Ryanodinrezeptor 2; PLN, Phospholamban; SERCA2a, SR- Ca^{2+} -ATPase 2a; TMEM43, Transmembranprotein 43; LEMD2, LEM Domain Nuclear Envelope Protein 2. Reproduziert nach⁹⁴.

1.6.2 Mögliche Pathomechanismen der ACM

Mehrere molekulare und zelluläre Mechanismen werden zur Erklärung der Pathogenese von ACM diskutiert. Die postulierten Hypothesen beruhen weitgehend auf Erkenntnissen in experimentellen PKP2-Modellen, die natürlich nicht repräsentativ für die gesamte ACM-Population sind, weshalb Extrapolationen mit Vorsicht zu genießen sind. Kardiale Fibrose und Entzündung, sowie Untergang von Kardiomyozyten, sind typische Merkmale der ACM⁹⁴.

Das Herz reagiert auf Verletzungen meist mit Fibrose-Bildung. Das Fortschreiten der Fibrose kann jedoch zu einer flächigen Narbenbildung führen und dadurch die Compliance und Kontraktilität des Myokards beeinträchtigen¹⁰². Für ACM sind verschiedene potenzielle pro-fibrotische Auslöser identifiziert worden. Genetische Defekte der kardialen Desmosomen führen zu einer erhöhten strukturellen Fragilität. In Kombination mit mechanischem Stress bei körperlicher Betätigung kann dies zu einer Verletzung der Kardiomyozyten beitragen und pro-fibrotische, sowie pro-entzündliche Prozesse aktivieren¹⁰³. Darüber hinaus wird vermutet, dass es über Hemmung des Wnt-Signalweges zu pro-fibrotischen, pro-adipogenen und pro-apoptotischen Veränderungen der Genexpression bei der ACM kommt⁷⁵. Diese Hemmung wurde in Studien in Zusammenhang mit einer abnormalen nukleären Lokalisierung von Plakoglobin (PG) gebracht¹⁰⁴. Alternative pro-fibrotische Pathomechanismen sind die Aktivierung des Hippo-Signalweges¹⁰⁵ und des transformierenden Wachstumsfaktors $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)^{106,107}.

Studien an Herzgewebe von ACM-Patienten, in denen Immunzellinfiltrate und die Freisetzung entzündungsfördernder Zytokine nachgewiesen wurden, deuten darauf hin, dass chronische Inflammation eine Rolle im Krankheitsprozess spielen könnte¹⁰⁸. Ob die Entzündung des Herzmuskels die Fibrose und den fibrös-fettigen Ersatz fördert, oder ob sie nur ein Nebeneffekt ist und dem Absterben der Kardiomyozyten unterliegt, bleibt umstritten⁹⁴. In Mausmodellen von ACM wurden zudem die Aktivierung des pro-inflammatorischen Nuklearfaktor- κB (NF- κB)-Signalweges sowie Autoimmunität als Ursache für das Fortschreiten der Krankheit vermutet^{109,110}.

Ein weiteres Hauptmerkmal der ACM sind lebensbedrohliche Arrhythmien und plötzlicher Herztod. Es wurde vermutet, dass Arrhythmien eine Folge von Reentry-Mechanismen um anatomische Hindernisse herum sind, die durch den flächigen Verlust von Kardiomyozyten und die fibrös-fettige Infiltration entstehen^{80,95,111}. Dies kann zwar nicht ausgeschlossen werden, aber es ist inzwischen klar, dass lebensbedrohliche ventrikuläre Arrhythmien häufig in der Frühphase der Erkrankung

aufzutreten, bevor ein sichtbarer struktureller Schaden festgestellt werden kann⁹³. Daher hat sich der wissenschaftliche Fokus in den letzten Jahren zunehmend auf molekulare Pathomechanismen gerichtet. Durch das wachsende Verständnis der Glanzstreifen als molekulare Multifunktionskomplexe, kommen verschiedene Protein-Wechselwirkungen in Frage, die gemeinsam die elektrische Erregungsausbreitung und die mechanische Kraft regulieren und somit Ursprung der Arrhythmie-Neigung sein könnten⁹⁵.

Eine der ersten mit ACM assoziierten molekularen Interaktionen ist der Umbau von spannungsgesteuerten Natriumkanälen (Nav1.5). Diese sind wie in 1.2 beschrieben bevorzugt an kardialen Glanzstreifen lokalisiert (siehe Abb. 1). Eine gestörte Desmosomen-Struktur wurde mit einer reduzierter Nav1.5-Expression, einer eingeschränkten Natriumstromdichte sowie einer Veränderung des Öffnungsverhaltens und der Lokalisation in Zusammenhang gebracht¹¹²⁻¹¹⁷. Weiterhin konnte der Umbau von Cx43, was Teil der Gap Junctions ist (siehe 1.2.1), beobachtet werden. Studien an menschlichem Herzgewebe und an Mausmodellen für ACM, zeigten eine verringerte Cx43-Expression und eine abweichende Lokalisierung¹¹⁶⁻¹²¹. Dies beeinträchtigt die Zell-Zell-Kopplung und die Interaktion mit benachbarten Ionenkanälen¹²². Die beschriebenen Veränderungen von Nav1.5 und Cx43 könnten die interzelluläre Erregungsausbreitung verlangsamen, was die Entstehung kreisender Erregungen begünstigt⁹⁵. Darüber hinaus wurde vorgeschlagen, dass Veränderungen in der Ca^{2+} -Homöostase über frühe und späte Nachdepolarisationsereignisse, die auf eine Ca^{2+} -Überladung des SR zurückzuführen sind, zur Arrhythmiebelastung beitragen¹²³. Die beschriebenen Veränderungen gehen strukturellen Veränderungen voraus und sind daher potenzielle Auslöser für Arrhythmien in der frühen Phase der Erkrankung⁹⁵. Es ist jedoch anzunehmen, dass noch zusätzliche elektrophysiologische Faktoren zur Arrhythmogenese beitragen, die noch nicht oder nur unzureichend verstanden sind.

Es ist bekannt, dass eine mitochondriale Ca^{2+} -Überladung unter pathologischen Bedingungen die mitochondriale Funktion negativ beeinflussen sowie zur verstärkten Produktion von ROS führen¹²⁴. In diesem Zusammenhang konnte in PKP2-defizienten Mäusen eine erhöhte mitochondriale Ca^{2+} -Akkumulation festgestellt werden¹²¹. Da bereits im Rahmen von Herzinsuffizienz sowie anderen Kardiomyopathien eine metabolische Störung einhergehend mit einem Energiedefizit und oxidativen Stress festgestellt werden konnte^{125,126}, rückte der Zusammenhang einer mitochondrialen Dysfunktion und ACM ins Interesse der Forschung⁵⁷. Mitochondrien sind zur

Aufrechterhaltung des Energiebedarfs und damit auch der elektrischen Aktivität und Kontraktion der Kardiomyozyten nötig. Ein veränderter Energiestoffwechsel und ein mitochondriales Ungleichgewicht könnten zu erhöhtem oxidativem Stress führen. Oxidativer Stress beeinflusst nachweislich den intrazellulären Ca^{2+} -Haushalt und verursacht induzierten Zelltod sowie Fibrose¹²⁶ – wichtige Elemente des strukturellen Umbaus von ACM-Herzen⁵⁷. Mitochondrien-bezogene Veränderungen wurden bereits in Modellen mit PKP2- und Desmoglein 2-Dysfunktion nachgewiesen¹²⁷⁻¹²⁹. Eine metabolische und mitochondriale Dysfunktion als Substrate für elektrische und strukturelle Veränderungen bei ACM-Patienten bleiben aufgrund der begrenzten Menge an experimentellen Beweisen bislang Spekulation und müssen in weiteren Studien untersucht werden.

Die molekularen Zusammenhänge zwischen Desmosomen-Mutationen und den pathologischen Merkmalen der ACM - Verlust von Kardiomyozyten, Fibrose, Adipogenese, Entzündung und Arrhythmogenese - werden derzeit aktiv untersucht, sind aber noch nicht ausreichend erforscht. Um Frühstadien der ACM-Erkrankung zu erkennen und potenziell ein Fortschreiten zu verhindern, ist weitere Forschung an den Pathomechanismen der Erkrankung erforderlich.

1.7 PKP2-Mutation – Stand der Forschung

30-40% der Genotyp-positiven Fälle von ACM sind auf pathogene Varianten von *PKP2* zurückzuführen¹³⁰. Bislang konnten 25 unterschiedliche, heterozygote Mutationen im *PKP2* Gen bei ACM-Patienten identifiziert werden. Dabei handelt es sich größtenteils um Basendeletionen, die zum Abbruch des Proteins und damit Funktionsverlust führen (Loss-of-Function-Mutation)¹³¹. Darüber hinaus sind *PKP2*-Mutationen bei Betroffenen einer familiären ACM der häufigste Gendefekt¹³². Plakophilin-2 (PKP2) gehört zu der Armadillo-Protein-Familie. Armadillo-Proteine zeichnen sich durch Repeats aus, die aus drei α -Helices bestehen. Mehrere Repeats bilden wiederum eine Domäne (siehe Abb. 9), welche eine vielseitige Plattform für Interaktionen mit Proteinpartnern darstellt¹³³.

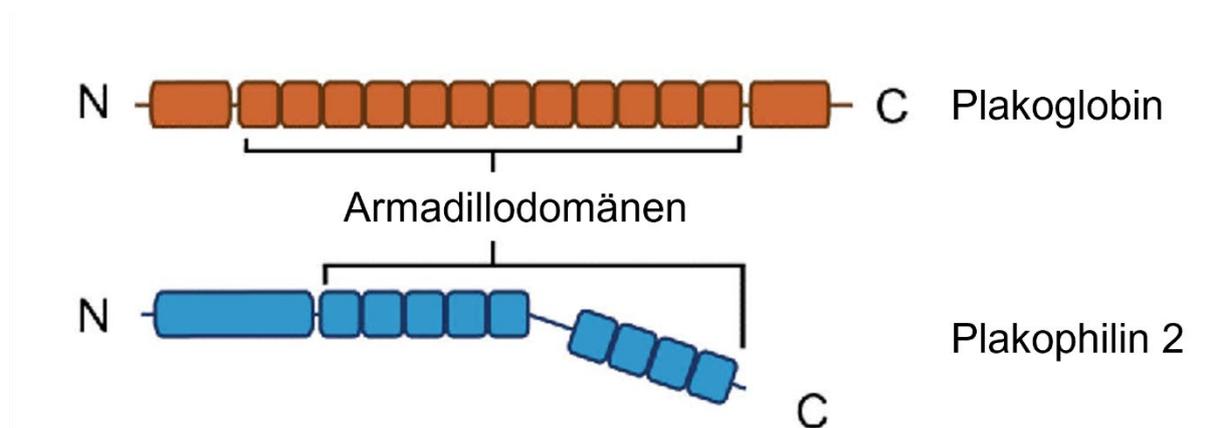


Abb. 9: Schematischer Aufbau von Plakoglobin und Plakophilin 2

Reproduziert und übersetzt mit Erlaubnis von Elsevier¹³⁴.

PKP2 ist hauptsächlich für seine mechanischen Funktionen bekannt: Es sorgt für die laterale Stabilisierungskraft, die zusammen mit dem desmosomalen Intermediärfilament die Adhäsion von Zelle zu Zelle erleichtert¹³⁵. Diese Definition wurde jedoch in den letzten Jahren revidiert, um die vielfältige Rolle dieses Proteins zu berücksichtigen: Neben der Zelladhäsion ist es auch für die Regulierung mehrerer molekularer Signalwege verantwortlich⁹⁵.

PKP2 scheint direkten Einfluss auf das am Glanzstreifen lokalisierte Protein Nav1.5, die porenbildende Einheit des spannungsabhängigen Na^+ -Kanals, zu nehmen. Die Arbeitsgruppe von Delmar beschrieb erstmals eine Kolo-kalisation der beiden Proteine^{112,136}. Darüber hinaus sank bei neonatalen Rattenkardiomyozyten mit PKP2-Knockdown der über diesen Kanal verlaufende Na^+ -Strom (INa) signifikant¹¹². Dies konnte auch in Kardiomyozyten aus HL-1-KD-Mäusen und aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) eines Patienten mit PKP2-Mangel beobachtet werden¹¹³. Weiterhin zeigten Cerrone et al. in einem Mausmodell mit *PKP2*-

Haploinsuffizienz ein verändertes Öffnungsverhalten des Nav1.5: Verlust der *PKP2*-Expression führte zu einer früheren Inaktivierung und verzögerten Reaktivierbarkeit des Na⁺-Kanals¹¹². Auch in menschlichen Gewebeproben von ACM-Patienten mit *PKP2*-Varianten wurde eine Verringerung der Nav1.5-Expression festgestellt¹¹⁶.

Zwischen *PKP2* und Gap Junctions konnten mittlerweile enge Wechselwirkungen gezeigt werden. *PKP2* und das Gap-Junction-Protein Cx43 koexistieren in demselben makromolekularen Komplex^{137,138}. Die Beziehung zwischen diesen beiden Molekülen scheint sich auch auf die funktionelle Ebene auszudehnen, da eine Ausschaltung der *PKP2*-Expression in ventrikulären Kardiomyozyten zu einer Verringerung der Cx43-Menge an den Glanzstreifen und dessen Umverteilung ins Zytoplasma führt¹²⁰. Wegen dieser sowohl räumlich als auch funktionell engen Beziehung der beiden Proteine wird der Proteinkomplex auch als „Connexom“ bezeichnet¹³⁹. Cx43-Hemikanäle im Perinexus (außerhalb der Gap Junctions) der Kardiomyozyten aufgrund von *PKP2*-Mangel werden als wichtige arrhythmogene Substrate beschrieben¹²¹.

Elektrophysiologische Untersuchungen in *PKP2*-defizienten-Kardiomyozyten-Monolayern wiesen eine Verlangsamung der Ausbreitung des Aktionspotentials nach, welche möglicherweise auf die verringerte elektrische Kopplung über Cx43 als auch auf den verringerten Na⁺-Strom zurückzuführen sein könnte¹¹². Eine heterogene Leitfähigkeit wiederum fördert über Reentry-Mechanismen die Entstehung von Arrhythmien¹⁴⁰.

In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass *PKP2* auch auf die Ca²⁺-Homöostase Einfluss nimmt^{121,123,127,141-143}. In dem von Cerrone et al. entwickelten induzierten, konditionalen *PKP2*-Knock-out-Mausmodell (*PKP2cKO*), zeigten Analysen verminderte Transkripte und Proteinlevel von Komponenten des Ca²⁺-Signalwegs. Funktionelle Untersuchungen der *PKP2cKO*-Kardiomyozyten ergaben einen Anstieg der Ca²⁺-Amplitude, eine verlangsamte Ca²⁺-Kinetik sowie ein verlängertes Aktionspotenzial. Außerdem konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass ein *PKP2*-Verlust zu frühen und späten Nachpolarisationen führt, welche womöglich für ventrikuläre Arrhythmien prädisponieren¹²³. Die zellulären Arrhythmien standen im Zusammenhang mit vermehrten RyR2-abhängigen Ca²⁺-Freisetzungseignissen („Sparks“) und konnten durch die Behandlung mit Flecanid, ein Wirkstoff, der den Ca²⁺-Ausfluss über RyR2-Kanäle limitiert, wirksam reduziert werden. Die beschriebenen Ca²⁺-Veränderungen traten noch vor offenkundiger struktureller Kardiomyopathie auf¹²³. Weitere Studien an diesem Modell wiesen eine Ca²⁺-Akkumulation in drei intrazellulären Kompartimenten (dem SR, dem Zytoplasma und den Mitochondrien)

nach¹²¹, wodurch womöglich eine Grundlage für Arrhythmie-Anfälligkeit, kardialem Remodeling und Beeinträchtigung der Kontraktilität geschaffen wird. Separate Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten des rechten und linken Ventrikels von PKP2cKO-Mäusen präzisierten, dass die Ca^{2+} -Dysregulation rechtsventrikulär-dominant auftrat und wiesen eine erhöhte Membranpermeabilität durch PKP2-Verlust nach. Beides konnte durch Ablation von Cx43 gemildert und durch Proteinkinase-C-Inhibitoren unterdrückt werden, sodass man von einer Cx43-abhängigen Erhöhung der Membranpermeabilität ausgeht^{57,121}. Körperliche Belastung verstärkte den Phänotyp in PKP2cKO-Mäusen^{141,144}. Die Übertragung dieser Ergebnisse auf den Menschen wurde in einem Computermodell verifiziert¹⁴⁵.

Wie bereits beschrieben stellt eine mitochondriale Dysfunktion einen weiteren potenziellen Pathomechanismus der ACM dar. In iPSC-Kardiomyozyten von Patienten mit einer *PKP2*-Mutation (PKP2iPSC-CMs) führte eine pathogene Koaktivierung von den Transkriptionsfaktoren PPAR γ und PPAR α (Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren) zu Lipogenese, Apoptose und einem insgesamt verminderten Energiestoffwechsel mit Verlagerung des Metabolismus zu einer dominanten Glucoseverwertung¹²⁷. Ein solcher metabolischer Shift der dominanten Substratoxidation von Fettsäuren auf Glukose wird auch in dem so genannten „Burnout“-Zustand des Herzens im Rahmen von Herzinsuffizienz beobachtet. Die hieraus resultierende geschrumpfte Energiebereitstellung fördert die Bildung von ROS^{38,43,146}. Als indirektes Zeichen pathogener ROS-Bildung in PKP2iPSC-CMs konnte die Gabe von Antioxidantien den Zelltod der CMs verhindern¹²⁷. Die Beteiligung von PPARs an einer PKP2-bezogenen Kardiomyopathie wurde im PKP2cKO-Mausmodell bestätigt¹²³. Analysen rechtsventrikulärer Biopsien von ACM-Patienten mit *PKP2*-Mutation zeigten eine verminderte Transkription von Genen, die für Proteine der ETC kodieren, sowie eine erhöhte Transkription von Genen, welche für Proteine der antioxidativen Kapazität kodieren. In dieser Studie konnte außerdem in den bereits erwähnten PKP2cKO-Mäusen eine eingeschränkte mitochondriale Atmung mit erhöhtem Protonenleck festgestellt werden. Sowohl in PKP2cKO-Kardiomyozyten als auch in iPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten mit *PKP2*-Deletion fanden sich erhöhte ROS-Level, welche im Fall der iPSC-Kardiomyozyten eine parakrine ROS-Freisetzung in gesunden Nachbarzellen verursachten. Dieser Effekt konnte durch Ko-Inkubation mit Katalase, welche H_2O_2 zu H_2O umsetzt, abgeschwächt werden¹²⁸.

1.8 JUP-Mutation – Stand der Forschung

Plakoglobin (PG), das von *JUP* („junctionales Plakoglobin“) Gen kodiert wird und auch als γ -Catenin bekannt ist, ist ein weiteres Armadillo-Protein, das ACM verursachen kann¹⁴⁷. Es kommt sowohl in Desmosomen als auch in den Adherens Junctions vor¹⁴⁸. Mutationen in *JUP* sind jedoch seltener und werden normalerweise rezessiv in homozygoter oder compound heterozygoter Form vererbt. Neben der Kardiomyopathie verursachen *JUP*-Mutationen als sogenannte Naxos-Krankheit auch einen typischen Haut- und Haarphänotyp wie in 1.6.1 beschrieben^{96,149}.

Studien zeigten, dass die Ausschaltung von Desmoplakin (DSP) in kultivierten Kardiomyozyten die Desmosomen destabilisiert, was die Freisetzung von PG und seine Verlagerung in den Zellkern verursacht¹⁰⁴. Dort konkurriert es mit β -Catenin um die Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors TCF/LEF1. Der endgültige Effekt des Ungleichgewichts zwischen PG und β -Catenin führt zu einer Suppression des Wnt-Signalwegs. Die Unterdrückung der kanonischen Wnt-Signalübertragung wird mit Adipogenese, Fibrogenese und Apoptose in Verbindung gebracht⁷⁵. Folglich zeigten DSP-defiziente Kardiomyozyten eine signifikante Hochregulierung der adipogenen Gene PPAR γ und CCAAT Enhancer-binding Protein (C/EBP) sowie der Fibrose-fördernden Gene Col1a1, Col1a2 und Col3a1¹⁰⁴. Die Anreicherung von mutiertem PG im Zellkern im Zusammenhang mit der Unterdrückung des Wnt-Signalwegs wurde auch in einem späteren Mausmodell gezeigt, in dem *JUP* eine Trunkierungsmutation trägt¹⁵⁰. Im Einklang mit diesen Erkenntnissen stehen auch Ergebnisse isolierter, kardialer Mesenchymal-Zellen von ACM-Patienten¹⁵¹.

Li et al. 2011 generierten ein konditional, herzspezifisches PG-Knockout-Mausmodell mit Deletion von Exon 3-5 des *JUP*-Gens in der späten Perinatalphase. Mutierte Mäuse rekapitulierten weitgehend die klinische Manifestation von ACM: ventrikuläre Dilatation und Aneurysma, kardiale Fibrose, kardiale Dysfunktion und spontane ventrikuläre Arrhythmien. Ultrastrukturelle Analysen ergaben, dass in den *JUP*-defizienten Myokardien Desmosomen fehlten, während die Struktur der Adherens Junctions und Gap Junctions (insbesondere Cx43) erhalten waren. Ventrikuläre Arrhythmien gingen mit fortschreitender Fibrose einher und es wurde massiver Zelltod beobachtet. Interessanterweise wurde laut dieser Studie der Zelltod in *JUP*-mutierten Herzen eher extrinsisch als intrinsisch über den mitochondrialen Weg ausgelöst. In der Folge fanden sich vermehrt Makrophagen und Neutrophile in mutierten Herzen und die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1b und IL-6 war signifikant erhöht. Im frühen Krankheitsstadium war die durch TGF β (Transforming growth factor)

vermittelte Signalübertragung in den *JUP*-mutierten Kardiomyozyten signifikant erhöht, was die Autoren auf den erhöhten mechanischen Stress in der Myokardwand zurückführten¹⁵². Es ist gut dokumentiert, dass der TGF β -Signalweg den Zelltod von Kardiomyozyten, einschließlich Apoptose und Nekrose, reguliert, zusätzlich zu seinem maßgeblichen Einfluss auf die kardiale Fibrose und Hypertrophie^{153,154}.

Li et al. 2011 charakterisierten ebenfalls einen induzierbaren und damit zeitgesteuerten Knockout von *JUP* in Mäusen. Diese Tiere rekapitulierten fünf Monate nach Induktion ACM-Charakteristika. Neben einer veränderten Desmosomen-Struktur konnten in diesem Modell verminderte Cx43-haltige Gap Junction Plaques festgestellt werden. Trotz des Gap Junction Remodeling waren die mutierten Herzen refraktär gegenüber induzierten Arrhythmien. Auf ultrastruktureller Ebene erschienen die Sarkomere der Plakoglobin-defizienten Mäuse verzerrt und komprimiert. Diese Sarkomerdefekte, die vermutlich eine veränderte Verankerung der Myofibrillen an der Plasmamembran widerspiegeln, legen nahe, dass PG und das Desmosom eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung der Myofibrillen spielen¹⁵⁵.

Kürzlich wurde ein Zebrafisch-ACM-Modell mit der Kardiomyozyten-spezifischen Expression der menschlichen c.2057del2-Mutation im *JUP*-Gen geschaffen. Die Tiere zeigten eine Verringerung der I_{Na}- und I_{K1}-Stromdichten sowie Unterbrechungen der Zell-Zell-Grenzen und strukturelle Unordnung. Ein High-Throughput-Screening identifizierte die Substanz SB216763 (SB2) als Suppressor des Krankheitsphänotyps¹⁵⁶. SB2 wird als Inhibitor von GSK3 β beschrieben, wodurch die kanonische Wnt-Signalgebung verstärkt wird¹⁵⁷. SB2 führte auch in neonatalen ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte, die dieselbe *JUP*-Mutation exprimierten, und in Kardiomyozyten, die aus induzierten pluripotenten Stammzellen von Patienten mit ACM hergestellt wurden, zu einer Umkehr der ACM-Merkmale¹⁵⁶. Die Folgestudie bestätigten diese Resultate *in vivo* in einer transgenen Mauslinie mit Kardiomyozyten-spezifischer Expression von *JUP* mit der 21del2-PLK-Mutation, welche bei der Naxos-Krankheit gefunden wurde. Mit SB2 behandelte mutierte Mäuse zeigten eine Verbesserung der ventrikulären Ektopie, der linksventrikulären Funktion, der myokardialen Fibrose und Entzündung sowie eine Normalisierung der Proteinverteilung der Glanzstreifen¹⁵⁸.

1.9 Charakterisierung der verwendeten Mausmodelle

PKP2 und PG wurde an einem herzspezifischen, konditionellen Knockout im Mausmodell untersucht.

Im juvenilen Mäuseherz rekapitulierten PKP2 KO und PG KO typische strukturelle, histopathologische und funktionelle Manifestationen von ACM. Dies wird durch unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Gerull belegt und in dieser Doktorarbeit dargestellt.

Die globale Herzarchitektur wurde *ex vivo* anhand von mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten transversalen Schnitten explantierter Herzen bestimmt. Fibrose wurde mit der Picrosirius-Rot-Färbung nachgewiesen. Histologische Analysen zeigten in beiden Knockout-Linien den Verlust von Kardiomyozyten und eine progressive Fibrose im Herzen, die den rechten Ventrikel stärker betraf als den linken Ventrikel. In PKP2 KO- Herzen zeigten sich beginnend mit vier Wochen fokale Bereiche des Kardiomyozytenverlusts und eine flächige Kollagenablagerung, welche nach acht Wochen stärker ausgeprägt waren und im rechten Ventrikel dominierten. PG KO- Herzen wiesen bereits im Alter von sechs Wochen massive fibrotische Infiltrate auf, die sich netzartig durch das Myokard zogen und im rechten Ventrikel stärker ausgeprägt waren.

Die Herzfunktion wurde *in vivo* unter Anästhesie mittels transthorakaler Echokardiographie von Dr. rer. nat. Paula Arias evaluiert. Die Echokardiographie der PKP2 KO- Herzen zeigte, dass eine linksventrikuläre (LV) und rechtsventrikuläre (RV) Dysfunktion bereits im Alter von vier Wochen vorhanden war, wohingegen offensichtliche strukturelle Veränderungen, wie ein vergrößerter linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser und eine Ausdünnung der rechtsventrikulären enddiastolischen freien Wand, erst im Alter von acht Wochen beobachtet wurden. Analog dazu wiesen PG-KO-Mäuse bereits im Alter von drei Wochen eine LV- und RV- Dysfunktion auf, dessen progressiver Verlauf sich in sechs Wochen alten PG KO- Mäusen bestätigte.

Trotz der fortschreitenden kardialen Dysfunktion konnten in beiden Mausmodellen *in vivo* keine schwerwiegenden arrhythmischen Ereignisse beobachtet werden. Innerhalb des untersuchten Zeitrahmens (PKP2: zwölf Wochen; PG: sechs Wochen) wurde keine vorzeitige Sterblichkeit festgestellt.

1.10 Fragestellung und Zielsetzung

ACM ist eine familiäre Erkrankung, die klinisch durch fibrofettigen Ersatz von Herzmuskelgewebe, kardialer Dysfunktion und Herzrhythmusstörungen geprägt ist. Die meisten Gene, die mit ACM in Verbindung stehen, kodieren für Komponenten des Desmosoms; darunter Plakophilin-2 (PKP2) und Plakoglobin (PG). Es wird immer deutlicher, dass pathogene Varianten in desmosomalen Genen nicht nur für eine mechanische Dysfunktion der Glanzstreifen verantwortlich sind, sondern auch über transkriptionelle und molekulare Interaktionen Einfluss auf den ACM-Phänotyp nehmen⁹⁵. Ein gesteigertes Verständnis der Pathophysiologie der ACM ist für die Weiterentwicklung von Diagnostik und Therapie unabdingbar. In dieser Arbeit sollen die Auswirkungen des Kardiomyozyten-spezifischen Verlustes von PKP2 oder PG in Mäusen untersucht werden.

Eine Reihe von Studien konnte den Einfluss von PKP2 auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase nachweisen^{121,123,141}, wohingegen die Verbindung zwischen PG und Ca^{2+} noch nicht erforscht wurde. In Kardiomyozyten setzt Ca^{2+} die Zellerregung in eine Zellkontraktion über den Prozess der EC-Kopplung um. Abweichungen des intrazellulären Ca^{2+} nehmen dementsprechend direkt Einfluss auf die zelluläre Kontraktilität³⁰. Es ist ungeklärt, ob die für ACM *in vivo* beobachtete kardiale Dysfunktion auch auf der Einzelzellebene auftritt. In der vorliegenden Forschungsarbeit wurden deshalb die Auswirkungen eines Kardiomyozyten-spezifischen Knockouts von PKP2 oder PG auf die EC-Kopplung der Kardiomyozyten untersucht. Mittels funktioneller Experimente an isolierten, arbeitenden Kardiomyozyten wurden die Kontraktilität und der intrazelluläre Ca^{2+} -Haushalt dynamisch beurteilt.

Ca^{2+} spielt aber auch eine zentrale Rolle bei der Verknüpfung der Mechanik mit der Energetik von Kardiomyozyten³⁰. Eine Schädigung und Dysfunktion von Mitochondrien durch einen veränderten Ca^{2+} -Haushalt und eine verstärkte Produktion von ROS wurden im Rahmen der ACM bereits in einigen Studien diskutiert^{57,127-129}. Inwiefern eine mitochondriale Dysfunktion bei der ACM-Pathogenese eine Rolle spielt, ist allerdings nicht weiter erforscht. Daher zielt die vorliegende Arbeit darauf ab, die mitochondriale Funktion in PKP2-KO und PG-KO Linien zu untersuchen. Hierzu wurden Experimente in isolierten kardialen Mitochondrien und in arbeitenden Kardiomyozyten durchgeführt um die Funktion der ETC und des Citratzyklus, sowie die ROS-Produktion und -Elimination zu beurteilen.

Ein weiteres Kennzeichen von ACM stellen kardiale Arrhythmien dar, wobei als zugrundeliegende Mechanismen unter anderem die Störung der Ca^{2+} -Homöostase als auch eine erhöhte ROS-Emission diskutiert wird⁹⁵. Um proarrhythmogene Veränderungen in PKP2- und PG-defizienten Mäusen auf Einzelzell-Ebene zu detektieren, wurde die spontane elektrische Aktivität der Kardiomyozyten nach einer erhöhten Arbeitsbelastung beurteilt.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Forschungsarbeit die Hypothese geprüft, ob ein Kardiomyozyten-spezifischer Knockout von PKP2 oder PG die EC-Kopplung, die mitochondriale Funktion und/oder die Arrhythmogenität von Kardiomyozyten verändert.

2 Material

2.1 Material für die RNA-Analysen

Tabelle 1: Material für die RNA-Analysen

	Substanz	Hersteller
RNA-Isolierung	2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
	RNasy fibrous Tissue, mini kit	Qiagen
	RNase-Free DNase Set	Qiagen
	RNeasy plus, Universal mini kit	Qiagen
	RNase ZAP Wipes	Ambion
	RNase ZAP spray	Ambion
	RNase free water	Qiagen
	RNAlater	Qiagen
	DL-Dithiothreit (DL-DTT)	Sigma-Aldrich
	Buffer RLT	Qiagen
	Buffer RDD	Qiagen
	Proteinkinase K	Qiagen
	Ethanol 96-100°	Sigma-Aldrich
	Buffer RW1	Qiagen
	DNase I	Qiagen
Buffer RPE	Qiagen	
DNA-Verdau	RT2 PreAMP cDNA Synthesis Kit	Qiagen
	Dnase I Amplification grade	Sigma-Aldrich
	Reaction buffer	Sigma-Aldrich
	Amplification grade DNase	Sigma-Aldrich
	RNase free water	Qiagen
	Stopp solution	Sigma-Aldrich
cDNA Synthese	iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH
	5x iScript Reaction mix	Bio-Rad Laboratories GmbH
	Reverse transcriptase	Bio-Rad Laboratories GmbH
	Nuclease-free water	Bio-Rad Laboratories GmbH
qRT-PCR	Ultra SYBR Mixture	CWBIO Sciences

Tabelle 2: Verwendete Primer für die quantitative real-time PCR

Murin (m), forward (F), reverse (R), Ribosomal Protein L4 (*Rpl4*), Plakophilin-2 (*PKP2*), Plakoglobin (*JUP*). Die gelieferten Primer wurden mit ddH₂O auf eine Konzentration von 100µM verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Für Experimente wurde eine Arbeitsverdünnung von 10µM möglichst kurz vor Verwendung der Primer eingestellt. CybrGreen-Primer wurden von der Firma Applied Biosystems, Foster City, USA bezogen.

Primer-Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
<i>Rpl4</i> -m-F	GCT GAA CCC TTA CGC CAA GA
<i>Rpl4</i> -m-R	GCA GTC CCC TTC TCT GGA AC
<i>PKP2</i> -m-F	GGC TCT CCA GAA CCT CAC AG
<i>PKP2</i> -m-R	GGG AAA GAT TCC GTG ACA AA
<i>JUP</i> -m-F	CGC ATC TCT GAG GAC AAG AAC
<i>JUP</i> -m-R	TTG ATC GGG ATC ATA CTC TGG

Tabelle 3: Geräte und sonstiges Verbrauchsmaterial für die RNA-Analysen

	Produkt	Hersteller
Geräte und Hilfsmittel	TissueRuptor II (120 V, 60 Hz, US)	Qiagen
	NanoDrop OneC	Thermo Fisher Scientific Inc.
	C1000 Touch Thermal Cycler; CFX96TM	Bio-Rad Laboratories GmbH
	CFX ManagerTM Software Version 3.1	Bio-Rad Laboratories GmbH
	Zentrifuge Rotina 420R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG
	Centrifuge 5810/5810R Tischzentrifuge	Eppendorf AG
	Vortex Mixer, Vornado BV101-R-E	Benchmark Scientific
	Heizblock ThermoStat Plus	Eppendorf AG
Verbrauchs- material	Rneasy Mini Spin Columns	Qiagen
	Safe-Lock Tubes (2.0 ml, 1.5 ml)	Eppendorf AG
	Collection Tubes (2 ml, 1.5 ml)	Qiagen
	Tissue Ruptor Disposable Probes	Qiagen
	Microseal® 'B' seal Seals	Bio-Rad Laboratories GmbH
	Multiplate ® PCR PlatesTM 96-well, white/clear	Bio-Rad Laboratories GmbH

2.2 Material für die Kardiomyozytenisolation

Tabelle 4: Direkt an den Versuchstieren angewandte Substanzen

Substanz	Hersteller
Heparin-Natrium aus Schweine-darmmukosa, 5000 I. E./ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Buprenoved, 0,1 mg/kg Körpergewicht	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Softasept N Hautdesinfektionsmittel	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Tabelle 5: Präparations- und Isolationsinstrumentarium der Kardiomyozytenisolation

Instrument/Gerät	Hersteller
Narkosesystem (Vaporizer Key Fill Isoflurane, Fluovac Gas Evacuation System, Oxygen Flowmeter [Fluss 0,5 ml/min mit 5% Isofluran], Keyfill Adapter, Tube Adapter to Fluosorber)	Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March- Hugstetten
Aortic Cannula 1mm Ø Langendorff- Perfusionsanlage	Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March- Hugstetten
Feinschere 14088-10	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Lauda Ecoline Staredition Wärmethermostat mit Edelstahlbad und Variopumpe	Lauda Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen
Pinzette zum Kanülieren, FD281R	Aesculap, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Pinzette zur Thorakotomie, 11272-30	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Reglo Digital mikroprozess-orgesteuerte Dosierpumpe	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Schere 233-2121	VWR, Darmstadt

Tabelle 6: Lösungen und Substanzen zur Kardiomyozytenisolation

	Inhaltsstoff	Menge (auf 100 ml Aqua dest.)	Konzentration [mM]	Hersteller
Isolations-tyrode	NaCl	66 g	113	Carl Roth GmbH
	KCl	3,5 g	4.7	Sigma-Aldrich
	KH ₂ PO ₄	0,82 g	0.6	Merck
	Na ₂ HPO ₄	0,85 g	0.6	Merck
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3 g	1.2	Sigma-Aldrich
	Phenolrot	0,12 g	0.03	Sigma-Aldrich
	NaHCO ₃	10,1 g	12	VWR
	KHCO ₃	10,1 g	10	Sigma-Aldrich
	Hepes Natriumsalz	2,36 g	10	Sigma-Aldrich
	BDM (2,3-Butandion-Monoxim)	-	10	Sigma-Aldrich
	Taurin (NH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₃ H)	9,28 g	30	Sigma-Aldrich
	D-(+)-Glukose	2,5 g	5.5	Sigma-Aldrich
	CaCl ₂	-	1	Sigma-Aldrich
	Liberase-puffer	Isolationstyrode	20 ml	
Trypsin		40 µl		Sigma-Aldrich
CaCl ₂ (10 mM)		25,2 µl		Sigma-Aldrich
Liberase		1,44 mg		Roche
Stopp-Puffer 1	Isolationstyrode	9 ml		-
	FCS	1 ml		Invitrogen
	CaCl ₂ (10 mM)	12,5 µl		Sigma-Aldrich
Stopp-Puffer 2	Isolationstyrode	28,5 ml		-
	FCS	1,5 ml		Invitrogen
	CaCl ₂ (10 mM)	37,5 µl		Sigma-Aldrich
Weitere Substanzen	Medium 199, GlutaMAX			Invitrogen
	Penicillin G (10.000 Units) / Streptomycinsulfat			Invitrogen

2.3 Material für die Fluoreszenz- und Kontraktilitätsmessungen am IonOptix®-System

Tabelle 7: Zusammensetzung der Normaltyrode (NT)

Inhaltsstoff	Menge für Pufferlösung	für 1l	Konzentration [mM]	Hersteller
NaCl	7,597 g		130	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
KCl	0,373 g		5	Sigma-Aldrich
MgCl ₂	0,203 g		1	Merck
Hepes Natriumsalz	2,603 g		10	Sigma-Aldrich
Natriumpyruvat	0,220 g		2	Sigma-Aldrich
Ascorbinsäure	0,052 g		0.30	Sigma-Aldrich
Glucose	1,800 g		10	Sigma-Aldrich
Kalzium	1 ml		1	Sigma-Aldrich

Der pH-Wert wurde mittels NaOH (5M; Sigma-Aldrich) und HCl (1M; Sigma-Aldrich) auf 7,4 titriert.

Tabelle 8: Substanzen zur Kalibrierung, Stresssimulation, Färbung und Ausplattierung der Kardiomyozyten

Verwendungszweck	Stoff	Konzentration	Hersteller
Kalibrierung	CN, Natriumcyanid	4 mM	Fluka
	FCCP, Carbonyl-Cyanid-4-(trifluormethoxy)phen	5 µM	Sigma-Aldrich
Stresssimulation	Isoprenalin	30 nM	Sigma-Aldrich
Kardiomyozyten-Färbung	Indo-1-AM	1 µM	Invitrogen
	Pluronic ® F-127 20% Lösung in DMSO		Biotium
	TMRM, Tetramethyl-rhodamin	0,025 µM	Thermo Fischer
Beschichtung der Deckgläschen	Laminin aus Engelbreth-Hilm-Swarm (EHS) Maus Sarcoma	0,5 mg/ml	Roche Diagnostics

Tabelle 9: Geräte der IonOptix-Anlage

Gerät	Hersteller
Acquisition Computer (inkl. Monitor)	Dell
CFA Option D: Dual Emission option for CFA300	IonOptix
CFA300 Cell framing adapter	IonOptix
FSI700 Fluorescence system interface	IonOptix
MCS100 MyoCam-S Digital Variable field rate CCD	IonOptix
MCS200 µStep stand alone filter wheel and controller	IonOptix
Xenon short arc lamp-75XE (75W)	Ushio Inc. Tokyo
High Intensity Xenon Arc Lamp Power Supply	Cairn Research
PMT400 Photomultiplier sub-system	IonOptix
PTV100 PMT to Voltage Adaptor	IonOptix
Constant Current / Voltage Isolated Stimulators (DS2A / DS3)	Warner Instruments
Mikroskop, Nikon Eclipse Ti-S	Nikon
IONWZ IonWizard Core and Analysis (Software)	IonOptix
SARCACQ Sarc Len Messeinheit für Sarkomerlänge (Software)	IonOptix
Model TC-324B Heater Controller, Single Channel	Warner Instruments
Stimulus Isolation Unit (SIU-102)	Warner Instruments
Filter und Spiegel siehe Abb. 13	Chroma Technology GmbH, Fürstenfeldbruck

2.4 Material für die Mitochondrienisolation

Tabelle 10: Isolations- und MSS-Lösung für die Mitochondrienisolation

Lösung	Substanz	Konzentration	Hersteller
Isolationslösung (pH 7.4)	Mannitol	225 mM	Sigma-Aldrich
	Sucrose	75 mM	Merck
	HEPES	2 mM	Sigma-Aldrich
	EGTA	1 mM	Sigma-Aldrich
Mitochondrien-Suspensions-Lösung (MSS) (pH 7.4)	Mannitol	225 mM	Sigma-Aldrich
	Sucrose	75 mM	Merck
	HEPES	2 mM	Sigma-Aldrich
	EGTA	20 µM	Sigma-Aldrich

Der pH-Wert wurde mittels TrisBase oder TrisHCl auf titriert.

Tabelle 11: Ansatz für BSA/Proteinase-Lösung

Lösung	Substanz	Menge	Hersteller
BSA/Proteinase-Lösung (pro Maus)	Isolutionslösung	1 ml	Laboreigen
	BSA (Bovinem Serum Albumin)	4 mg/ml	Sigma-Aldrich
	Proteinase	0,16 mg/ml	Sigma-Aldrich

2.5 Material für die Respirations- und Fluoreszenzmessungen am Oroboros®-System

Tabelle 12: Zusammensetzung des Atmungspuffers

Substanz	Konzentration	Hersteller
KCL	137 mM	Sigma-Aldrich
KH ₂ PO ₄	2 mM	Sigma-Aldrich
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	2,5 mM	Merck
HEPES	20 mM	Sigma-Aldrich
EGTA	0,5 mM	Sigma-Aldrich

Der pH-Wert wurde mittels 1M KOH (Sigma-Aldrich) auf 7,2 titriert.

Tabelle 13: Substanzen für die Atmungsmessung

Substanz	Konzentration	Hersteller
Pyruvat	5 mM	Sigma-Aldrich
Malat	5 mM	Sigma-Aldrich
Succinat	10 mM	Sigma-Aldrich
Rotenon	0,5 µM	Sigma-Aldrich
Carnitin	1mM	Simga-Aldrich
Palmitoyl-CoA	10 µM	Sigma-Aldrich
Oleoyl-L-Carnitin	10 µM	Sigma-Aldrich
ADP	30 / 70 / 200 / 1 mM	Sigma-Aldrich
Oligomycin	1,25 µM	Sigma-Aldrich
Reagenz A	-	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
Reagenz B	-	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
TMRM	1 µM	Sigma-Aldrich

Tabelle 14: Reagenzien zur Proteinbestimmung und zur Messung des mitochondrialen Membranpotentials

	Produkt	Hersteller
Reagenz A	-	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
Reagenz B	-	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
TMRM	1 µM	Sigma-Aldrich

2.6 Sonstiges Verbrauchsmaterial und Laborgeräte

Tabelle 15: Sonstige Laborgeräte und Verbrauchsmaterial

	Produkt	Hersteller
Gerät / Hilfsmittel	Feinwaage, ABS 120-4	Kern & Sohn GmbH, Balingen
	Gefrierschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
	Magnetrührer CAT 6.1	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH, Staufen
	pH Elektrode SenTix 22	WTW, Weilheim
	pH-Meter, Eutech Instruments, pH 510	VWR, Darmstadt
	Zentrifuge Galaxy 16DH	VWR, Darmstadt
	Vakuumpumpe SP302SA	Schwarzer Precision, Essen
	Vortex Mixer, Vornado BV101-R-E	Benchmark Scientific
	Wärmeschrank Heraeus	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe
	Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe
	Fluoreszenzplattenreader	Tecan Infinite M200 Pro, Crailsheim
	Potter-Gefäße	Hartenstein, Würzburg
	Eppendorfgefäß	Eppendorf AG, Hamburg
	Mini-Tischzentrifuge	Labnet International Inc.
	Kühltischzentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG
Verbrauchsmaterial	Deckgläschen, 24x50 mm	VWR
	Discofix C Dreivegehahn	B. Braun Melsungen AG
	Falcon, Blue Max, 15ml und 50ml Polypropylene Conial Tube	Becton Dickinson, N.J., USA
	Immersionsöl	Cargille Laboratories Inc., Cedar Grove, N.J., USA
	Isotone Kochsalzlösung 0,9 %	B. Braun Melsungen AG
	Destilliertes Wasser	B. Braun Melsungen AG
	Nadel BSS Microlance 3	Becton Dickinson, N.J., USA
	Spritze 1ml BD Plastipak	B. Braun Melsungen AG
	Original Perfusor Spritze 50ml	B. Braun Melsungen AG
	Petrischalen	Sarstedt AG & Co. KG
	Pipettenspitzen 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co. KG
	SafeSeal Reagiergefäße, 2ml	Sarstedt AG & Co. KG
	Wageschälchen	A. Hartenstein GmbH
	Zellkulturschalen Ø 100 x 20mm	TPP, Trasadingen, Schweiz
	Zellkulturschalen Ø 60 x 15mm	
	Pipette Eppendorf Research plus 0,1 - 2,5 µl; 0,5 - 10 µl; 100 - 1000 µl	Eppendorf AG
	Pipettierhilfe	BRAND GmbH & Co. KG

3 Methoden

3.1 Tierhaltung

Für diese Arbeit wurden transgene Mäuse (*Mus musculus*) im C57Bl/6J Hintergrund verwendet. Die Tiere wurden unter folgenden Bedingungen gehalten: $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus, freier Zugang zu Trinkwasser und Nahrung. Mäuse der transgenen PKP2-Linie wurden im Alter von vier, acht und zwölf Wochen analysiert. Mäuse der transgenen PG-Linie wurden im Alter von sechs Wochen analysiert. Tierversuche wurden im Rahmen der Tierversuchsanträge RUF-55.2.2-2532-2-663 und RUF-55.2.2-2532-2-659 genehmigt.

3.2 Generierung herzspezifischer, konditioneller Knockouts im Mausmodell

Konventionelle globale Deletion von Plakophilin 2 (PKP2) und Plakoglobin (PG) resultiert in embryonaler Letalität als Folge gestörter Morphogenese des Herzens^{159,160}. Um diese Einschränkung zu überwinden, wurde das Rekombinasesystem Cre/loxP genutzt, welches den Kardiomyozyten-spezifischen Knockout der jeweiligen Gene, *PKP2* und *JUP*, in der frühen Postnatalphase ermöglichte.

loxP-Sequenzen werden am 5' und 3' Ende von mindestens einem essenziellen Exon des Zielgens integriert. In Cre-exprimierenden Mäusen bindet die Cre-Rekombinase an die loxP-DNA-Sequenz und exzidiert den DNA-Bereich zwischen den zwei loxP-Sites. Die Expression der Cre-Rekombinase unterliegt der Kontrolle des herzspezifischen α -Myosin-Schwere-Ketten- (α -MHC) Promotors, sodass die Exzision der Zielgen-Exonen exklusiv im Herzen in der frühen postnatalen Phase stattfindet¹⁶¹. Für das *PKP2*- bzw. *JUP*-Gen wurden jeweils unterschiedliche Target-Vektoren verwendet. Im Falle des *JUP*-Gens führte der entwickelte Target-Vektor loxP-Stellen um das Exon 1 ein, welches die transkriptionellen regulatorischen Sequenzen des *JUP*-Gens enthält¹⁵⁵. Der für das *PKP2*-Gen entwickelte Target-Vektor führte loxP-Stellen um das Exon 4 ein, dessen Exzision zur Ablation von *PKP2* führt¹⁶¹.

Homozygot geflochte Tiere (*PKP2*^{fl/fl} bzw. *JUP*^{fl/fl}) wurden mit dem Cre-Deleter Mausstamm B6.FVB-Tg (Myh6-Cre)^{2182Mds/J} (α MHC-Cre^{+/-}, JAX, #011038) verpaart. Aus dieser Verpaarung gehen als Nachkommen Tiere mit den Genotypen

α MHC-Cre positiv, heterozygot gefloxt (α MHC-Cre^{+/-}, PKP2^{fl/+} bzw. JUP^{fl/+}) hervor. Bei diesen Nachkommen ist PKP2 bzw. JUP heterozygot deletiert. In einem zweiten Schritt wurden männliche, heterozytote PKP2- bzw. JUP-Knockout-Mäuse (α MHC-Cre^{+/-}, PKP2^{fl/+} bzw. JUP^{fl/+}) mit homozygot geflochten Weibchen (PKP2^{fl/fl} bzw. JUP^{fl/fl}) verpaart. Aus dieser Verpaarung hervorgehende Nachkommen können folgende Genotypen haben: homozygot gefloxt (PKP2^{fl/fl} bzw. JUP^{fl/fl}), heterozygot gefloxt (PKP2^{fl/+} bzw. JUP^{fl/+}), heterozygot Knockout (α MHC-Cre^{+/-}, PKP2^{fl/+} bzw. JUP^{fl/+}) oder homozygot Knockout (α MHC-Cre^{+/-}, PKP2^{fl/fl} bzw. JUP^{fl/fl}) (siehe Abb. 10). α MHC-Cre negative Tiere mit den Genotypen homozygot gefloxt (PKP2^{fl/fl} bzw. JUP^{fl/fl}) oder heterozygot gefloxt (PKP2^{fl/+} bzw. JUP^{fl/+}) wurden als Kontrolltiere in den Versuchen verwendet. Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der homozygoten Knockout-Mäuse (α MHC-Cre^{+/-}, PKP2^{fl/fl} bzw. JUP^{fl/fl}). Im Folgenden werden homozygote Knockout Tiere als PKP2 KO bzw. PG KO bezeichnet.

Zur Genotypisierung wurden die Mauslinien mittels Polymerasekettenreaktion (PCR; engl.: *polymerase chain reaction*) nach Standardverfahren auf das Vorhandensein der Transgene in der genomischen DNA untersucht. Die DNA wurde aus Ohrstanzen, welche im Alter von drei Wochen abgenommen wurden, extrahiert.

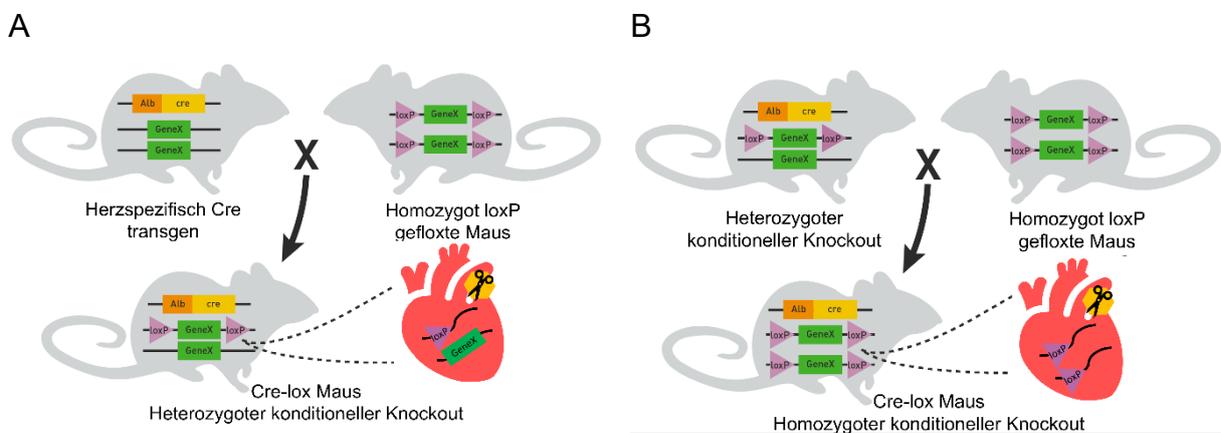


Abb. 10: Kreuzung konditioneller, herzspezifischer Knockout-Mäuse

Dargestellt ist das Kreuzungsschema zur Generierung eines konditionellen, herzspezifischen Knockouts mittels des Cre/loxP-Systems. Reproduziert nach¹⁶².

3.3 Kontrolle des Knockouts auf RNA-Ebene

Die Untersuchung der Transkription von *PKP2* und *JUP* wurde mithilfe quantitativer Echtzeit-PCR (RT-qPCR; engl.: *reverse transcription quantitative real-time PCR*) durchgeführt. Die RT-qPCR ist eine Kombination aus drei Schritten: (i) die Reverse Transkriptase (RT)-abhängige Umwandlung von RNA in cDNA, (ii) die Amplifikation der cDNA mit Hilfe der PCR und (iii) die Detektion und Quantifizierung der Amplifikationsprodukte in Echtzeit.

3.3.1 Isolierung und Reinigung der totalen RNA

Die Isolierung der totalen RNA-Fractionen aus murinem myokardialem Gewebe wurde unter RNase-freien Bedingungen gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. RNA wurde aus 25-30 mg -80°C tiefgefrorenem Herzmuskelgewebe mithilfe des kommerziell erhältlichen Qiagen RNeasy Mini Kit extrahiert. Vorbereitend wurde der RLT-Puffer mit 20 μl zweimolares Dithiothetriol (pro 1 ml RLT) versetzt. Das Herzmuskelgewebe wurde auf Eis aufgetaut und in einem Waagschälchen mit eiskaltem RNA-Later geschwenkt, um anschließend in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt zu werden. Auf das Gewebe wurde 400 μl DTT-RLT-Puffer zugegeben und direkt mithilfe eines TissueRuptor® für ca. 15 s auf höchster Stufe homogenisiert. Dem Lysat wurde 600 μl Proteinase K-Lösung zugegeben und für 10 Minuten in einen auf 55°C vorgeheizten Heizblock zum Inkubieren gestellt. Im Anschluss wurde das Lysat bei 13.000 rpm für drei Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Dem umgefüllten Überstand wurde 550 μl 100% Ethanol zugegeben und durch Invertieren vorsichtig durchmischt. Von dem Gemisch wurden sofort 700 μl in eine RNeasy Spin-Säule pipettiert und nach Zentrifugation bei 10.000 rpm für 15 Sekunden wurde der Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wurde mit dem Rest des Gemisches wiederholt. Anschließend wurde 350 μl RW1 Puffer zugegeben, um die Probe durch einen weiteren Zentrifugationsschritt mit denselben Einstellungen (10.000 rpm; 15s) zu waschen. Im nächsten Schritt wurde die genomische DNA eliminiert, indem 80 μl DNase Lösung der Säule zugegeben wurde und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zugabe von 350 μl RW1 Puffer mit anschließender Zentrifugation bei 10.000 rpm für 15 Sekunden und Verwerfen des Durchflusses. Der Vorgang wurde in zwei weiteren Zentrifugationsschritten mit jeweils 500 μl RPE-Puffer bei zunächst 10.000 rpm für 15 Sekunden und anschließend bei 10.000 rpm für zwei Minuten wiederholt. Die Säule wurde vorsichtig in einen neuen 2 ml Collection Tube überführt und bei 13.000 rpm für

eine Minute zentrifugiert. Zuletzt wurde die Säule in ein neues RNase-freies 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 40 µl RNase freiem Wasser eluiert. Es folgte eine letzte Zentrifugation bei 10.000 rpm für eine Minute. Direkt im Anschluss erfolgte die Konzentrationsbestimmung mit dem Nanodrop. Nur qualitativ hochwertige RNA (OD-Verhältnisse 260/280 und 260/230 $\geq 2,0$) wurde zur cDNA-Synthese eingesetzt. Die RNA wurde direkt für die reverse Transkription verwendet oder für die Lagerung bei -80°C aliquotiert.

3.3.2 cDNA-Synthese

Für die Umschreibung von RNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte zunächst mithilfe des RT²-PreAMP-Kit von Qiagen der DNA-Verdau, um Kontaminationen mit DNA zu eliminieren. Pro Ansatz wurden 1 µg totaler RNA-Fraktion eingesetzt. Das jeweils konzentrationsabhängige Volumen RNA wurde mit sterilem doppeltdestilliertem Wasser (ddH₂O) auf 8 µl aufgefüllt. Jeder Ansatz enthielt Reaction Mix, DNase, RNA und steriles ddH₂O wie in Tabelle 16 dargestellt, um ein Gesamtvolumen von 10 µl zu erzeugen.

Tabelle 16: Ansatz für DNA-Verdau der RNA-Mixtur (10 µl Gesamt)

1 µg	Totale RNA-Fraktion
1 µl	Reaction Mix
1 µl	DNase
X µl	Steriles ddH ₂ O

Nach einer Inkubationsphase von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde durch Zugabe von 1 µl Stopp Lösung der DNA-Verdau gestoppt. Die Mixtur inkubierte weitere 10 Minuten bei 70°C .

Die cDNA-Synthese für die RT-qPCR wurde mit dem iScript-Kit von Bio-Rad durchgeführt. Jeder Ansatz enthielt RNA-Mixtur, Reaktion Mix, Reverse Transkriptase und steriles ddH₂O, um auf ein Gesamtvolumen von 20 µl zu kommen. Versuchsansatz und Thermocycler-Bedingungen wurden, wie in Tabelle 17 und Tabelle 18 dargestellt, durchgeführt. Die synthetisierte cDNA wurde entweder direkt für die RT-qPCR verwendet oder aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Tabelle 17: Ansatz für die RT der RNA in cDNA

Volumen	Substanz
11 µl	RNA-Mixtur (siehe Tabelle 16)
4 µl	iScript Reaction buffer
1 µl	Reverse Transcriptase
4 µl	Sterile ddH ₂ O

Tabelle 18: Thermocycler Konditionen

Temp.	Dauer
25°C	5 min
42°C	30 min
85°C	5 min
4°C	∞

3.3.3 Quantitative Real-Time PCR

Für die Bestimmung der relativen Genexpression wurde die Methode der RT-qPCR verwendet. Die RT-qPCR verwendet fluoreszierende Reporterfarbstoffe, um die Amplifikations- und Detektionsschritte der PCR-Reaktion in einem einzigen Reaktionsgefäßformat zu kombinieren. Der Assay beruht auf der Messung des Anstiegs des Fluoreszenzsignals, das proportional zur Menge, die während jedes PCR-Zyklus produzierten DNA ist. Der Begriff „Real Time“ bezieht sich dabei auf die nach jedem Amplifikationsschritt detektierte Fluoreszenz, deren Anstieg in Echtzeit visualisiert wird. Übersteigt das Signal den Bereich der Hintergrundsignale und in der exponentiellen Amplifikationsphase einen definierten Schwellenwert (engl.: „Threshold“), so wird dieser Zeitpunkt als C_T-Wert (engl.: „Cycle of Threshold“) bezeichnet^{133,163}. Ein frühzeitiges Erreichen dieses Schwellenwertes (kleiner C_T-Wert), bedeutet folglich, dass mehr Fluoreszenz emittiert und damit mehr cDNA-Templates vorhanden waren. Normalisiert mit einem Referenzgen, dessen Expression in den Versuchstiergruppen nicht divergiert, lassen sich anhand der C_T-Werte unterschiedliche Mengen an cDNA in den Proben quantifizieren¹⁶¹.

Die RT-qPCR wurde mit SybrGreen durchgeführt. SybrGreen interkaliert in neu synthetisierte PCR-Produkte und emittiert Fluoreszenz der Wellenlänge 521 nm proportional zur exponentiellen Amplifikation der PCR¹⁶¹. Mittels Erstellung exponentieller cDNA-Verdünnungsreihen wurde die Effizienz der Primerpaare untersucht. Zur Bestimmung des Referenzgenes wurden drei häufig verwendete Referenzgene (*Gapdh*, *Actb*, *Rpl4*) mit verschiedenen cDNA-Konzentrationen der Versuchsgruppen verglichen. *Rpl4* wies dabei die geringste Varianz auf, weswegen es in dieser Arbeit verwendet wurde.

Genspezifische Vorwärts- und Rückwärtsprimer wurden in die Wells der PCR-Platte vorgelegt. Für jede Probe wurde die cDNA zusammen mit SYBR Green Mix und ddH₂O in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden pro Well 19 µl der cDNA enthaltenden Mixtur zugefügt. Der Reaktionsansatz wurde, wie in Tabelle 19 angegeben, pipettiert und in einer Polymerase-Kettenreaktion in einem Thermocycler umgesetzt (siehe Tabelle 20).

Tabelle 19: Ansatz pro Probe der SybrGreen RT-qPCR

Substanz	Volumen
Absolute SYBR Green mix	10 µl
Fluorescein	0,5 µl
F-Primer (10 µM)	0,5 µl
R-Primer (10 µM)	0,5 µl
cDNA	0,6 µl
ddH ₂ O	8,25 µl

Tabelle 20: Programm für RT-qPCR

Schritt	Temperatur	Dauer
1.	95°C	10 min
2.	95°C	15 s
3.	56°C	20 s
4.	72°C	20 s
39x Schritt 2. bis 4.		

Die Bestimmung der relativen Genexpression erfolgte anhand der $\Delta\Delta C_T$ -Methode¹⁶⁴ mithilfe der CFX Manager™ Software. In einem ersten Schritt werden die ermittelten C_T -Werte des Zielgens ($C_{T;x}$) durch Abzug des C_T -Wertes des Referenzgens ($C_{T;Rpl4}$) in einer Probe normalisiert: $\Delta C_T = C_{T;x} - C_{T;Rpl4}$. Als nächstes fasst man die ΔC_T -Werte des Zielgens von den zwei Versuchsgruppen (A und B) über den Mittelwert zusammen und bildet die Differenz zwischen $\Delta C_{T;A}$ und $\Delta C_{T;B}$: $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T;A} - \Delta C_{T;B}$. Dieser $\Delta\Delta C_T$ gibt den relativen Unterschied der auf das Referenzgen normalisierte Expression des Zielgens in den zwei Gruppen im Vergleich an. Aus diesem Wert kann mittels der Formel $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ der relative Expressionsunterschied zur Kontrollgruppe ermittelt werden. Die $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ -Werte der Kontrollgruppe wurden auf deren Mittelwert zentriert und die $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ -Werte der Versuchsgruppen als relative Expressionsunterschiede *fc* (engl.: „*fold change*“) zur Kontrollgruppe dargestellt. Dabei bedeutet $fc = 1$ kein Unterschied in der Expression zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe, $fc > 1$ eine höhere Expression und $fc < 1$ eine geringere Expression in der Versuchsgruppe^{161,164}.

3.4 Kardiomyozytenisolation

Für die Organentnahme aus den Versuchstieren sowie die Durchführung der Kardiomyozytenisolation erhielt ich freundlicherweise die Unterstützung der technischen Assistentinnen der Core facility Elektrophysiologie, Michelle Gulentz und Annette Berbner.

Ventrikuläre Mauskardiomyozyten wurden durch enzymatische Dissoziation isoliert. Dabei wurde das AfCS-Protokoll (Isolation of Adult Mouse Cardiac Myocytes from One Heart, AfCS Procedure Protocol PP00000125 Version 1, 11/05/02) befolgt.

Am Morgen des Messtags wurden 250ml der Isolationstyrode hergestellt. Die Langendorff-Perfusionsanlage (siehe Abb. 11) wurde mit ca. 250 ml destilliertem Wasser gespült und anschließend beide zuführenden Schenkel der Anlage mit jeweils der Isolationstyrode und dem Liberasepuffer (siehe Tabelle 6) luftblasenfrei befüllt.

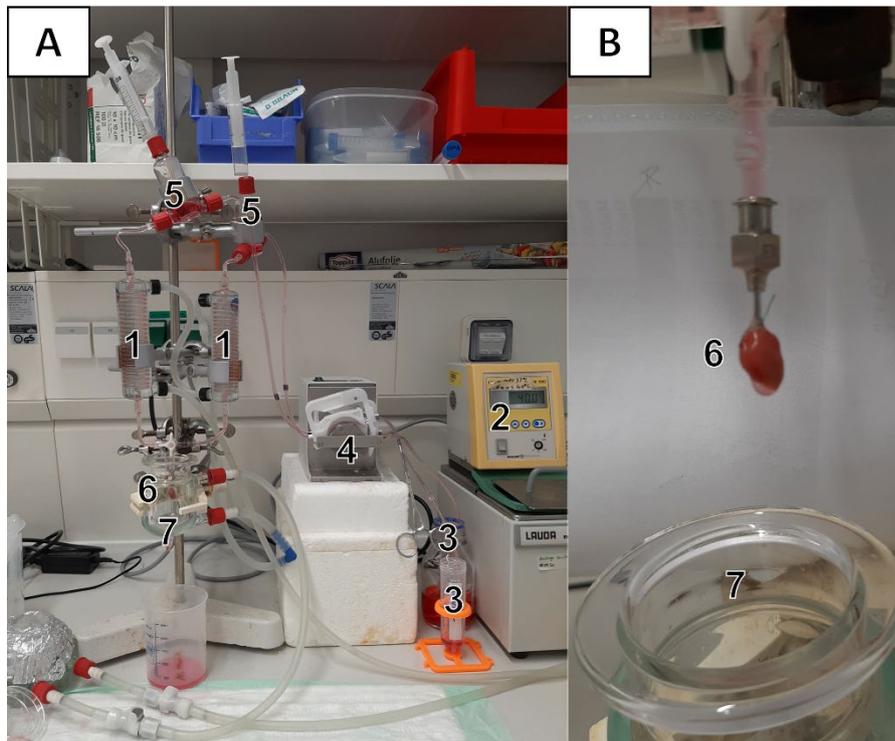


Abb. 11: Aufbau der Langendorff-Perfusionsanlage zur Kardiomyozytenisolation

A: Die Isolationstyrode und Liberaselösung werden über ein durch ein Schlauchsystem zirkulierendes Wasserbad und spiralförmige Wärmeaustauscher (1) auf 37 °C temperiert. Eine peristaltische Pumpe (4) generiert einen kontinuierlichen Fluss beider Perfusionslösungen durch das System, welche mittels eines Dreiwegehahns dem Herzen zugeführt werden. B: Detailaufnahme zur Darstellung eines Herzens während der Perfusion. Die Wärmekammer (7) ist zur besseren Demonstration des kanülierten Herzens (6) abgesenkt. (1) spiralförmige Wärmeaustauscher; (2) Kontrolleinheit des Wasserbads; (3) Zulaufe der Perfusionslösungen; (4) peristaltische Pumpe; (5) Blasenfallen; (6) kanüliertes Herz; (7) Wärmekammer.

Mäusen wurden ca. zehn Minuten vor der Herzentnahme 0,1 mg/kg Körpergewicht Buprenoved in einer 1:25 Verdünnung mit 0,9% NaCl zur Analgesie sowie 0,5 ml Heparin in einer 1:10 Verdünnung mit 0,9% NaCl zur Blutgerinnung und adäquaten Perfusion der Herzkranzgefäße subkutan injiziert. Anschließend wurden die Mäuse durch Inhalation von 1,5 - 2 Vol% Isofluran und 0,5 l O₂/min anästhesiert. Eine tiefe Narkose wurde durch eine fehlende Reaktion auf Schmerzstimuli bestätigt. Im Weiteren wurde die Maus euthanasiert und das Mediastinum via Thorakotomie zur Organentnahme eröffnet. Das Herz wurde von Gefäßen sowie angrenzendem Gewebe chirurgisch entfernt, wobei die Aorta kurz vor dem Aortenbogen abgesetzt wurde. Das explantierte Herz wurde unter lichtmikroskopischer Kontrolle über die Aorta kanüliert und mittels chirurgischem 5-0 Polyesterfaden fixiert. Nachfolgend wurde das isolierte Herz über die Aorta und Koronararterien retrograd mit einer konstanten Flussrate von 2 ml/min bei 37°C in der Langendorff-Perfusionsanlage perfundiert: zunächst für vier Minuten lang mit der Isolationstyrode zur Entfernung des Blutes aus dem Herzen und dann für sieben bis acht Minuten mit dem Liberasepuffer. Die im Liberasepuffer enthaltenen Enzyme führen zu einem systematischen Verdau des strukturellen kollagenen Bindegewebes, welches die Kardiomyozyten im Verbund hält.

Nach der Digestion wurden die Vorhöfe abgesetzt und die Ventrikel durch zwei vertikale Inzisionen eröffnet, um das Gewebe anschließend in einer 60-mm-Petrischale mit 5 ml Isolationstyrode und 5 ml Stopp-Puffer 1 (siehe Tabelle 6) vorsichtig durch mechanische Agitation aufzulockern. Es folgte eine Qualitätskontrolle der Isolierung durch die Begutachtung eines Tropfens Zellsuspension unter dem Auflichtmikroskop. Das typische Bild, welches sich unter optimalen Bedingungen unter dem Durchlichtmikroskop zeigen sollte, sind stabförmige, quergestreifte Kardiomyozyten (siehe Abb. 12). Das restliche Herz wurde verworfen. Die isolierten Kardiomyozyten wurden für fünf bis zehn Minuten in einem 15 ml Flacon sedimentiert, der Überstand abgenommen und zentrifugiert (800 U/min). Die zwei Zellpellets wurden in 5 ml Stopp-Puffer 2 (siehe Tabelle 6) resuspendiert und die Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]) nach Überführung in ein 100-mm-Petrischälchen graduell bis zu 1.0 mM erhöht.

Der Ca^{2+} -Aufbau erfolgte gemäß folgendem Schema:

1. 50 μl 10 mM CaCl_2 -Lösung $\rightarrow [\text{Ca}^{2+}] = 62 \mu\text{M}$.
2. 50 μl 10 mM CaCl_2 -Lösung $\rightarrow [\text{Ca}^{2+}] = 112 \mu\text{M}$.
3. 100 μl 10 mM CaCl_2 -Lösung $\rightarrow [\text{Ca}^{2+}] = 212 \mu\text{M}$.
4. 30 μl 100 mM CaCl_2 -Lösung $\rightarrow [\text{Ca}^{2+}] = 500 \mu\text{M}$.
5. 50 μl 100 mM CaCl_2 -Lösung $\rightarrow [\text{Ca}^{2+}] = 1 \text{ mM}$.

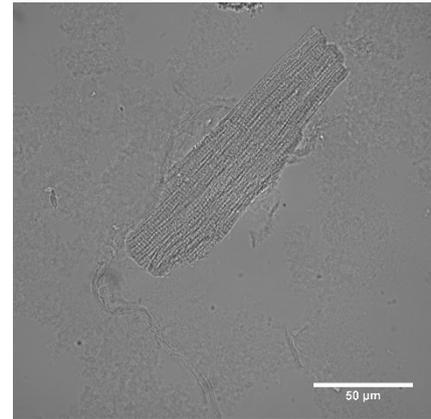


Abb. 12: Beispielbild eines isolierten Kardiomyozyten

Die Zugabe erfolgte in einem Intervall von jeweils vier Minuten zwischen den Schritten. Die Lösung wurde erneut in einem 15 ml Flacon überführt und für fünf bis zehn Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und zentrifugiert (800 U/min). Die Zellpellets wurden in einer mit 37°C warmem Medium 199 (5% FCS, 1% Penicillin Streptomycin und 1% Hepes) befüllten 10-mm-Petrischale zusammengeführt. Aufbewahrt wurde die Kardiomyozyten-Lösung in einem Wärmeschrank bei 37°C und 5% CO_2 Atmosphäre. Die Zellen wurden innerhalb von 8 h nach der Isolation für Messungen genutzt. Für die nachträgliche Genotypisierung der Mäuse wurden jeweils ein Stück des Schwanzes post mortem abgeschnitten und bei -80°C eingefroren.

3.5 Fluoreszenz- und Kontraktilitätsmessungen mit dem IonOptix®-System

Der Umgang mit dem IonOptix®-System wurde vom Leiter der Core Facility für zelluläre Elektrophysiologie Dr. rer. nat. Michael Kohlhaas angeleitet und betreut. Alle Messungen wurden mithilfe eines Epifluoreszenzmikroskops der Firma Nikon vorgenommen und ergänzt durch das IonOptix®-System der Firma IonOptix. Das zugehörige Programm IONWizard Version 6.6.1.108 ermöglichte die zeitgleiche Visualisierung und Aufzeichnung der Messungen am Computer.

An der IonOptix-Anlage (siehe Abb. 13) werden neben der Sarkomerlänge simultan Fluoreszenzemissionen lebender Herzmuskelzellen aufgezeichnet. Zur Minimierung von Artefakten der Fluoreszenzsignalen werden die Messungen in einem Dunkelraum mit einer Rotlichtlampe als einzige Lichtquelle vorgenommen.

Native oder mit Fluoreszenzfarbstoff-beladene Kardiomyozyten wurden in der Zellkammer des Mikroskops unter kontinuierlichem Fluss der Perfusionslösungen bei 37°C elektrisch stimuliert. Das Licht der Xenon Short Arc Lamp wurde durch zwei Filter geleitet, die mithilfe eines Filterwechslers das Spektrum der Lichtquelle an die Exzitationswellenlänge λ_{exc} des jeweiligen Substrats anpassten. Das gefilterte Licht erreichte über einen dichroitischen Spiegel (89017bs F/TR) die Messkammer, wo es durch den jeweiligen Indikator der Kardiomyozyten die Emission eines (Auto-) Fluoreszenzsignals einer bestimmten Emissionswellenlänge λ_{em} auslöst. Das emittierte Licht wird über Spiegel zu einer Photomultiplier-Röhre (PMT) geleitet. Zur Signalverbesserung der Fluoreszenzsignale sind der PMT-Substrat-spezifische Filter vorgeschaltet. Die Fluoreszenzsignale werden in der PMT verstärkt und in ein Stromsignal umgewandelt, welches über das zwischengeschaltete Fluorescence System Interface vom Computer erfasst wird. Daten der Fluoreszenzmessungen wurden mittels IonWizard 6.6 Software dargestellt und verarbeitet.

Mittels einer zweiten Lichtquelle (Rotlicht >639nm) in Durchlichtmikroskopie wurde das Bild der fokussierten Kardiomyozyte erzeugt. Das Bild, welches sich unter dem Mikroskop darstellt, wird in Echtzeit mithilfe der Myocam-s auf den Computermonitor projiziert. Die erhobenen Sarkomerlängen der Kardiomyozyte im Zeitverlauf werden über digitale Zellengeometrie durch die IonWizard 6.6 Software visualisiert und verarbeitet.

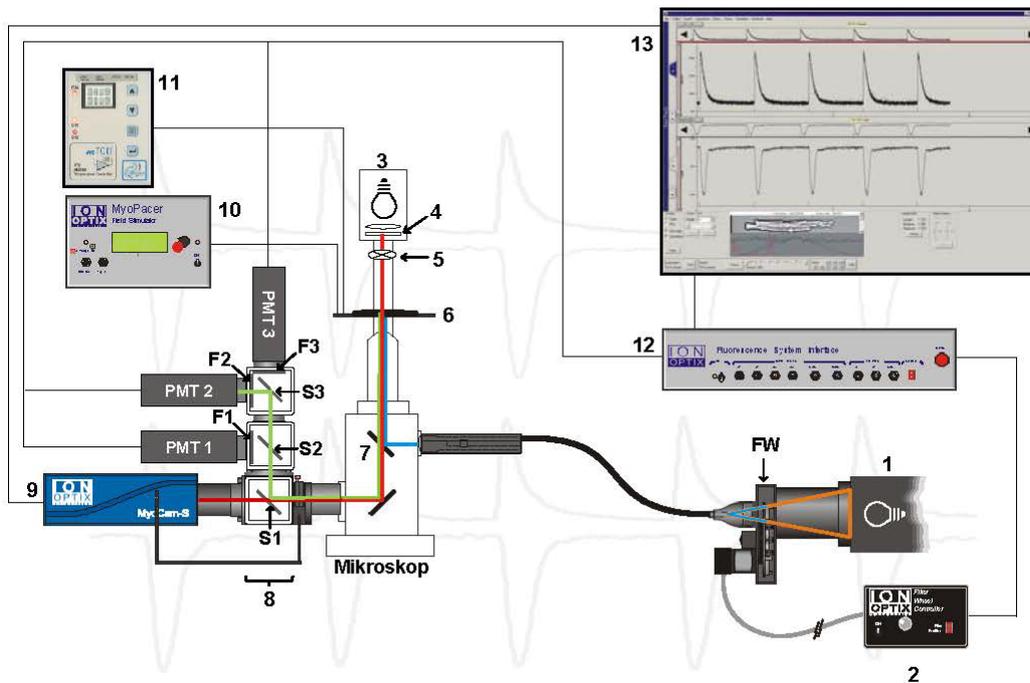


Abb. 13: Aufbau des IonOptix-Systems

Inverses Mikroskop (Nikon Ti-S/L100) mit Anbau einer modifizierten IonOptix-Anlage (Myozyte Calcium & Contractility Recording System) in μ Step Konfiguration. Die schwarzen Linien entsprechen den wichtigsten Anschlüssen des Systems. (1) Lichtquelle (Xenon Short Arc Lamp -75XE mit IonOptix μ Step) mit Filterwechsler (FW) zur Erzeugung des Exzitationslichtes (blauer Strahl); (2) Filterrad-Controller; (3) Lichtquelle zur Durchlicht-Mikroskopie (roter Strahlengang); (4) Lichtfilter (T660LPXR); (5) Filterrad zur Phasenkontrastierung; (6) Mikroskopiertisch mit Zellkammer; (7) Strahlenteiler mit Mikroskop Filter; (8) Säule mit Cell Framing Adapter, Spiegeln (S1-3) und Filtern (F1-3) und Photomultiplier (PMT) zur Verarbeitung des Emissionslichtes (grüner Strahl); (9) Kamera (MyoCam-S) zur Detektion der Sarkomerlänge; (10) Zell-Stimulator (MyoPacer) zur elektrischen Feldstimulation; (11) Temperaturkontrolleinheit zur Temperierung der Zellkammer; (12) Fluorescence System Interface; (13) Computer mit Akquisitions-Software (IonWizard 6.6). Reproduziert nach¹⁶⁵.

3.5.1 Versuchsvorbereitung

Am Morgen jeder Messung wurden die Perfusionspuffer (siehe Tabelle 7 und Tabelle 8) angesetzt. Vor jeder Messung wurde das Perfusionssystem mit destilliertem Wasser gespült, um potenziell verbliebene Pufferreste vorheriger Messungen zu beseitigen. Im Anschluss wurde das Perfusionssystem mit den jeweiligen Lösungen befüllt und entlüftet. Je nach geplantem Experiment wurden Filterrad, Filter vor dem PMT und Parametererhebung im IonWizard Programm eingestellt. Zur Messung der Kardiomyozyten an der IonOptix-Anlage müssen diese auf Deckgläschen fixiert werden. Zur Beschichtung der Deckgläschen wurde 0,5 mg/ml konzentriertes Laminin benutzt. Pro Glasplättchen wurden ca. 3-4 μ l Laminin mittig aufpipettiert und kreisförmig verteilt, sodass sich eine dünne sich auskristallisierende Schicht bildete. Die Deckgläschen wurden zum Trocknen für ca. 20 min bei Raumtemperatur belassen und anschließend in die Messkammer eingebaut. Sobald die Kardiomyozytenlösung bereit war, wurden ca. 2 ml der Zellsuspension in ein Eppendorf Röhrchen überführt und der Rest der Suspension in der Petrischale im Inkubator belassen. Aus dem

Eppendorf Röhrrchen wurden ca. 0,5 ml in eine Versuchskammer ausplattiert und fünf Minuten ruhen gelassen. Diese Zeit diente dem Absetzen und Anheften der Kardiomyozyten an dem beschichteten Objektträger.

3.5.2 Versuchsdurchführung

Zur Versuchsdurchführung wurden die Kardiomyozyten, nativ oder nach der Färbung, auf den Objektträgern ausplattiert und die Messkammer in den Objektisch des Mikroskops eingesetzt. Jede Messkammer bestand aus dem mit Laminin beschichteten Deckgläschen, zwei Elektroden, einem Zufluss und einer Absaugnadel sowie einem Temperaturregulator. Der Zufluss der Kammer wurde aus dem angeschlossenen Perfusionssystem gespeist (siehe Abb. 14). Dieses bestand aus einer Halterung für mehrere 50 ml Spritzen, die mit den Puffern befüllt waren und über ein Schlauchsystem mit der Kammer verbunden wurden. Der Zufluss wurde über Dreiwegehähne reguliert. Um ein kontinuierliches Umspülen der fixierten Kardiomyozyten zu gewährleisten, sorgte eine mit einer Vakuumpumpe verbundene Absaugnadel zusammen mit der genauen Einstellung der Flussgeschwindigkeit mittels Tropfenzähler für ein konstantes Volumen des Flüssigkeitsspiegels in der Messkammer. Durch eine am Mikroskop angebrachte Heizung wurden die Lösungen in der Messkammer konstant auf 37°C gehalten. Kardiomyozyten wurden am Mikroskop eingestellt und der Bildausschnitt durch Blenden des CFA300 Cell framing adapters angepasst. Bei der Auswahl der zu messenden Zelle wurde darauf geachtet, dass sie folgende Eigenschaften aufwiesen: stabförmig, deutliche Sarkomerstruktur, gute Fixierung auf dem Objektträger und passende Größe für die Bildprojektion. Ausgeschlossen wurden Zellen, die sichtbare Membranschäden, zytosolische Einschlusskörperchen, eine schlechte Fixierung oder unregelmäßige Kontraktionsmuster aufwiesen.



Abb. 14: Aufbau des Perfusionssystems und Auflichtmikroskops

Auflichtfluoreszenzmikroskop (2) und zuführende Leitungen und Gefäße (1) zur Zugabe der verschiedenen Lösungen (NT, Normaltyrode; ISO, Isoprenalin; FCCP, H^+ -Ionophor; CN, Cyanid) während der Messung. Das Deckgläschen mit den Kardiomyozyten wurde auf dem Objektstisch platziert (3) und mittels einer Heizung (4) auf $37^{\circ}C$ gehalten.

3.5.3 Stressprotokoll

Die Messungen an der IonOptix-Anlage folgten den bereits gut etablierten Versuchsabläufen der elektrophysiologischen Arbeitsgruppe unter der Leitung von Dr. rer. nat. M. Kohlhaas.

Jede Messung begann mit einer 0,5 Hz Feldstimulation der Zellen, während die Messkammer mit Normaltyrode (NT) umspült wurde. Diese Bedingungen wurden für 120 Sekunden beibehalten. Anschließend wurde eine physiologische Arbeitslaststeigerung simuliert. Zunächst wurde der β -adrenerge Agonist Isoprenalin (30 nM) eingewaschen. Isoprenalin aktiviert über den β_1 -Rezeptor die Adenylatzyklase. Der folgende Anstieg des zytosolischen cAMP-Spiegels aktiviert die Proteinkinase A, welche unter anderem die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle phosphoryliert und somit deren Offenwahrscheinlichkeit erhöht¹⁶⁶. Erhöhte zytosolische $[Ca^{2+}]_c$ steigern die Kontraktionskraft der Zellen¹⁶⁷. Bei Anschlagen des Isoprenalins konnte auf dem Monitor eine Zunahme der Kontraktionsamplitude beobachtet werden, woraufhin die Stimulationsfrequenz für 180 Sekunden auf 5 Hz erhöht und die Zelle weiterhin mit

Isoprenalin umspült wurde. Unter β -adrenerger Stimulation des Herzens kommt es zu einem Anstieg der Herzfrequenz. Die Hochfrequenz-Kontraktion von 5 Hz simuliert diesen Arbeitslastanstieg. Es folgte eine Auswasch-Phase (engl.: *wash out*; WO). Für ca. 60-80 Sekunden wurde die Stimulation auf 0,5 Hz und die Perfusion auf NT-Lösung umgestellt (siehe Abb. 15). Im Falle der NAD(P)H/FAD-Messung schloss sich dem Stressprotokoll eine Kallibrierungsphase an (siehe Abb. 16). Vor Beendigung eines jeden Versuchs wurde das Hintergrundfluoreszenzsignal gemessen, indem die Zelle aus dem Bild gespült wurde.

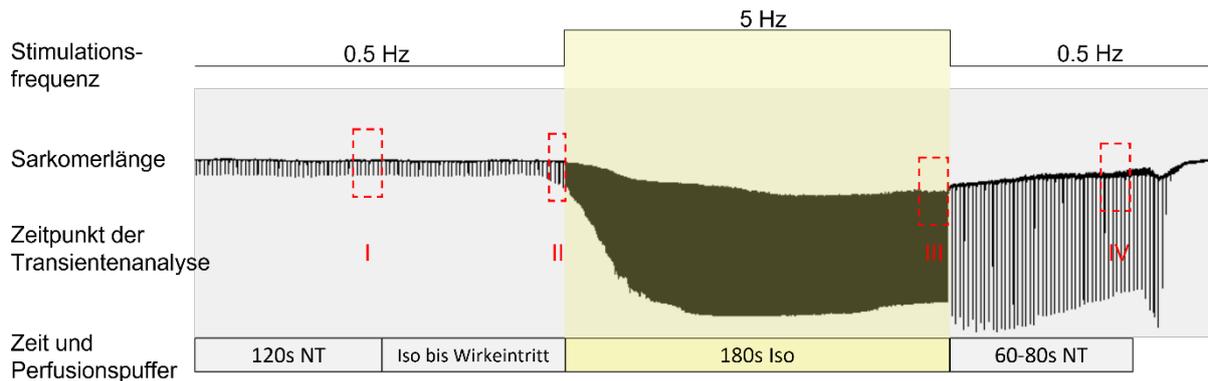


Abb. 15: Stressprotokoll

Native oder eingefärbte Kardiomyozyten wurden elektrisch feldstimuliert (0,5 Hz) und mit Normaltyrode (NT) inkubiert. Der β -Agonist Isoprenalin (Iso) wurde dem NT zugegeben und bei Wirkeintritt (Zunahme der Sarkomerlänge) die Frequenz für 180s auf 5 Hz erhöht. Schließlich wurde die Stimulationsrate wieder auf 0,5 Hz eingestellt und Isoprenalin ausgewaschen. Während dieses Protokolls wurden die Sarkomerlänge, die NAD(P)H- und die FAD⁺-Autofluoreszenz, $[Ca^{2+}]_c$ (mittels Indo-1) und $\Delta\Psi_m$ (mittels TMRM) gemessen. I-IV markieren die Zeitpunkte, zu denen die Auswertung repräsentativer Kontraktions- und $[Ca^{2+}]_c$ -Transienten erfolgte.

3.5.4 Messung der Kontraktilitätsparameter

Die Kontraktilitätsparameter wurden an nativen ungefärbten Kardiomyozyten bestimmt. Während des Messprotokolls wurden alle Kontraktionen der im Fokus stehenden Kardiomyozyten von der MyoCam mit einer Bildrate von 240 Hz aufgezeichnet. Darauf aufbauend konnten die Sarkomerlängen mittels digitaler Zellgeometrie kontinuierlich in Echtzeit erfasst werden. Die Software IonWizard 6.6 berechnete mittels mathematischer Modelle Parameter der Kontraktilität und Kontraktionskinetik durch numerische Approximation. Zeitpunkte der Transientenanalyse sind in Abb. 15 dargestellt und unter 3.9 beschrieben.

3.5.5 Messung des Redoxstatus

Die Energiegewinnung zur Sicherstellung der Herzfunktion ist hauptsächlich vom mitochondrialen Stoffwechsel abhängig. NADH und FADH₂ dienen als Elektronendonatoren für die mitochondriale Atmungskette, wodurch die ATP-Synthese stattfinden kann. Die Regeneration der oxidierten Redoxäquivalenten (NAD⁺ und FAD⁺) findet im Citratzyklus statt und kann durch eine erhöhte mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme in Stresssituationen angetrieben werden^{48,168}. Folglich geben die Redoxpaare NADH/NAD⁺ und FADH₂/FAD⁺ und der Quotient aus NADH/FAD⁺ zum einen Rückschlüsse auf den Redoxstatus und somit die metabolische Aktivität der Zelle; zum anderen dienen sie als empfindliche ratiometrische Indikatoren der stressinduzierten Citratzyklus-Aktivierung^{169,170}.

NAD(P)H/FAD⁺ wurde mittels derer Autofluoreszenzsignale gemessen. Zur Anregung der Autofluoreszenzemissionen von NAD(P)H/FAD⁺ muss Licht abwechselnd in den in Tabelle 21 genannten Wellenlängen λ_{exc} emittiert werden. Die Einstellung der Filter und Spiegel ist der Tabelle 22 zu entnehmen. Die NAD(P)H Fluoreszenz wird in PMT 1 gemessen, wogegen die FAD⁺ Fluoreszenz den Spiegel (S2) ungehindert passiert und damit in den PMT 2 gemessen wird (siehe Abb. 13).

Tabelle 21: Autofluoreszenz zur NAD(P)H- und FAD⁺-Bestimmung

λ_{exc} Anregungswellenlänge; λ_{em} Emissionswellenlänge. Das Fluoreszenzsignal bei $\lambda_{em} = 450$ nm setzt sich aus den Fluoreszenzen von NADH und NADPH (als NAD(P)H bezeichnet) zusammen¹⁷¹.

Indikator	Parameter	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)
NAD(P)H	NAD(P)H	340	450
FAD ⁺	FAD ⁺	488	525

Tabelle 22: Filter- und Spiegeleinstellungen zur NAD(P)H- und FAD⁺-Bestimmung

Lokalisation (Abb. 13)	Bezeichnung	Spiegel [nm]	Transmission [nm]
Mikroskop Filter	89017bsF/TR	340/490	435/>505
FW1	D340/12x	-	340 ± 6
FW2	S490/20x	-	490 ± 10
S1	650DCXR	< 650	> 650
S2	490DCLP	< 490	> 490
S3	Spiegel	alles	-
F1	D435/35x	-	435 ± 17,5
F2	D525/30x	-	525 ± 15

Im Falle der NAD(P)H/FAD⁺ Messung schließt sich dem Stressprotokoll (Abschnitt 3.5.3) eine Kalibrierungsphase an (siehe Abb. 16). Nach Auswaschen des Isoprenalin wurden folgende Reagenzien eingespült:

1. 5 μ M FCCP bis zur Ausbildung eines Plateaus
2. 4 mM Cyanid bis zur Ausbildung eines Plateaus

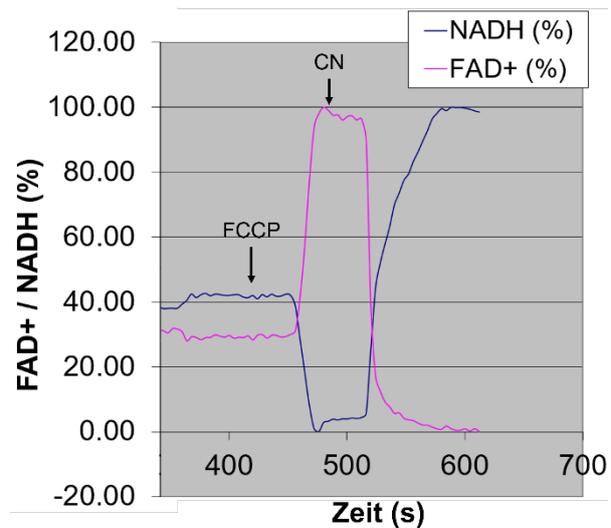


Abb. 16: Kalibrierung von NAD(P)H/FAD⁺

FAD⁺, oxidiertes Flavin-Adenin-Dinukleotid; NADH, reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid; CN, Cyanid; FCCP, H⁺-Ionophor

Das Ionophor FCCP wirkt als Entkoppler der mitochondrialen Atmungskette¹⁷². FCCP baut den Protonengradienten an der inneren Mitochondrienmembran ab, wodurch die ATP-Synthese gestört wird. Es folgt eine kompensatorische Aktivierung des Citratzyklus und der Substratkettenphosphorylierung. Somit liegen die Reduktionsäquivalente vollständig oxidiert vor (0% NAD(P)H, 100% FAD⁺). Wird nun Cyanid zugeführt hemmt dieses die Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV), wodurch der Elektronenfluss entlang der Atmungskette zum Stoppen kommt¹⁷³. Reduktionsäquivalente werden nicht mehr verbraucht, sodass sie sich in ihrer reduzierten Form anhäufen (100% NAD(P)H, 0% FAD⁺).

3.5.6 Messung der zytosolischen Kalziumkonzentration und des mitochondrialen Membranpotenzials

Die kardiale Kontraktilität wird durch Änderungen der zytosolischen Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_c$) reguliert. In den Kardiomyozyten beeinflusst die Ein- und Ausstromdynamik von Ca^{2+} neben der EC-Kopplung unter anderem auch die mitochondriale Funktion. Ein abnormes Ca^{2+} -Gleichgewicht beeinträchtigt somit die Kontraktilität und die mechano-energetische Anpassung. Folglich muss für eine adäquate Herzfunktion der Ca^{2+} -Fluss während der Systole und Diastole präzise reguliert werden^{27,28}. Indo-1 ist ein häufig verwendeter hochselektiver Ca^{2+} -Indikator.

In Form eines Acetoxymethylesters (AM) passiert der ratiometrische Fluoreszenzfarbstoff die Zellmembranen. Nach enzymatischer Hydrolyse der Esterbindung verbleibt Indo-1 im Zytosol und bindet Ca^{2+} -Ionen. Während Indo-1 an Ca^{2+} bindet, nimmt die Fluoreszenzemission bei 485 nm ab, während die Emission bei 405 nm zunimmt. Dementsprechend kann $[\text{Ca}^{2+}]_c$ durch Berechnung des Verhältnisses der emittierten Fluoreszenzintensitäten (F_{405}/F_{485}) bestimmt werden. Messartefakte wie die Gesamtfarbkonzentration werden so eliminiert^{174,175}.

Als Kation reichert sich TMRM, ein membranpermeabler Rhodamin-Fluoreszenzfarbstoff, im negativ geladenen Inneren der Mitochondrien an. Dies geschieht proportional zum $\Delta\Psi_m$ und verändert die Emissionswellenlänge $\lambda_{em(\text{TMRM})}$. Da TMRM keine toxische Wirkung auf das Mitochondrium hat, ist es für die empfindliche Messung von $\Delta\Psi_m$ in verschiedenen Zelltypen geeignet¹⁷⁶. Zur Anregung der Fluoreszenzemissionen von Indo-1 und TMRM muss das Licht die in Tabelle 23 genannten Wellenlängen λ_{exc} annehmen.

Tabelle 23: Fluoreszenzfarbstoffe zur Messung von $[\text{Ca}^{2+}]_c$ und $\Delta\Psi_m$

λ_{exc} Anregungswellenlänge; λ_{em} Emissionswellenlänge

Indikator	Parameter	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)
Indo-1 (AM)	$[\text{Ca}^{2+}]_c$	340	405/485
TMRM	$\Delta\Psi_m$	540	605

Die Messung von $[\text{Ca}^{2+}]_c$ und $\Delta\Psi_m$ im Verlauf des Stressprotokolls erfolgte an Farbstoff-beladenen Kardiomyozyten. Zur Kardiomyozytenfärbung wurden 1 ml Zellsuspension mit Indo-1 (1mM, gelöst in Pluronic® F-127 20%) zunächst 15 Minuten liegend, dann 5 Minuten stehend bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet mit NT auf 1 ml aufgefüllt. Daraufhin wurde die Kardiomyozytenlösung mit TMRM (0,025 μM) 5 Minuten stehend und 5 Minuten liegend zur Sedimentation inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit ca.1 ml NT-Lösung resuspendiert. Die eingefärbte Zellsuspension wurde nun auf die Messkammer ausplattiert.

Die Einstellung der Filter und Spiegel ist der Tabelle 24 zu entnehmen. Der Versuch wurde gemäß dem Stressprotokoll durchgeführt, welches in Abschnitt 3.5.3 beschrieben ist.

Tabelle 24: Filter- und Spiegeleinstellungen zur Messung von $[Ca^{2+}]_c$ und $\Delta\Psi_m$

Lokalisation (Abb. 13)	Bezeichnung	Spiegel [nm]	Transmission [nm]
Mikroskop Filter	365/535pc	340 / 540	405/485/ >600
FW	D340/12x	-	340 ± 6
S1	650DCXR	< 650	> 650
S2	490DCLP	< 490	> 490
S3	515DCXR	< 515	> 515
F1	D405/30x	-	405 ± 15
F2	D485/30x	-	485 ± 15
F3	D605/55x	-	405 ± 27,5

3.6 Ermittlung der zellulären Arrhythmie-Neigung

Daten zur Analyse der zellulären Arrhythmie-Neigung wurden den Fluoreszenzmessungen von NAD(P)H/NAD(P)⁺ und FADH₂/FAD⁺ extrahiert. Die Anzahl der nicht-stimulierten Schläge (d.h. spontane systolische Sarkomerverkürzungen) unbelasteter Kardiomyozyten wurde innerhalb der ersten 20s nach Reduktion der Stimulationsfrequenz von 5 auf 0,5 Hz gezählt. Während dieser Zeit wurde der Puffer auf NT-Lösung umgestellt und Isoprenalin langsam ausgewaschen. Regulär treten in diesem Zeitraum 10 stimulierte Schläge pro Zelle auf. Autonome, von der elektrischen Stimulation abgekoppelte Sarkomerverkürzungen wurden als "zelluläre Arrhythmien" kategorisiert. Der Anteil der Zellen, welche zelluläre Arrhythmien aufwiesen, wurde zwischen den Genotypen verglichen. Abb. 17 stellt beispielhaft eine als rhythmisch und eine als arrhythmisch kategorisierte Zelle dar.

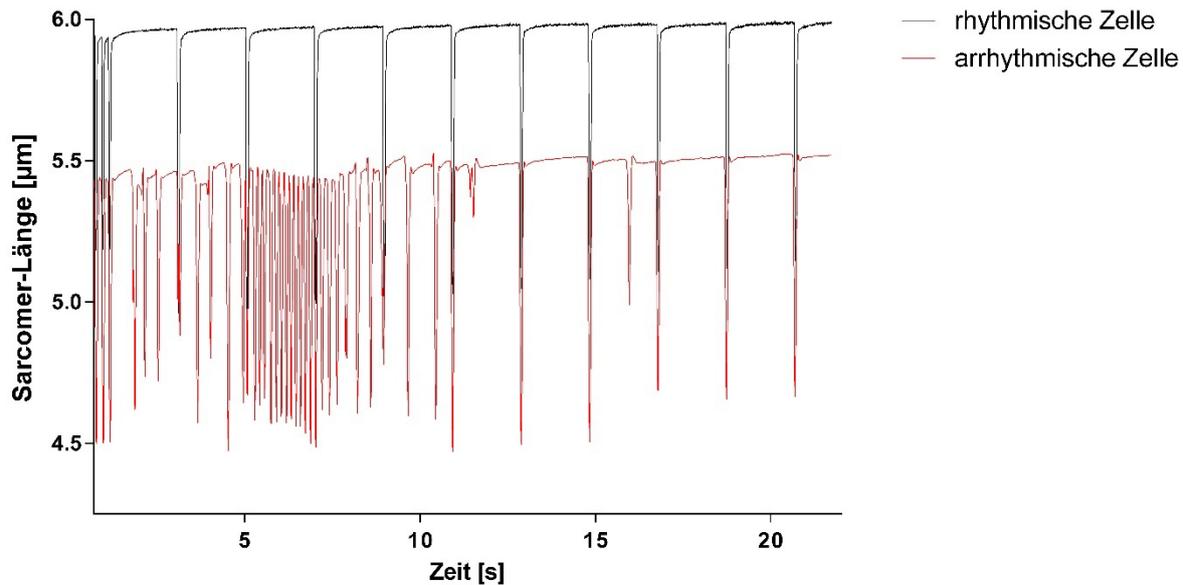


Abb. 17: Sarkomerverkürzung rhythmischer und arrhythmischer Kardiomyozyten

Die Sarkomerverkürzungen wurden bei einzelnen Kardiomyozyten während einer 0.5 Hz-Stimulation nach dem Iso/5Hz-Belastungsprotokoll aufgenommen. Bei der rhythmischen Zelle ist eine regelmäßige Sarkomerverkürzung als Reaktion auf die getriggerten Feldstimulationsimpulse zu beobachten, während in der arrhythmischen Zelle autonome, von der elektrischen Stimulation entkoppelte Sarkomerverkürzungen auftreten, die als "zelluläre Arrhythmien" kategorisiert wurden.

3.7 Isolation der Mitochondrien

Für die Durchführung der Mitochondrienisolation erhielt ich freundlicherweise die Unterstützung von Dr. rer. nat. Alexander Nickel und der technischen Assistentin Anja Sauer der Core facility „Mitochondriale Funktion“. Die Isolation der Mitochondrien aus adulten Mausherzen erfolgte nach einer etablierten Methode optimiert für kleine Gewebeproben¹⁷⁷. Um eine qualitativ hochwertige Isolation zu gewährleisten, müssen alle verwendeten Materialien sowie das gewonnene Gewebematerial während der gesamten Isolation auf Eis gelagert werden. Zudem sind die Zentrifugalschritte bei 4°C durchzuführen. Die Versuchsm Maus wurde mittels zervikaler Dislokation euthanisiert, das Herz anschließend via Thorakotomie chirurgisch entfernt und direkt in eine mit isotonischer Isolutionslösung befüllten Zellkulturschale auf Eis platziert. Die Präparation des Herzens erfolgte in der Isolutionslösung (siehe Tabelle 10).

Die Ventrikel wurden von Vorhöfen und nicht-myokardialen Gewebe getrennt, der Länge nach eingeschnitten und vorsichtig zur Lösung des restlichen Blutes in der eiskalten Isolutionslösung geschwenkt. Die gereinigten Ventrikel wurden daraufhin in ein Eppendorf Gefäß mit 500 µl BSA/Proteinase-Lösung (siehe Tabelle 11) überführt und mittels einer Präparationsschere zerkleinert. Der Inhalt des Gefäßes wurde anschließend in einen Potter-Elvehjem-Gewebemogenisator überführt und manuell für 7 Minuten homogenisiert. Dem Gemisch wurde erneut 500 µl der BSA/Proteinase-

Lösung zugegeben und weitere 7 Minuten homogenisiert. Das so entstandene Homogenisat wurde in ein 2ml Eppendorf Gefäß pipettiert und bei niedriger Geschwindigkeit zentrifugiert (480g, 5 min, 4°C). Der Überstand, welcher zu diesem Zeitpunkt aus Cytosol und Zellorganellen besteht, wurde in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und das entstandene Pellet verworfen. Die erneute Zentrifugation des umgefüllten Überstands bei 7.700g für 10 Minuten lässt Cytosol und Mitochondrien voneinander absetzen. Der Überstand, die zytosolische Fraktion, wurde abpipettiert und das Pellet, in welchem sich die Mitochondrien befinden, mit 400µl Mitochondrien Suspensionslösung (MSS; siehe Tabelle 10) resuspendiert, mit 1ml MSS gewaschen und bei 7.700g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Reinigungsschritt (Resuspension, Auffüllen, Zentrifugation) wurde ein zweites Mal wiederholt. Das Pellet aus dem letzten Zentrifugationsschritt wurde in 100-150µl MSS je nach Pelletgröße resuspendiert und zur Proteinbestimmung herangezogen.

Die Proteinbestimmung wurde anhand einer photometrischen Extinktionsmessung nach Lowry et al. mittels Bio-Rad Dc Protein Assay durchgeführt¹⁷⁸. In ein 2ml Eppendorf Gefäß wurden 2µl der Mitochondrienlösung mit 18µl destilliertem Wasser verdünnt. Danach wurde dem Reaktionsgefäß zunächst 100µl Protein Assay Reagent A zur Bildung eines blauvioletten Komplexes und anschließend 800µl Protein Assay Reagent B zur Bildung von Molybdänblau hinzugefügt und durch mehrmaliges Vortexen gut durchmischt. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Mischung erneut gevortext, um daraufhin bei 750nm Wellenlänge die Extinktion der Probe gegen einen Leerwert zu messen. Die Berechnung der Proteinkonzentration der isolierten Mitochondrien erfolgte anhand einer Kalibrierungskurve, die vorab aus unterschiedlichen Konzentrationen von Bovinem Serum Albumin (BSA) bestimmt wurde. Zur Bestimmung der finalen Proteinkonzentration aller Proben wurde der Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung gebildet. Das verwendete Pipettierschema zeigt Tabelle 25.

Tabelle 25: Pipettierschema zur Mitochondrien-Proteinbestimmung

Reagenz	Messung	Leerwert
Wasser	18 µl	20 µl
Probe	2 µl	-
Reagenz A	100 µl	100 µl
Reagenz B	800 µl	800 µl

3.8 Respirations- und Fluoreszenzmessungen mit dem Oroboros®-System

3.8.1 Grundlagen der Clark-Elektrode

Mit Hilfe einer Clark-Elektrode lässt sich der Sauerstoffgehalt einer Lösung polarographisch bestimmen. Die Grundlagen hierfür wurden 1953 von Leland Clark entwickelt¹⁷⁹. Die Elektrode befindet sich in einer Luft-abgeschlossenen Reaktionskammer und besteht aus einer Platin-Kathode und einer Silber-Anode, welche über eine Elektrolytlösung (KCl-Lösung 1M) in Verbindung stehen. Eine ultradünne semipermeable Teflonmembran überzieht die Elektrode, über welche O₂ die Kathode erreicht^{180,181}. Um Löslichkeit und Diffusion des O₂ konstant zu halten, wird die Messkammer auf 37°C temperiert und die Elektrolytlösung konstant durch einen Magnetrührer in Bewegung gehalten^{180,182}. Der während der Atmungsmessung in der Reaktionskammer anfallende O₂ diffundiert entlang seines Konzentrationsgradienten durch die semipermeable Membran zur Kathode. Durch Anlegen einer Polarisierungsspannung von 0,4 - 0,8 Volt werden an der Kathode O₂ reduziert und zu Hydroxid-Ionen (OH⁻) umgewandelt, wobei die Kathode als Elektronendonator fungiert. An der Anode werden simultan Silberionen oxidiert, wodurch freie Elektronen entstehen¹⁸². Die somit entstehenden freien Elektronen generieren einen elektrischen Stromfluss. Dieser Strom ist direkt proportional zu der Anzahl des reduzierten O₂ und kann mittels eines Nanoamperemeters gemessen werden¹⁸¹. Demnach ist der an der Elektrode gemessene Strom ein adäquates Maß für die Veränderung des O₂-Gehaltes in der Reaktionskammer¹⁸³.

Der O₂-Verbrauch von isolierten Mitochondrien wurde von Dr. rer. nat. Alexander Nickel und der technischen Assistentin Anja Sauer der Core facility „Mitochondriale Funktion“ an Oroboros-2k Oxygraphen (Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich) mithilfe einer Clark-Elektrode gemessen. Die zugehörige Software von Oroboros (DatLab 7.4) ermöglichte den an der Elektrode gemessenen Strom aufzuzeichnen und in die O₂-Konzentration in der Reaktionskammer umzurechnen.

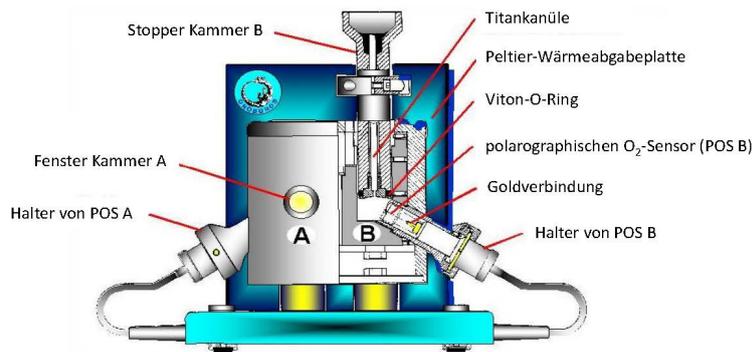


Abb. 18: Aufbau des Oroburos-2k-Oxygraphen

Der Oroburos-2k-Oxygraph ist als Zweikammer-Titrations-Injektions-Respirometer konzipiert, wobei die Glaskammern (B) mit einem Fenster (A) ausgestattet sind. Die zylindrischen Glaskammern werden durch Stopfen (Stopper Kammer A / B) mit einer konischen Titanplatte verschlossen, die mit der Titankanüle verbunden ist und durch einen Viton-O-Ring abgedichtet wird, um O_2 -Diffusion aus dem System zu verhindern. Die Temperatur wird durch ein eingebaute Peltier-Thermostat reguliert. Die elektrochemische Reduktion von O_2 wird durch den polarographischen O_2 -Sensor (*polarographic oxygen sensor*; POS) registriert und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Reproduziert nach¹⁸⁴.

3.8.2 Polarographische Atmungsmessung an isolierten Mitochondrien

Die Messungen mit dem Oroburos System (siehe Abb. 18) folgen einem bestimmten Protokoll, anhand dessen man verschiedene Zustände der mitochondrialen Atmung definieren kann. Die Erstbeschreibung der sogenannten Atmungsstates isolierter Mitochondrien erfolgte 1955 durch Chance and Williams¹⁸⁵.

Vor jeder Messung wurde die Messkammer zunächst mehrfach mit Ethanol gespült, um sie dann gründlich mit Wasser durch mehrfaches Spülen von dem Ethanol komplett zu reinigen. Die Kammer wurde konstant auf 37°C temperiert. Pro Messung wurden 2,1ml Atmungspuffer in die Kammer gegeben und durch den Magnetrührer stetig durchmischt. Dem Atmungspuffer wurde ein Mitochondrien Gehalt von $400\mu\text{g}$ beigemischt.

Nach einer kurzen Stabilisierungsphase stellt sich der sogenannte State 1 der Atmungsmessung ein. Im State 1 wird die mitochondriale Atmung durch das Fehlen von ADP und Substrat limitiert. Zur Initiierung des State 2 wurden mithilfe einer Hamilton-Spritze exogene Substrate in die Messkammer injiziert und für 3min gemessen. Je nach Protokoll wurden entweder Substrate der zellulären Glykolyse, Pyruvat und Malat (je 5mM , 1:1 Mix), oder der β -Oxidation, ein physiologisches Fettsäuren-Gemisch ($10\mu\text{M}$ Carnitin, 3mM Malat, $10\mu\text{M}$ Palmitoyl-CoA, $10\mu\text{M}$ Oleoyl-L-Carnitin), gewählt. Sowohl bei Zugabe von Pyruvat und Malat als auch beim Fettsäuren-Gemisch entsteht NADH im Citratzyklus, dessen Elektronen auf Komplex I der ETC, übertragen wird³⁸. Im State 2 ist die Atmung durch das Fehlen von ADP begrenzt, und der O_2 -Verbrauch ist hauptsächlich auf H^+ -Leck in der IMM

zurückzuführen¹⁸⁵. Anschließend wurde die oxidative Phosphorylierung stimuliert durch sequenzielle Injektionen von je 10µl ADP in steigender Konzentration (70µM, 200µM, 700µM), wodurch State 3 erreicht wurde. Durch die finale Zugabe von ADP in supramaximaler Konzentration (0,7mM) stellte sich ein stabiler State 3 ein. Der hierbei registrierte O₂-Verbrauch ist eine wichtige Kenngröße zur Einschätzung der Atmungsaktivität der Mitochondrien, da in diesem Zustand der Elektronenfluss über die Atmungskette und die ATP-Regenerierung an der F1F0-ATPase maximal stimuliert werden¹⁸⁵.

Im Kohlenhydratprotokoll wurde zusätzlich nach State 3 selektiv der Komplex II-abhängige Sauerstoffverbrauch untersucht. Nach der Hemmung von Komplex I durch Rotenon (0,5µM), um einen reversen Elektronenfluss zu verhindern, wurde Succinat (10mM) zugegeben. Succinat ist ein Substrat des Krebszyklus, das FADH₂ produziert, welches wiederum seine Elektronen auf den Komplex II der ETC überträgt⁵⁶.

Der State 4 wurde durch die Zugabe von Oligomycin (1,2µM), ein Hemmstoff der F1F0-ATPase¹⁸⁶, induziert. Die in State 4 artifiziell herbeigeführte Unterbindung der ADP-Phosphorylierung dient der Beurteilung der mitochondrialen Integrität. In geschädigten Mitochondrien findet durch eine fehlerhafte Funktion der IMM ein H⁺-Fluss statt, der im State 4 eine Restatmung, die sog. „Leak-Atmung“ registrieren ließ¹⁸⁷. Dagegen werden bei intakten Mitochondrien in State 4 Atmungswerte in der Größenordnung vergleichbar mit der State 2-Atmung registriert. Die Elektronentransferkapazität wurde durch schrittweise Titration mit dem Ionophor 2,4-Dinitrophenol (DNP; jeweils 10µM) gemessen, um den Elektronentransfer in den Mitochondrien von der Phosphorylierung zu entkoppeln und so den Zustand der ungekoppelten Atmung (State 3u) zu bestimmen.

Setzt man den O₂-Verbrauch in State 3 ins Verhältnis zu dem in State 2, so erhält man den respiratorischen Kontrollindex (RCR; engl.; *respiratory control ratio*). Dieser ist ein Maß für die Kopplung des Elektronentransportes und die oxidative Phosphorylierung und gibt damit Aufschluss über die Funktionalität der Mitochondrien. Demnach deutet ein niedriger RCR auf geschädigte Mitochondrien hin¹⁸⁸.

Es ist zu beachten, dass die Definitionen der Atmungsstates, die in dieser Arbeit verwendet wurden (siehe Tabelle 26), von der in den ursprünglichen Studien von Chance und Williams abweicht. Aufgezeichnet und ausgewertet wurden die mitochondrialen Atmungsmessungen mithilfe der zugehörigen Software von Oroboros (DatLab 7.4) und Microsoft Excel 2010. Graphische Darstellungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism Version 6.01 erstellt. Abb. 19 stellt exemplarisch je eine respiratorische Messung mit Fettsäuren oder Pyruvat/Malat als Substraten dar.

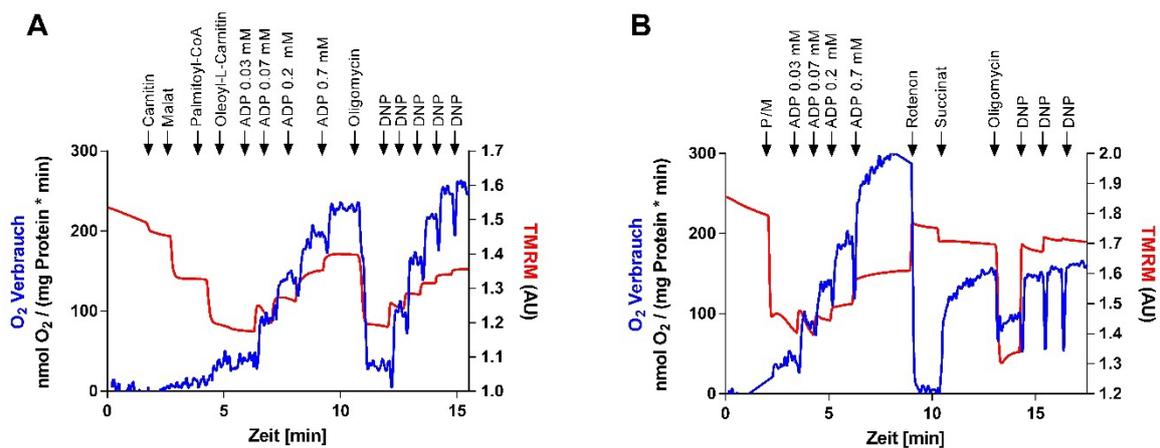


Abb. 19: Exemplarische Messung der mitochondrialen Atmung und $\Delta\Psi_m$

Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Verlauf des Fettsäuren- und Kohlenhydrat-Protokolls. Gemessen wurde neben dem O_2 -Verbrauch das $\Delta\Psi_m$ mittels TMRM-Fluoreszenz, jeweils nach Zugabe von Substrat (state 2), bei Zugabe steigender ADP-Konzentrationen (state 3), nach Oligomycin-Behandlung (state 4) und nach DNP(2,4-Dinitrophenol)-Zugabe (state 3u). Bei Polarisierung des $\Delta\Psi_m$ nimmt die TMRM-Fluoreszenz aufgrund der Abschwächung der TMRM-Fluoreszenz ab, während bei Depolarisation die Fluoreszenz aufgrund der Verstärkung des Signals zunimmt. Als Substrate wurden jeweils Carnitin, Malat, Palmitoyl-CoA und Oleoyl-L-Carnitin im Rahmen der Fettsäuren-Atmung (A), oder Pyruvat, Malat (P/M) und Succinat im Rahmen der Kohlenhydrat-Atmung (B) verwendet, wobei ein reverser Elektronenfluss mittels Rotenon-Zugabe vor der Succinat-Zugabe verhindert wurde.

Tabelle 26: Definition der verwendeten Atmungsstates

Atmungsstate	Definition
State 1	Mitochondrien
State 2	Mitochondrien + Substrate
State 3	Mitochondrien + ADP + Substrate
State 4	Inhibition des Komplex V durch Oligomycin
State 3u	Entkopplung der Mitochondrien durch DNP

3.8.3 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzials

Das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) wurde mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs TMRM (1 μM) und Smart Fluo-Sensor Green (Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich) gemessen. Das Oroboros-Modul ist mit Filtersätzen für TMRM ausgestattet (Anregung, 530 ± 21 nm; Emission, 592 ± 22 nm), sodass dessen Signal gleichzeitig zu der mitochondrialen Atmung gemessen werden konnte. TMRM ist ein zellpermeabler kationischer lipophiler roter Fluoreszenzfarbstoff, der von Mitochondrien im Verhältnis zum $\Delta\Psi_m$ akkumuliert wird. Die Fluoreszenzintensität wird abgeschwächt, wenn sich der Farbstoff in der Matrix der Mitochondrien anreichert^{176,189}. Bei Dissipation des $\Delta\Psi_m$ kommt es zu einer Umverteilung von TMRM in den Puffer, wodurch die Fluoreszenz ansteigt. Somit verhält sich das Signal invers zu der Veränderung des Membranpotentials⁵⁶ (siehe Abb. 19).

3.8.4 Messung der mitochondrialen H_2O_2 -Emission

Die Quantifizierung der Wasserstoffperoxid- (H_2O_2)-Produktion der Mitochondrien wurde mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Amplex®UltraRed (AUR) (Life Technologies, Molecular Probes®) bestimmt. Das farblose AUR wird in Anwesenheit von H_2O_2 durch das Enzym Horseradish Peroxidase (HRP) in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 zu Resorufin umgesetzt. Resorufin ist ein stark fluoreszierendes Molekül mit einer Exzitations-/Emissionswellenlänge von 535/595 nm¹⁹⁰. Der Assay wurde bei 37°C an einem Oxygraph-2k-Respirometer mit einer Smart Fluo-Sensor Green-Einheit durchgeführt¹⁹⁰. Die Konzentrationen der Testreagenzien betragen 10 μM für AUR, 0,5 U/ml für HRP (Sigma-Aldrich, Schnellendorf) und 100 U/ml für Superoxiddismutase (SOD) (Sigma-Aldrich, Schnellendorf). Die SOD wandelt $\cdot\text{O}_2^-$ zu H_2O_2 um⁴⁸ und stellt somit sicher, dass alle anfallenden ROS der Mitochondrien detektierbar waren. Die H_2O_2 -Emission wurde in Gegenwart von Substrat (jeweils P/M oder Fettsäuren) und nach Zugabe von 1 mM ADP gemessen. Anschließend wurde der Komplex-III-Inhibitor Antimycin A (1,5 μM) (Sigma-Aldrich, Schnellendorf) als Positivkontrolle hinzugefügt, um die maximale ROS-Bildung an der ETC zu induzieren.

Zu beachten gilt, dass AUR nicht in die Mitochondrien eindringt und daher das mit diesem Indikator gemessene H_2O_2 dem Nettoergebnis seiner Produktion und Entgiftung durch mitochondriale antioxidative Systeme entspricht. Auch der Einfluss der H_2O_2 -Produktion im Intermembranraum und in der äußeren Mitochondrienmembran kann nicht abgegrenzt werden¹⁹¹. Die Messung von AUR entspricht folglich der extramitochondrialen H_2O_2 -Emission.

3.9 Auswertung und Statistik der Ergebnisse

Die Auswertung der mit dem IonOptix®-System erhobenen Daten erfolgte unter Anleitung von Dr. rer. nat. M. Kohlhaas. NAD(P)H/FAD⁺ und TMRM-Daten wurden exportiert, anhand der 5 Hz-Periode synchronisiert und kalibriert. Kontraktilitäts- und Ca²⁺-Parameter wurden durch Mittelung und Analyse von Transienten zu den in Abb. 15 dargestellten Zeitpunkten (I-IV) bestimmt:

- I) NT 0,5 Hz: 5-10 Transienten direkt vor Isoprenalinzugabe
- II) Iso 0,5 Hz: die 3 letzten Transienten vor der 5 Hz-Stimulation
- III) Iso 5 Hz: 5-10 Transienten am Ende der 5 Hz-Stimulation (*steady state*)
- IV) Wash-Out (WO): 5-10 Transienten vor Beginn der Kalibrierung

Die Analyse der mit dem Oroboros®-System erhobenen Daten erfolgte unter Anleitung von Dr. rer. nat. A. Nickel. Die Respirations-, TMRM- und H₂O₂-Daten wurden mithilfe des Oroboros-Programms (DatLab 7.4) analysiert. Zur weiteren Auswertung wurden sämtliche Messwerte aus den jeweiligen Programmen (IonWizard, Oxygraph Plus) in Microsoft Excel 2010 exportiert und nach Versuchsgruppe sortiert.

Die graphischen Darstellungen und statistischen Auswertungen wurden mit GraphPad Prism Version 6.01 für Windows (GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde durch einen ungepaarten t-Test, einem Mann-Whitney U Test, einer two-way ANOVA-Analyse mit Bonferroni Posttest und einem Fischer's Exact Test ermittelt. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Einzelne Messwerte wurden als arithmetischer Mittelwert (MW) +/- Standardabweichung des Mittelwerts (SEM = Varianz / \sqrt{n} ; n = Anzahl der Experimente) zusammengefasst.

4 Ergebnisse

4.1 RNA-Analysen

Zur Quantifizierung der Effektivität des konditionellen Knockouts von *PKP2* und *JUP* wurde die totale mRNA aus Herzmuskelgewebe der transgenen Mäuse und Kontrollen extrahiert und die *PKP2* bzw. *JUP*-Transkripte verglichen.

Die Analyse der totalen mRNA-Extrakte aus Mausherzen von *PKP2* und Kontrollen im Alter von **acht Wochen** zeigte, dass der konditionale Knockout von *PKP2* ausreichte, um die *PKP2*-mRNA-Spiegel im Vergleich zu den Kontrollen signifikant zu erniedrigen. Die qPCR zeigte eine Verringerung der *PKP2*-mRNA-Konzentration um das 18.6 ± 4.0 -Fache im Vergleich zu Kontrollen (Abb. 20: A).

Die *JUP*-Expression in Mausherzen der PG KO war im Vergleich zu den Kontrollen im Alter von **sechs Wochen** signifikant erniedrigt. Die qPCR bestätigte eine Verringerung der *JUP*-mRNA-Konzentration um das 2.9 ± 0.3 -Fache im Vergleich zu Kontrollen (Abb. 20: B).

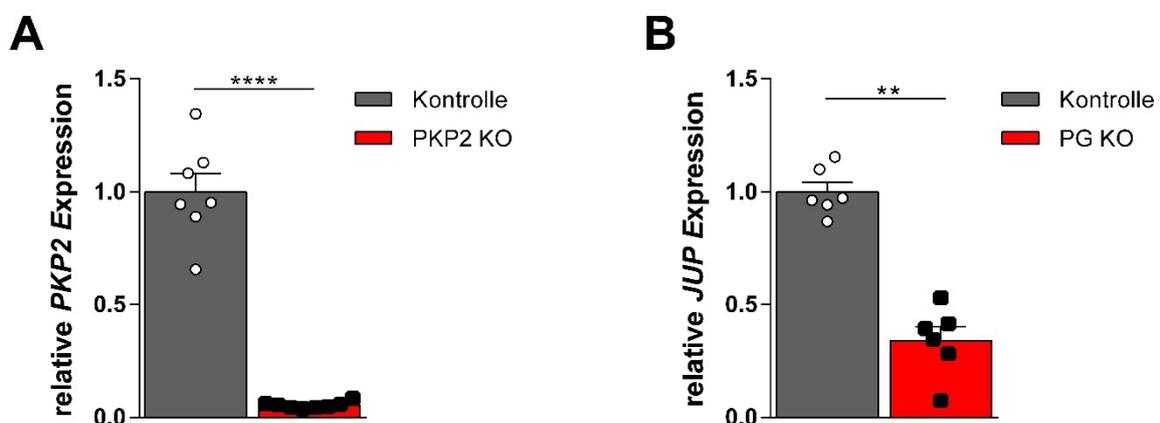


Abb. 20: *PKP2* bzw. *JUP* Expression in KO und Kontrollen im Alter von acht bzw. sechs Wochen

Die aus Kontroll- und KO- Herzen extrahierte RNA wurde mittels qPCR auf (A) *PKP2* bzw. (B) *JUP* mRNA-Spiegel untersucht. Als Referenzgen diente *Rpl4*. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM. Es wurden für A: Kontrollen n=7; *PKP2* KO n=8 und für B: Kontrollen n=6; PG KO n=6 Mausherzen verwendet. Statistische Signifikanz wurde anhand des ungepaarten t-Test; **** p = <0,001 bzw. dem Mann-Whitney-U-Test; ** p = <0,01 berechnet.

4.2 Ergebnisse der Messungen am IonOptix®-System

Kardiale Mitochondrien werden stark durch Ca^{2+} und ADP beeinflusst. Als komplementäre Modulatoren der oxidativen Phosphorylierung adjustieren Ca^{2+} und ADP das Energieangebot an den Bedarf, aber halten auch die antioxidative Kapazität ausreichend reduziert, um übermäßige ROS-Emission zu verhindern³⁰. Um diese eng regulierten Prozesse von EC-Kopplung und mitochondrialer Funktion genauer zu beleuchten, wurde die Kontraktilität, zytosolische Kalziumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), Redox-Status und mitochondriales Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) in arbeitenden Kardiomyozyten mittels des IonOptix®-Systems untersucht. Isolierte Kardiomyozyten der Versuchsgruppen wurden hierfür dem in 3.5.3 beschriebenen Stressprotokoll unterzogen, um einen physiologischen Anstieg der Arbeitsbelastung zu simulieren.

4.2.1 Kontraktilitätsmessungen

Unterschiede der Kontraktilitätsparameter zwischen den Kardiomyozyten wurden anhand des Stressprotokolls zu den in Abb. 15 gezeigten Zeitpunkten untersucht. Gegenstand der Kontraktilitätsuntersuchungen waren diastolische und systolische Sarkomerlänge (SL), fractional shortening (FS), Zeit bis zur maximalen Sarkomerverkürzung („Time-to-Peak“; TTP) sowie Relaxationskinetik (RT) anhand der Zeit bis zur 50- und 90-prozentigen Sarkomerrelaxation ($\text{RT}_{50\%}$; $\text{RT}_{90\%}$).

4.2.1.1 Plakophilin 2

Kontraktilitätsparameter der PKP2-Versuchsgruppen wurde bei vier-, acht- und zwölf-Wochen alten Tieren erhoben, um den zeitlichen Verlauf der Krankheitsentwicklung zu rekonstruieren. Bei **vier Wochen** alten PKP2 KO Kardiomyozyten wurden sowohl diastolische als auch systolische signifikant kürzere Sarkomerlängen im Vergleich zu gleichaltrigen Kontroll-Kardiomyozyten gemessen. Die signifikante Verkürzung der PKP2 KO-Sarkomere zeigte sich zu jedem Zeitpunkt der Analyse und blieb somit während des Messprotokolls konstant. Die bei den PKP2 KO-Kardiomyozyten zu beobachtende diastolische kürzere Sarkomerlänge ist durch eine konstante Vorspannung der Sarkomere im Sinne einer diastolischen Dysfunktion bedingt (Abb. 21: A). Das fractional shortening (FS) stellt die prozentuale Sarkomerverkürzung bezogen auf die Baseline dar. Das FS der Sarkomere wies keine signifikanten Unterschiede auf. Zu beobachten ist, dass unter Einfluss des β -adrenergen Agonisten Isoprenalin das FS in beiden Versuchsgruppen gleichermaßen zunahm, jedoch die PKP2 KO-Zellen während der folgenden 5 Hz Periode das FS weniger stark steigerten

als die Kontroll-Zellen. Die anschließende Erholung während des Washouts findet in beiden Versuchsgruppen in gleichem Maße statt (siehe Abb. 21: B). Die Dauer, die zum Erreichen der maximalen Kontraktion benötigt wurde (TTP), unterschied sich nicht zwischen PKP2 KO- und CTR.-Kardiomyozyten (Abb. 21: C). Beide Relaxationszeiten ($RT_{50\%}$, $RT_{90\%}$) waren in PKP2 KO-Zellen signifikant schneller als in Kontrollen; wobei die stärkste Abweichung unter basalen Bedingungen und unter Einfluss von Isopropanol (0,5 Hz; Iso) auftrat (Abb. 21: D).

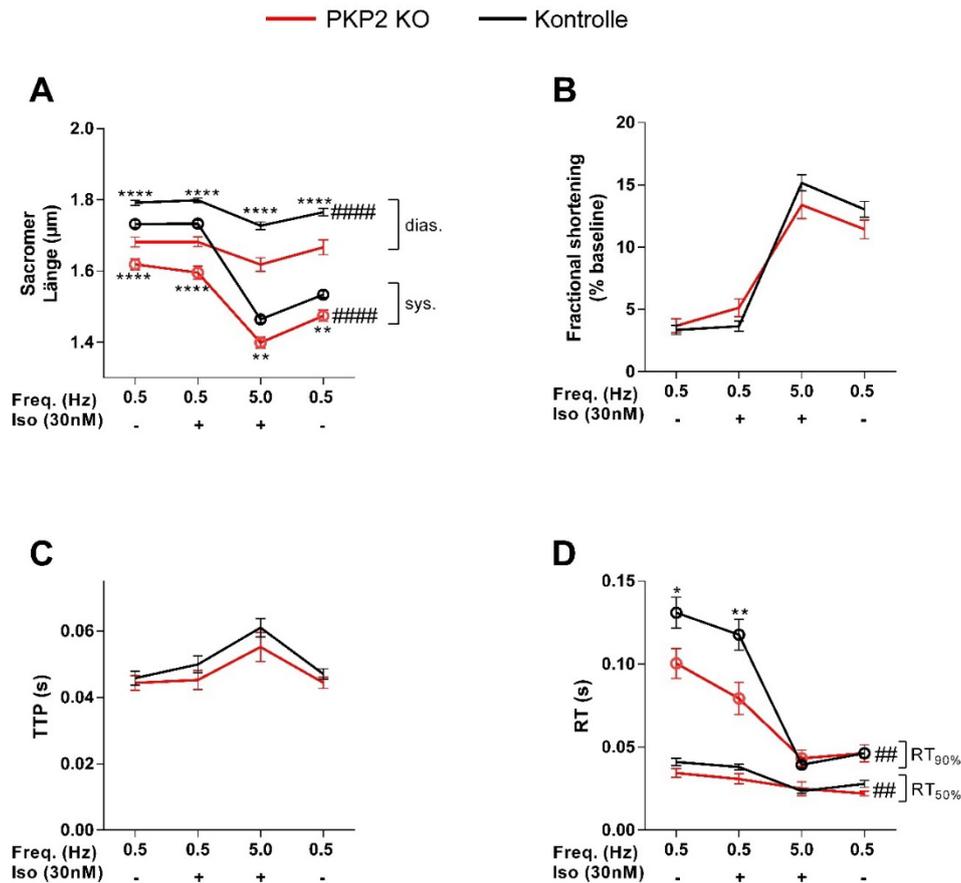


Abb. 21: Kontraktilität bei vier Wochen alten PKP2 KO Kardiomyozyten

Kontraktionen unbelasteter isolierter Kardiomyozyten wurden während des Stressprotokolls aufgezeichnet und anhand folgender Parameter analysiert: (A) diastolische und systolische Sarkomerlänge. (B) Fractional shortening in Prozent vom Basalwert. (C) Time to peak (TTP): Zeit bis zum Erreichen der maximalen Kontraktion. (D) Relaxationszeit (Relaxation time) bis 50% und 90% ($RT_{50\%}$; $RT_{90\%}$) zur Baseline. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM. Es wurden für Kontrollen $n=36/3$, für PKP2 KO $n=23/3$ Zellen/Mäuseherzen verwendet. P-Werte wurden mittels two-way ANOVA und einem Bonferroni-Post-hoc-Test für Mehrfachvergleiche berechnet. ##, ##### = $p < 0,01$; $0,0001$ (two-way ANOVA); *, **, **** = $p < 0,05$; $0,01$; $0,0001$ (Bonferroni's multiple comparisons test).

Der Vergleich der Kardiomyozyten der **acht Wochen** alten Versuchstiere zeigte signifikante Unterschiede hinsichtlich der Sarkomerlänge. Sarkomere der PKP2 KO-Herzmuskelzellen waren sowohl während der Diastole als auch während der Systole zu jedem Analysezeitpunkt signifikant kürzer als die der Kontroll-Herzmuskelzellen. Die diastolische Dysfunktion, die bereits im Alter von vier Wochen zu beobachten war

(Abb. 21: A), zeigt sich somit ebenfalls bei den acht Wochen alten Kardiomyozyten (Abb. 22: A). Gleichzeitig deutet die stark ausgeprägte Sarkomerverkürzung der acht Wochen alten PKP2 KO während der Systole auf eine systolische Überfunktion hin. Bestätigt wird dies durch das erhöhte FS der transgenen Zellen. Sowohl zu Beginn der Messung als auch während des Intervalls mit erhöhter Arbeitslast (ab 0,5 Hz; Iso +) weisen PKP2 KO-Zellen ein verstärktes FS auf. Unter dem Einfluss des Isoprenalins nahm das FS in beiden Versuchsgruppen gleichermaßen zu, erreichte zum Zeitpunkt der stärksten Arbeitslast bei 5 Hz das Maximum, um anschließend sich wieder zu erholen (Abb. 22: B). Die TTP wies keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 22: C). PKP2 KO-Kardiomyozyten relaxierten schneller als Zellen der Kontrolltiere. Sowohl $RT_{50\%}$ als auch $RT_{90\%}$ waren unter basalen Bedingungen für PKP2 KO signifikant erniedrigt (Abb. 22: D).

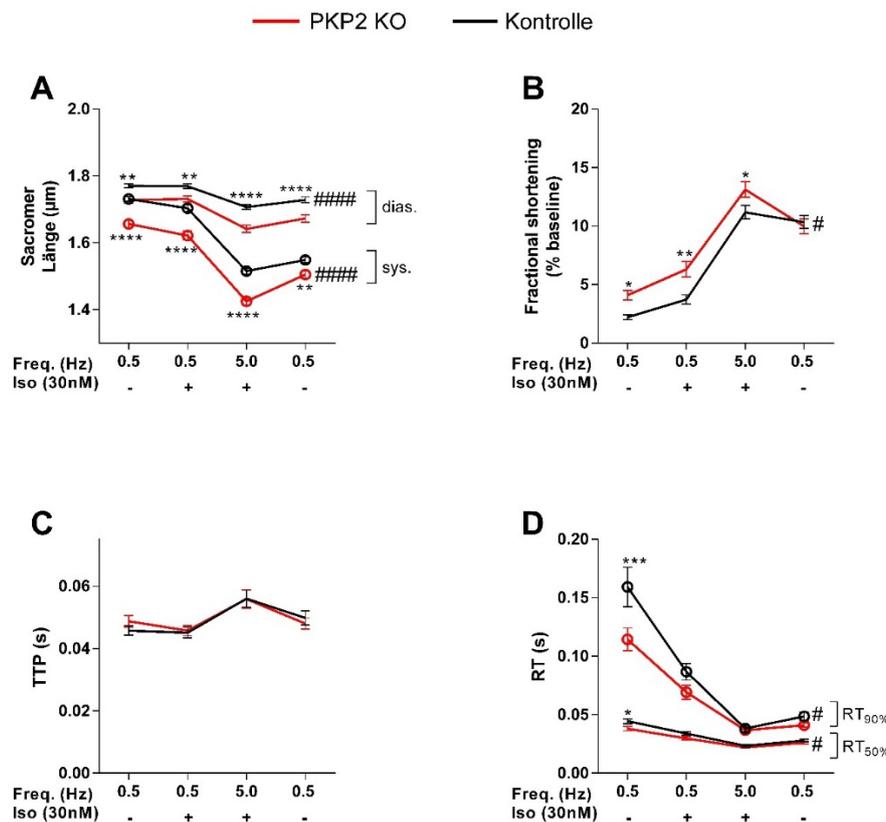


Abb. 22: Kontraktilität bei acht Wochen alten PKP 2 KO Kardiomyozyten

Kontraktionen unbelasteter isolierter Kardiomyozyten wurden während des Stressprotokolls aufgezeichnet und anhand folgender Parameter analysiert: (A) diastolische und systolische Sarkomerlänge. (B) Fractional shortening in Prozent vom Basalwert. (C) Time to peak (TTP): Zeit bis zum Erreichen der maximalen Kontraktion. (D) Relaxationszeit (Relaxation time) bis 50% und 90% ($RT_{50\%}$; $RT_{90\%}$) zur Baseline. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM. Es wurden für Kontrollen $n=38/3$, für PKP2 KO $n=36/3$ Zellen/Mäuseherzen verwendet. P-Werte wurden mittels two-way ANOVA und einem Bonferroni-Post-hoc-Test für Mehrfachvergleiche berechnet. #, ##### = $p < 0,05$; 0,0001 (two-way ANOVA); *, **, ***, **** = $p < 0,05$; 0,01; 0,001; 0,0001 (Bonferroni's multiple comparisons test).

Kontraktilitätsanalysen der **zwölf Wochen** alten Kardiomyozyten zeigten signifikant kürzere Sarkomere der PKP2 KO-Zellen während der Diastole und Systole. Signifikante Unterschiede zeigten sich unter Einfluss von Isoprenalin (0,5 Hz; Iso), während 5 Hz Stimulation (5 Hz; Iso) und in der Auswaschphase (0,5 Hz; NT) (Abb. 23: A). Die bereits im Alter von vier und acht Wochen festgestellte diastolische Dysfunktion der PKP2 KO war somit auch im Alter von 12 Wochen nachweisbar (vgl. Abb. 21: A, Abb. 22: A). Das FS wies in den 12 Wochen alten Herzmuskelzellen keine signifikanten Unterschiede auf. Im Rahmen der Arbeitslaststeigerung (5 Hz; Iso) steigt die FS beider Mausgruppen gleichermaßen an (Abb. 23: B). Die TTP unterschied sich nicht zwischen PKP2 KO-Kardiomyozyten und Kontrollen (Abb. 23: C). Die RT_{50%} der PKP2 KO-Herzmuskelzellen war über den Verlauf des Stressprotokolls signifikant schneller als die der Kontrollen (Abb. 23: D).

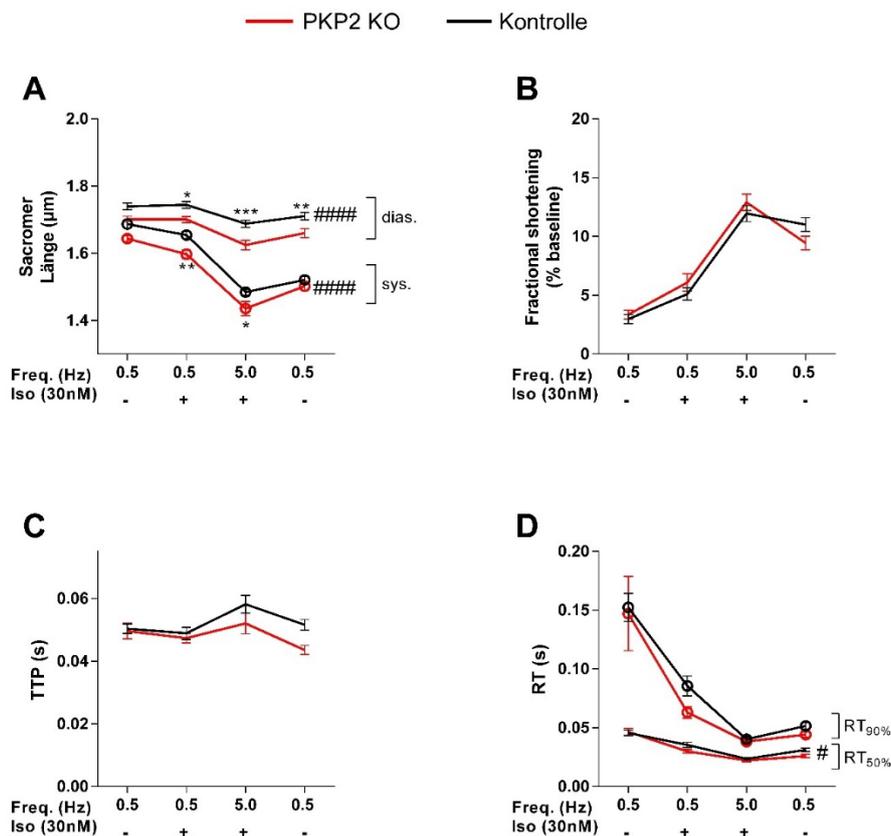


Abb. 23: Kontraktilität bei zwölf Wochen alten PKP2 KO Kardiomyozyten

Kontraktionen unbelasteter isolierter Kardiomyozyten wurden während des Stressprotokolls aufgezeichnet und anhand folgender Parameter analysiert: (A) diastolische und systolische Sarkomerlänge. (B) Fractional shortening in Prozent vom Basalwert. (C) Time to peak (TTP): Zeit bis zum Erreichen der maximalen Kontraktion. (D) Relaxationszeit (Relaxation time) bis 50% und 90% (RT_{50%}; RT_{90%}) zur Baseline. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM. Es wurden für Kontrollen n=39/3, für PKP2 KO n=33/3 Zellen/Mäuseherzen verwendet. P-Werte wurden mittels two-way ANOVA und einem Bonferroni-Post-hoc-Test für Mehrfachvergleiche berechnet. #; ##### = p < 0,05; 0,0001 (two-way ANOVA) *; **; *** = p < 0,05; 0,01; 0,001 (Bonferroni's multiple comparisons test).

Zusammengefasst zeigte sich in PKP2 KO-Kardiomyozyten zu allen Alterszeitpunkten (vier, acht und zwölf Wochen) eine stabile diastolische Dysfunktion. Die systolische Funktion war zu keinem Zeitpunkt eingeschränkt. Das FS der PKP2 KO war lediglich im Alter von acht Wochen signifikant erhöht (Abb. 22: B). Die Relaxationskinetik der PKP2 KO-Kardiomyozyten ($RT_{50\%}$, $RT_{90\%}$) war in allen Altersgruppen tendenziell schneller im Vergleich zu Kontrollen, wobei der Unterschied unter physiologischer Arbeitsbelastung (5 Hz; Iso) ausgeglichen erschien (Abb. 21, Abb. 22, Abb. 23: C, D).

4.2.1.2 Plakoglobin

Im Vergleich der **sechs Wochen** alten PG KO-Kardiomyozyten mit ihren Kontrollen wurden signifikante Unterschiede hinsichtlich der Sarkomerlänge festgestellt: Sowohl die diastolische als auch systolische Sarkomerlänge der transgenen Kardiomyozyten war zu jedem Analysezeitpunkt des Protokolls signifikant kürzer als die der Kontroll-Kardiomyozyten. PG KO-Herzmuskelzellen weisen somit auf zellulärer Ebene eine diastolische Dysfunktion auf. Die Sarkomerverkürzung nahm in beiden Versuchsgruppen mit Steigerung der Arbeitsbelastung zu und regenerierte sich im Anschluss in gleichem Maße (Abb. 24: A). Die systolische Funktion der PG KO-Zellen, gemessen mittels dem FS, war unter den ersten beiden Bedingungen des Stressprotokolls (0,5 Hz; Iso - und 0,5 Hz; Iso +) tendenziell höher als die der Kontrollen. Jedoch stieg bei Anstieg der Frequenz auf 5 Hz die FS der Kontrollen stärker an als die der PG KO, wodurch sich der Unterschied wieder ausglich (Abb. 24: B; $p=0,053$). Die Kontraktionskinetik (TTP, $RT_{50\%}$, $RT_{90\%}$) zeigte keine Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen (Abb. 24: C; D).

Zusammengefasst konnte bei PG KO-Kardiomyozyten im Alter von sechs Wochen eine diastolische Dysfunktion bei uneingeschränkter systolischer Funktion und Kontraktionskinetik festgestellt werden (Abb. 24: A-D).

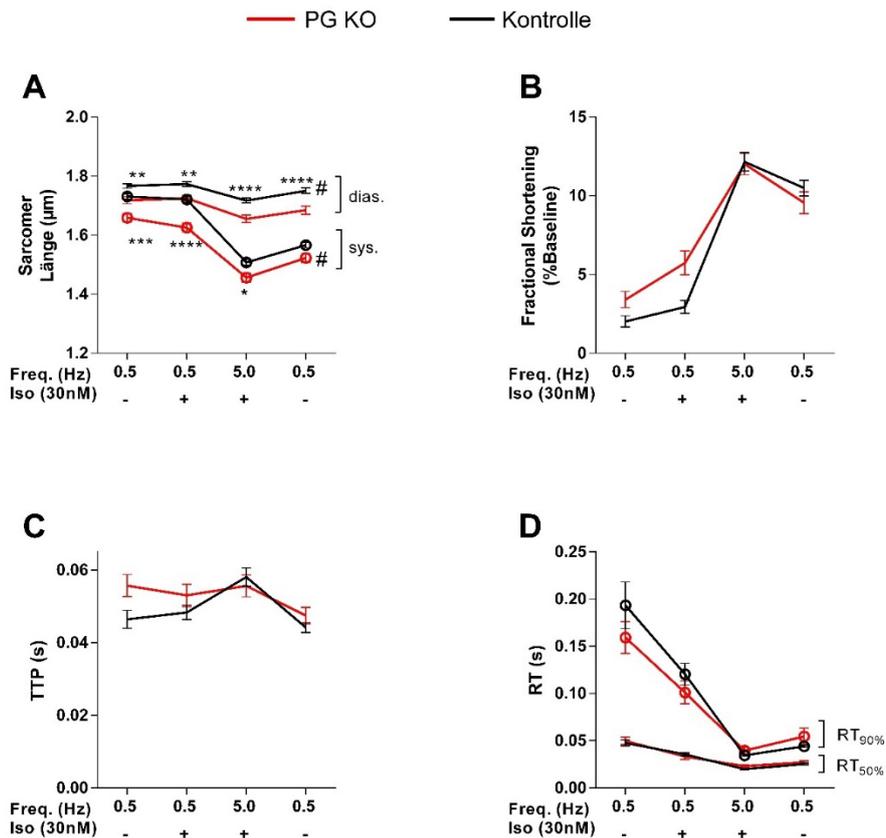


Abb. 24: Kontraktilität bei sechs Wochen alten PG KO Kardiomyozyten

Kontraktionen unbelasteter isolierter Kardiomyozyten wurden während des Stressprotokolls aufgezeichnet und anhand folgender Parameter analysiert: (A) diastolische und systolische Sarkomerlänge. (B) Fractional shortening in Prozent vom Basalwert. (C) Time to peak (TTP): Zeit bis zum Erreichen der maximalen Kontraktion. (D) Relaxationszeit (Relaxation time) bis 50% und 90% (RT_{50%}; RT_{90%}) zur Baseline. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM. Es wurden für Kontrollen n=36/3, für PG KO n=31/3 Zellen/Mäuseherzen verwendet. P-Werte wurden mittels two-way ANOVA und einem Bonferroni-Post-hoc-Test für Mehrfachvergleiche berechnet. # = p < 0,05 (two-way ANOVA) *; **, ***, **** = p < 0,05; 0,01; 0,001; 0,0001 (Bonferroni's multiple comparisons test).

4.2.2 Messung der zytosolischen Kalziumkonzentration

Kalzium bildet in Kardiomyozyten eine Schnittstelle zwischen der Exzitation, Mechanik und Energetik der Zelle. Abweichungen der streng regulierten Kalzium-Dynamik nehmen Einfluss auf die EC-Kopplung und somit Kontraktilität der Zelle, als auch über zentral regulative Funktionen auf die Energiebereitstellung durch Mitochondrien³⁰. Um die diastolische Dysfunktion weiter aufzuklären, wurde die zytosolische Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_c$) mittels des IonOptix Systems untersucht.

$[Ca^{2+}]_c$ wurde mithilfe des ratiometrischen Farbstoffs Indo-1, wie unter 3.5.6 beschrieben, in Kardiomyozyten während des Stressprotokolls ermittelt. Folgende Parameter wurden erhoben: die diastolische und systolische $[Ca^{2+}]_c$, die Amplituden der zytosolischen Ca^{2+} -Transienten ($\Delta[Ca^{2+}]_c$), die Zeit bis zur maximalen $[Ca^{2+}]_c$ (TTP) sowie die Relaxationszeit zum Erreichen der 50%- und 80%-igen $[Ca^{2+}]_c$ zur Baseline- $[Ca^{2+}]_c$ (RT_{50%}; RT_{80%}). Das Verhältnis der Lichtintensität der Wellenlängen 405 und

485 nm ($F_{405/485}$) ist dabei das Maß für $[Ca^{2+}]_c$. Isoprenalin bewirkt über β -adrenerge Stimulation einen Anstieg des $[Ca^{2+}]_c$ sowie die Vergrößerung der Ca^{2+} -Amplituden¹⁹². Durch Erhöhung der Stimulationsfrequenz wird dieser Effekt nochmals verstärkt und erreicht sein Maximum. Die Zunahme des $[Ca^{2+}]_c$ ist Ausdruck der Anpassung der Zelle auf die erhöhte Arbeitsbelastung. Bei Rückkehr zu Ruhebedingungen verlaufen die Ca^{2+} -Parameter wieder rückläufig in Richtung Ausgangsniveau.

4.2.2.1 Plakophilin 2

Aufgrund der beobachteten veränderten Kontraktilitätsparameter in PKP2 KO-Herzmuskelzellen wurde geprüft, ob diese im Zusammenhang mit einer alterierten Kalziumdynamik stehen. Analysen der $[Ca^{2+}]_c$ -Transienten erfolgte in den Altersgruppen vier, acht und zwölf Wochen. In **vier Wochen** alten PKP2 KO-Kardiomyozyten war während des Stressprotokolls sowohl der Verlauf der systolischen $[Ca^{2+}]_c$ als auch der diastolischen $[Ca^{2+}]_c$ signifikant im Vergleich zu Kontroll-Kardiomyozyten verändert. Systolische $[Ca^{2+}]_c$ war unter Ausgangsbedingungen des Protokolls in transgenen Kardiomyozyten erhöht, während die diastolische $[Ca^{2+}]_c$ in der Erholungsphase erhöht war. Unter physiologischer Arbeitsbelastung (0,5Hz-5Hz; Iso +) dagegen glichen sich Unterschiede der $[Ca^{2+}]_c$ zwischen beiden Gruppen aneinander an (Abb. 25: A). Die Ca^{2+} -Transienten Amplitude ($\Delta[Ca^{2+}]_c$) illustriert die $[Ca^{2+}]_c$ -Schwankungen zwischen Diastole und Systole. $\Delta[Ca^{2+}]_c$ unterschied sich signifikant zwischen PKP2 KO und Kontrollen, wobei in PKP2 KO-Kardiomyozyten die $\Delta[Ca^{2+}]_c$ unter basalen Bedingungen signifikant erhöht war und sich dieser Unterschied unter verstärkter Arbeitsbelastung nivellierte (Abb. 25: B). Die Zeit bis zur maximalen $[Ca^{2+}]_c$ (TTP) war in beiden Zellgruppen vergleichbar (Abb. 25: C). Die Zeit in der 50% der maximalen $[Ca^{2+}]_c$ aus den Zellen eliminiert wurde ($RT_{50\%}$) war in PKP2 KO unter basalen Bedingungen schneller im Vergleich zu Kontrollen. $RT_{80\%}$ war zu jedem Zeitpunkt zwischen beiden Genotypen vergleichbar (Abb. 25: D).

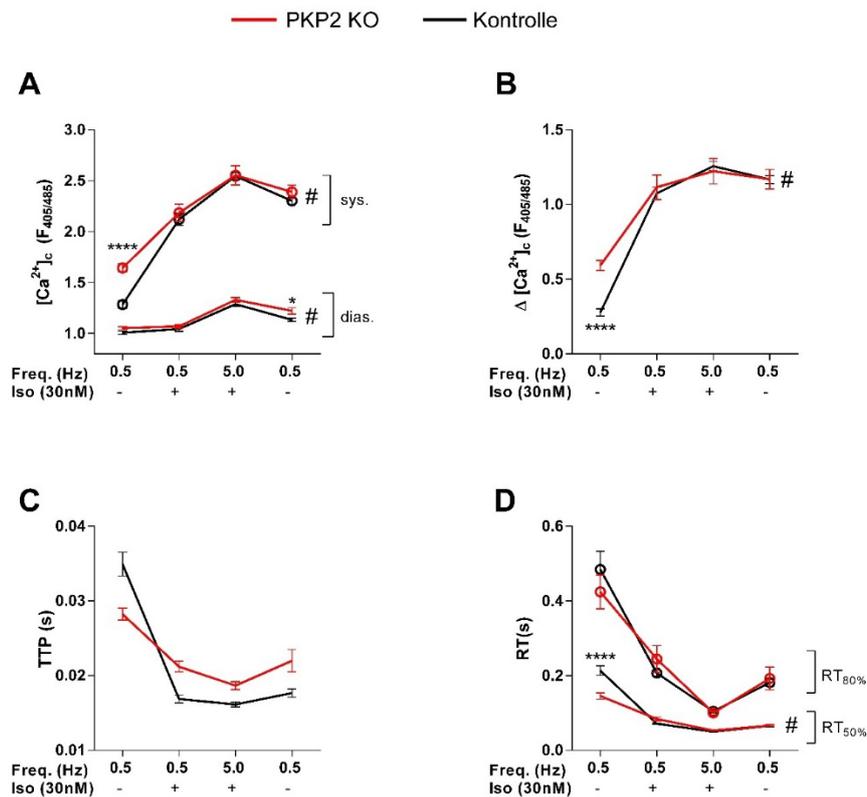


Abb. 25: [Ca²⁺]_c bei vier Wochen alten PKP2 KO Kardiomyozyten

Analyse der zytosolische Kalziumtransienten intakter Kardiomyozyten, die dem Stressprotokoll unterzogen und mit Indo-1/AM beladen wurden. A) Systolische und diastolische Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_c$). B) Amplitude der zytosolischen Kalziumkonzentration ($\Delta[Ca^{2+}]_c$). C) Time to peak (TTP): Zeit bis zum Erreichen der maximalen Kalziumkonzentration D) Relaxationszeit (Relaxation time) bis 50% und 80% ($RT_{50\%}$; $RT_{80\%}$) zur Baseline. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM. Es wurden für Kontrollen $n=60/2$, für PKP2 KO $n=47-50/2$ Zellen/Mäuseherzen verwendet. P-Werte wurden mittels two-way ANOVA und einem Bonferroni-Post-hoc-Test für Mehrfachvergleiche berechnet. # = $p < 0,05$ (2wayANOVA); *, **** = $p < 0,05$; 0,0001; (Bonferroni's multiple comparisons test). Daten mit freundlicher Genehmigung von Anna-Florentine Schiuma.

In den **acht Wochen** alten PKP2 KO-Kardiomyozyten war während des Stressprotokolls die systolische $[Ca^{2+}]_c$ als auch die diastolische $[Ca^{2+}]_c$ signifikant im Vergleich zu Kontroll-Kardiomyozyten verändert. Die systolische $[Ca^{2+}]_c$ war in PKP2 KO sowohl bei niedriger als auch erhöhter Arbeitsbelastung signifikant erhöht. Die diastolische $[Ca^{2+}]_c$ war während 5 Hz-Stimulation unter Isoprenalin und in der anschließenden Erholungsphase signifikant erhöht (Abb. 26: A). Unter basalen Bedingungen und unter Einfluss von Isoprenalin wiesen PKP2-KO-Kardiomyozyten signifikant höhere $\Delta[Ca^{2+}]_c$ auf. Interessanterweise war für PKP2 KO ein geringerer Anstieg der $\Delta[Ca^{2+}]_c$ als Reaktion auf die 5 Hz-Stimulation zu beobachten als für die Kontrollen (Abb. 26: B). Die TTP war in beiden Zellgruppen vergleichbar (Abb. 26: C). $RT_{80\%}$ war in PKP2 KO-Kardiomyozyten lediglich unter basalen Bedingungen signifikant erhöht. Im Hinblick auf die restliche Relaxationskinetik ($RT_{50\%}$, $RT_{80\%}$) präsentierten die Genotypen keinerlei Unterschiede zueinander (Abb. 26: D).

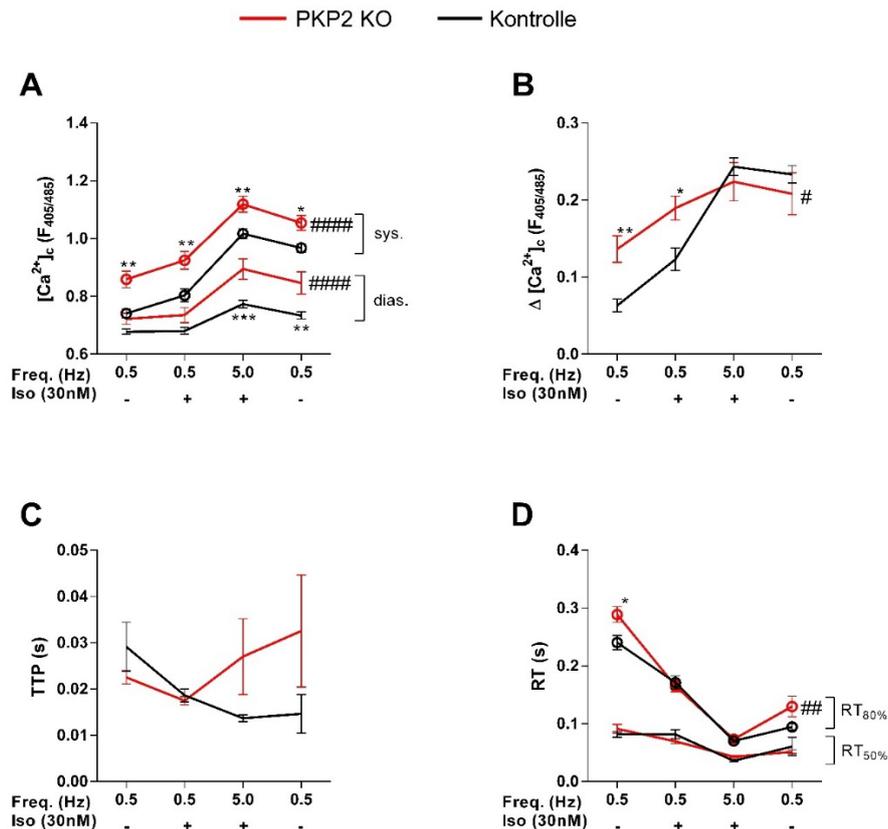


Abb. 26: [Ca²⁺]_c bei acht Wochen alten PKP2 KO Kardiomyozyten

Analyse der zytosolische Kalziumtransienten intakter Kardiomyozyten, die dem Stressprotokoll unterzogen und mit Indo-1/AM beladen wurden. A) Systolische und diastolische Kalziumkonzentration ([Ca²⁺]_c). B) Amplitude der zytosolischen Kalziumkonzentration (Δ[Ca²⁺]_c). C) Time to peak (TTP): Zeit bis zum Erreichen der maximalen Kalziumkonzentration D) Relaxationszeit (Relaxation time) bis 50% und 80% (RT_{50%}; RT_{80%}) zur Baseline. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM. Es wurden für Kontrollen n=27/3, für PKP2 KO n=23/3 Zellen/Mäuseherzen verwendet. P-Werte wurden mittels two-way ANOVA und einem Bonferroni-Post-hoc-Test für Mehrfachvergleiche berechnet. #; ##; ##### = p < 0,05; 0,01; 0,0001 (2wayANOVA); *, **, *** = p < 0,05; 0,01; 0,001; (Bonferroni's multiple comparisons test).

In **zwölf Wochen** alten PKP2 KO-Kardiomyozyten war während des Stressprotokolls nur die systolische [Ca²⁺]_c im Vergleich zu Kontroll-Kardiomyozyten signifikant verändert (Abb. 27: A). Die systolische [Ca²⁺]_c war signifikant unter niedriger Belastung bei basalen Bedingungen in PKP2 KO erhöht. Die diastolische [Ca²⁺]_c unterschied sich in dieser Altersgruppe dagegen nicht. Die Differenz zwischen systolischem und diastolischem [Ca²⁺]_c (Δ[Ca²⁺]_c) war dadurch erwartungsgemäß in PKP2 KO größer. Dies bestätigte sich sowohl unter geringer als auch hoher Arbeitsbelastung. Der durch Stressexposition bedingte Anstieg und die anschließende Rückbildung von Δ[Ca²⁺]_c war in beiden Versuchsgruppen ähnlich ausgeprägt (Abb. 27: B). Im Hinblick auf die Ca²⁺-Kinetik präsentierten sich sowohl TTP als auch RT_{80%} unauffällig. Die RT_{50%} war in PKP2 KO unter basalen Bedingungen und im Anschluss an die 5 Hz Isoprenalin-Phase niedriger und zeigte damit eine schnellere Elimination des [Ca²⁺]_c als Kontrollen (Abb. 27: C, D).

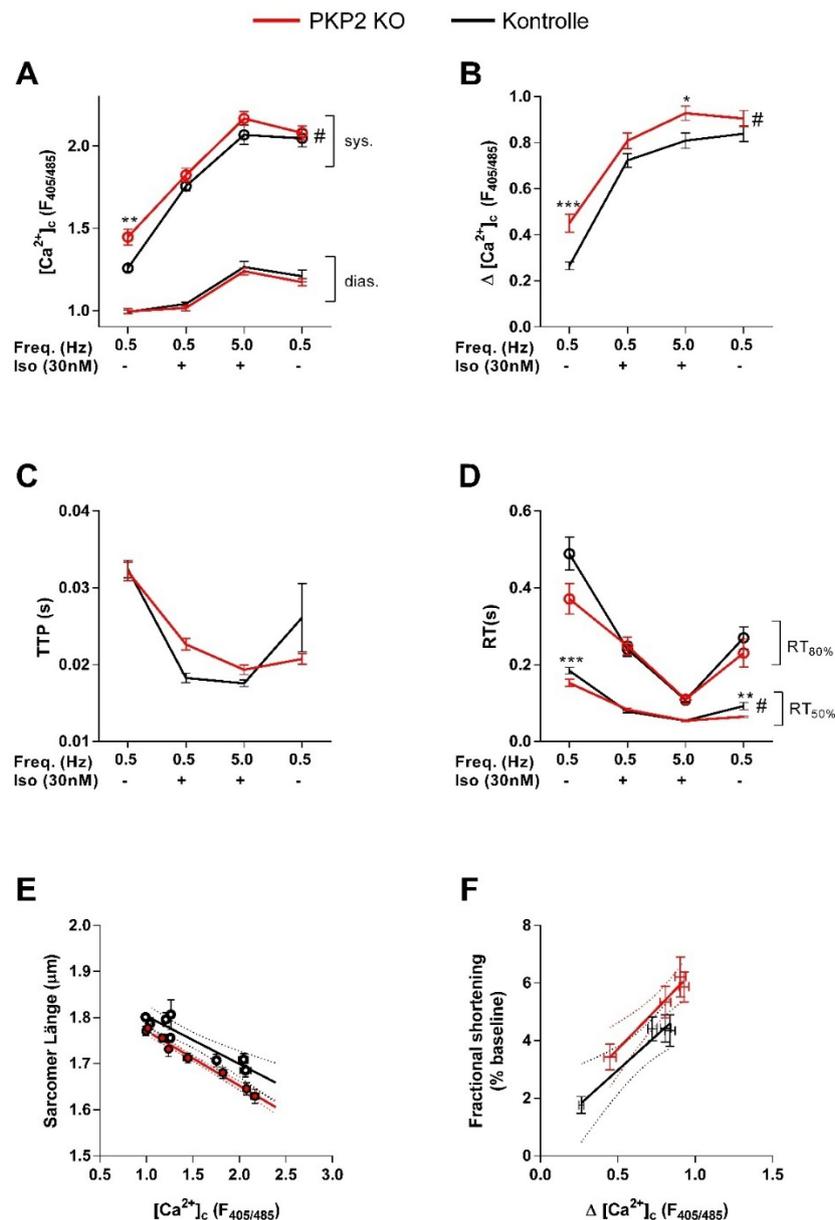


Abb. 27: $[Ca^{2+}]_c$ bei zwölf Wochen alten PKP 2 KO Kardiomyozyten

Analyse der zytosolische Kalziumtransienten intakter Kardiomyozyten, die dem Stressprotokoll unterzogen und mit Indo-1/AM beladen wurden. A) Systolische und diastolische Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_c$). B) Amplitude der zytosolischen Kalziumkonzentration ($\Delta[Ca^{2+}]_c$). C) Time to peak (TTP): Zeit bis zum Erreichen der maximalen Kalziumkonzentration D) Relaxationszeit (Relaxation time) bis 50% und 80% ($RT_{50\%}$; $RT_{80\%}$) zur Baseline. E) $[Ca^{2+}]_c$ in Relation zur Sarkomerlänge. F) $\Delta[Ca^{2+}]_c$ in Relation zum fractional shortening. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM. Es wurden für Control n=62-67/2, für PKP2 KO n=57-59/2 Zellen/Mäuseherzen verwendet. P-Werte wurden mittels two-way ANOVA und einem Bonferroni-Post-hoc-Test für Mehrfachvergleiche berechnet. # = $p < 0,05$ (2wayANOVA); *, **, *** = $p < 0,05$; 0,01; 0,001; (Bonferroni's multiple comparisons test). Daten mit freundlicher Genehmigung von Anna-Florentine Schiuma.

Eine erhöhte Vorspannung der Sarkomere, im Sinne einer diastolischen Dysfunktion, kann neben erhöhter Ca^{2+} -Spiegel auch durch eine Ca^{2+} -Sensibilisierung der Myofilament zustande kommen¹⁹³. Da keine Veränderungen der diastolischen $[Ca^{2+}]_c$ in PKP2 KO-Kardiomyozyten zu sehen waren, wurde die $[Ca^{2+}]_c$ in Relation zur parallel aufgezeichneten Sarkomerverkürzung gesetzt. Beim Vergleich der systolischen und diastolischen Sarkomerlängen mit den jeweiligen $[Ca^{2+}]_c$, zeigte sich bei PKP2 KO

Kardiomyozyten eine dezente Links-Verschiebung der Gerade bei vergleichbaren Steigungen (Abb. 28: E). Das FS der Sarkomere stieg bei Zunahme der $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$ in PKP2 KO-Kardiomyozyten tendenziell stärker als in den Kontrollen an, jedoch war kein signifikanter Unterschied zu beobachten (Abb. 24: F). Dies spricht gegen eine diastolische Dysfunktion der Sarkomere durch Veränderungen der Ca^{2+} -Affinität der Myofilamente.

Zusammengefasst waren passend zu den verkürzten Sarkomeren in allen Altersgruppen erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_c$ für PKP2 KO festzustellen. Während die vier und acht Wochen alte Kohorte sowohl systolisch als auch diastolisch erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_c$ aufwies, zeigten sich in der zwölf Wochen alten Kohorte nur systolisch erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_c$. $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$ war in PKP2 KO jeder Altersgruppen signifikant erhöht. Weiterhin wiesen PKP2 KO-Kardiomyozyten eine schnellere $[\text{Ca}^{2+}]_c$ -Eliminationskinetik ($\text{RT}_{50\%}$; $\text{RT}_{80\%}$) auf, welche unter erhöhter Arbeitsbelastung jedoch größtenteils unbeeinflusst war.

4.2.2.2 Plakoglobin

Zur genaueren Analyse der in den Kontraktilitätsmessungen festgestellten diastolischen Dysfunktion wurde die zytosolische Kalziumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in PG KO Kardiomyozyten im Alter von sechs Wochen mit deren Kontrollen verglichen. **Sechs Wochen** alte PG KO-Kardiomyozyten unterschieden sich weder in der systolischen noch in der diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_c$ von ihren gleichaltrigen Kontroll-Kardiomyozyten (Abb. 28: A). Somit waren ebenfalls keine Unterschiede der $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$ zwischen den Genotypen festzustellen (Abb. 28: B). $[\text{Ca}^{2+}]_c$ beider Genotypen stieg unter erhöhter Arbeitsbelastung im gleichen Maße an und erholte sich im Anschluss. Weiterhin konnten keine Unterschiede hinsichtlich der $[\text{Ca}^{2+}]_c$ -Kinetik zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden. Sowohl die TTP als auch die $\text{RT}_{50\%}$ und $\text{RT}_{80\%}$ waren in beiden Zellgruppen vergleichbar (Abb. 28: C; D). Da keine Veränderungen des Ca^{2+} -Spiegels in PG KO-Kardiomyozyten zu sehen war, wurde zusätzlich die $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in Relation zur parallel aufgezeichneten Sarkomerverkürzung gesetzt, um eine Ca^{2+} -Sensibilisierung der Myofilament auszuschließen. Beim Vergleich der systolischen und diastolischen Sarkomerlängen mit den jeweiligen $[\text{Ca}^{2+}]_c$, zeigte sich bei PG KO eine Links-Verschiebung der Gerade, aber vergleichbare Steigungen (Abb. 28: E). Auch das FS der Sarkomere stieg bei Zunahme der $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$ in beiden Versuchsgruppen ähnlich stark an (Abb. 24: F). Dies spricht gegen eine diastolische Dysfunktion der Sarkomere durch Veränderungen der Ca^{2+} -Affinität der Myofilamente.

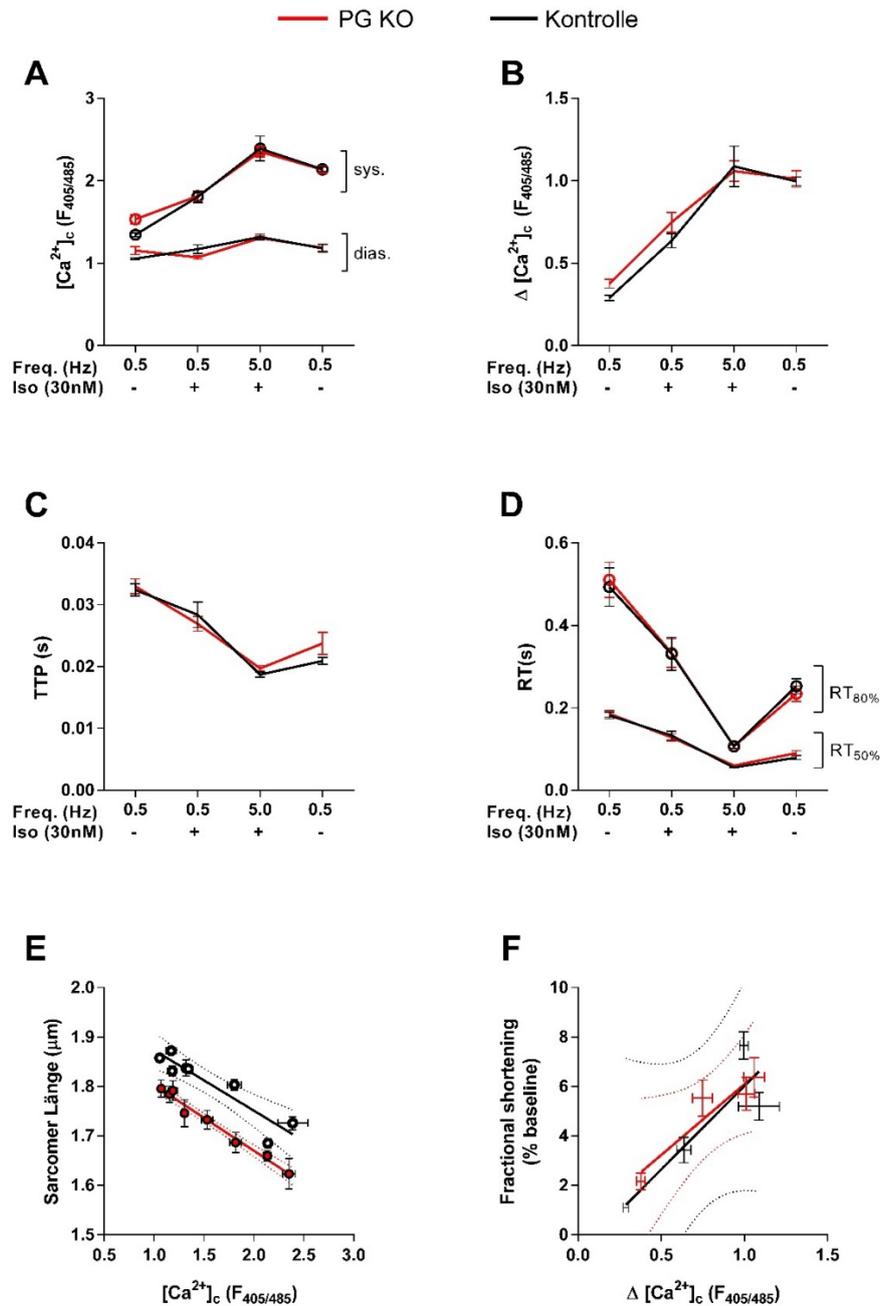


Abb. 28: $[Ca^{2+}]_c$ bei sechs Wochen alten PG KO Kardiomyozyten

Analyse der zytosolische Kalziumtransienten intakter Kardiomyozyten, die dem Stressprotokoll unterzogen und mit Indo-1/AM beladen wurden. A) Systolische und diastolische Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_c$). B) Amplitude der zytosolischen Kalziumkonzentration ($\Delta [Ca^{2+}]_c$). C) Time to peak (TTP): Zeit bis zum Erreichen der maximalen Kalziumkonzentration D) Relaxationszeit (Relaxation time) bis 50% und 80% ($RT_{50\%}$; $RT_{80\%}$) zur Baseline. E) $[Ca^{2+}]_c$ in Relation zur Sarkomerlänge. F) $\Delta [Ca^{2+}]_c$ in Relation zum fractional shortening. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM. Es wurden für A-D) Control n=57-70/2, PG KO n=49-60/2, für E-F) Control n=17-43/2, PG KO n=17-36/2 Zellen/Mäuseherzen verwendet. P-Werte wurden mittels two-way ANOVA und einem Bonferroni-Post-hoc-Test für Mehrfachvergleiche berechnet. *Daten mit freundlicher Genehmigung von Anna-Florentine Schiuma.*

Zusammenfassend beeinflusste der konditionelle Knockout von Plakoglobin weder Ca^{2+} -Konzentration noch -Dynamik in Kardiomyozyten. Dies steht im Gegensatz zu den für die PKP2 KO festgestellten erhöhten $[Ca^{2+}]_c$ -Transienten. Die in PG KO-Zellen zuvor festgestellte diastolische Dysfunktion der Sarkomere kann somit nicht durch erhöhtes $[Ca^{2+}]_c$ erklärt werden. Auch eine Ca^{2+} -Sensibilisierung der Myofilamente als Ursache der verkürzten Sarkomere konnte nicht beobachtet werden.

4.2.3 Messung des Redoxstatus und mitochondrialen Membranpotentials

Das Verhältnis von Reduktions- zu Oxidationsäquivalenten spielt sowohl für das Aufrechterhalten der zellulären Energieproduktion als auch für die zelluläre antioxidative Kapazität eine essenzielle Rolle. Unter physiologischen Bedingungen stimuliert die mitochondriale Ca^{2+} -Akkumulation die Dehydrogenasen des Citratzyklus, um eine ausreichende Versorgung der ETC mit Reduktionsäquivalenten zu gewährleisten¹⁶⁸. Die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme geschieht in Abhängigkeit des negativen mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$). Verschiebt sich dieses, so können - direkt oder indirekt über alterierte Ca^{2+} -Ströme - der Energiehaushalt und die Kontraktilität der Kardiomyozyten beeinträchtigt werden^{51,56}.

Um zu überprüfen, ob die bisher beobachtete Sarkomeraktivierung und das (im Fall von PKP2) erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_c$ die Funktion der Mitochondrien in ihrem natürlichen Kontext, sprich in intakten Kardiomyozyten beeinflussen, wurde der Redoxstatus sowie $\Delta\Psi_m$ in Kardiomyozyten unter Stressbedingungen bestimmt. Hierfür wurde der Redoxstatus mittels der Autofluoreszenz von NAD(P)H und FAD^+ sowie $\Delta\Psi_m$ mittels Tetramethylrhodaminmethylester (TMRM) gemessen.

4.2.3.1 Plakophilin 2

Redoxstatus sowie $\Delta\Psi_m$ wurden in PKP2 KO Mäusen im Alter von vier, acht und zwölf Wochen gemessen. Diese Altersgruppen spiegeln frühe, mittlere und fortgeschrittene Krankheitsstadien wider. In **vier Wochen** alten PKP2 KO-Kardiomyozyten unterschied sich der mitochondriale Redoxstatus während des gesamten Messprotokolls nicht signifikant von gleichaltrigen Kontroll-Kardiomyozyten (Abb. 29: A). Zu Beginn lag NAD(P)H in Kontrollen zu ~58% und in PKP2 KO zu ~47% reduziert vor, während FAD^+ ~35% in Kontrollen und ~42% in PKP2 KO oxidiert war. Durch β -adrenerge Stimulation mittels Isoprenalin und erhöhte Stimulationsfrequenz wurde eine Belastung simuliert. Die somit durch ADP gesteigerte mitochondriale Atmung entzieht NAD(P)H und FADH_2 vermehrt Elektronen¹⁹⁴. In dieser Phase ist in beiden Genotypen eine moderate Oxidation des NAD(P)H zu beobachten (Abfall von NAD(P)H in Kontrollen auf ~49%, in PKP2 KO auf ~42%). Der NAD(P)H/ FAD^+ -Redoxstatus wird jedoch durch Ca^{2+} -induzierte Aktivierung der Dehydrogenasen des Citratzyklus schnell wiederhergestellt¹⁹⁴. Mit zunehmender Stressexposition durch Erhöhung der Stimulationsfrequenz auf 5 Hz reagierten beide Gruppen mit einem Anstieg des NAD(P)H bis zur Normalisierung des Redoxstatus am Ende der 180s langen

Stimulation. Das oxidierte FAD^+ verhielt sich gegensätzlich zu dem reduzierten NAD(P)H (Abb. 29: A). Der ratiometrische Index des mitochondrialen Redoxstatus (Quotient aus $\text{NAD(P)H}/\text{FAD}^+$ veranschaulicht die transiente Verschiebung in Richtung Oxidation mit anschließender Reduktion des Redoxstatus während erhöhter Arbeitslast. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied des mitochondrialen Redoxstatus (Abb. 29: B). Darüber hinaus unterschied sich $\Delta\Psi_m$, welches anhand der TMRM-Fluoreszenz gemonitort wurde, nicht zwischen den Genotypen (Abb. 29: C).

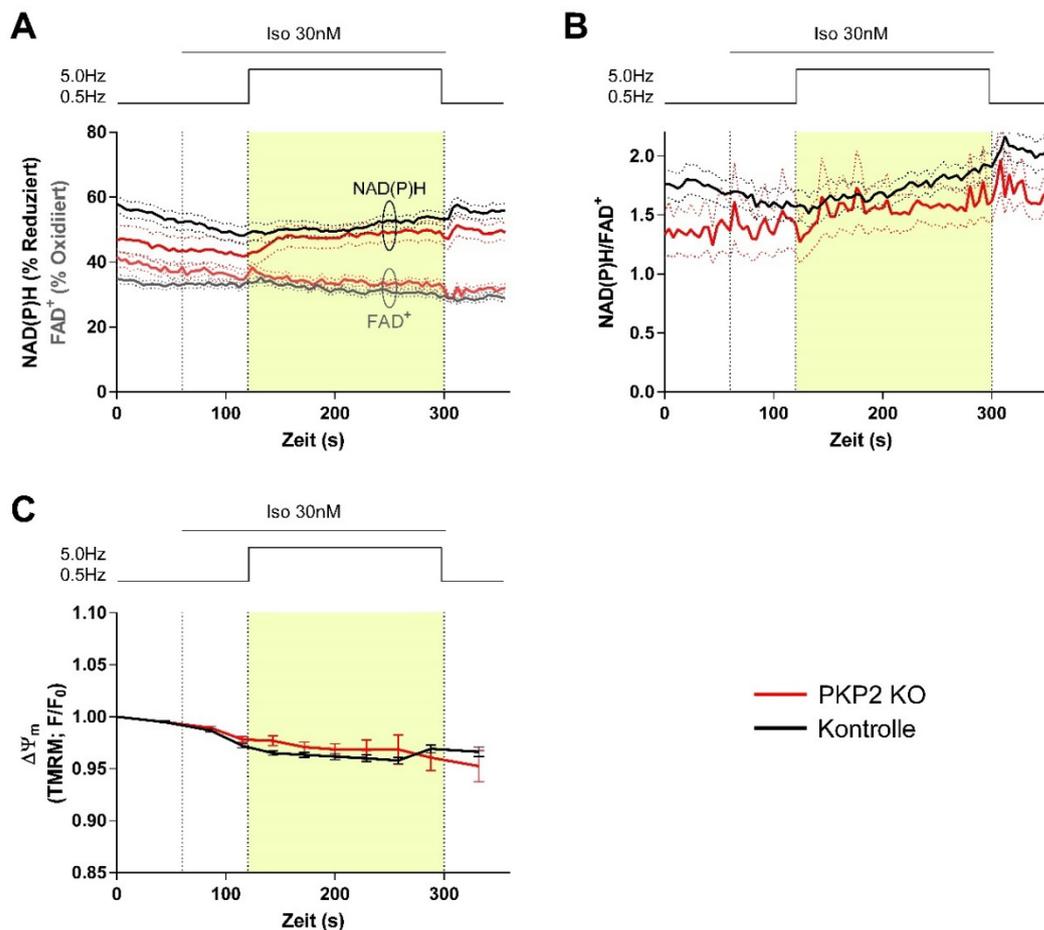


Abb. 29: Redoxstatus und $\Delta\Psi_m$ bei vier Wochen alten PKP2 KO Kardiomyozyten

Isolierte Herzmuskelzellen von PKP2 KO- und Kontrollmäusen unter simuliertem Stress: 5-Hz-Stimulation gelb schattiert, Isoprenalin-Gabe als Iso hinterlegt. (A) Autofluoreszenzen von NAD(P)H und FAD^+ gemessen in Prozent des kalibrierten Maximums. (B) Verhältnis von reduziertem NAD(P)H zu oxidiertem FAD^+ als Indikator für den mitochondrialen Redoxstatus. (C) $\Delta\Psi_m$ gemessen mittels TMRM-Fluoreszenz (Fluoreszenzsignal F /basale Fluoreszenzintensität F_0). Es wurden für (A, B) Kontrollen $n=36/3$, PKP2 KO $n=23/3$; für (C) Kontrollen $n=60/2$, PKP2 KO $n=60/2$ Zellen/Mäuseherzen verwendet. Darstellung als Mittelwerte \pm SEM und Signifikanztest mittels two-way ANOVA und einem Bonferroni-Post-hoc-Test für Mehrfachvergleiche. $\Delta\Psi_m$ -Daten mit freundlicher Genehmigung von Anna-Florentine Schiuma.

In **acht Wochen** alten PKP2 KO-Kardiomyozyten zeigten sich hinsichtlich des mitochondrialen Redoxstatus keine signifikanten Unterschiede zu Kontroll-Kardiomyozyten (Abb. 30: A). In beiden Versuchsgruppen lagen unter basalen Bedingungen eine ähnliche Verteilung der Redoxäquivalenten vor (NAD(P)H ~54%; FAD⁺ ~34%). Unter erhöhter Arbeitsbelastung kam es zu einer geringfügigen Oxidation des Redoxstatus. NAD(P)H-Werte sanken in beiden Genotypen auf ~48%. Die Oxidation von FAD⁺ stieg im PKP2 KO auf ~37%, während das FAD⁺-Signal der Kontrollen konstant blieb. Die Regeneration der Redox-Paare zum Ende der 5-Hz-Periode und nach Ausschalten der Stressoren verlief gleichermaßen in Kontroll- und transgenen Zellen (Abb. 30: A). Dieses „undershoot-recovery“-Verhalten¹⁹⁴, welches auch in der Ratio NAD(P)H/FAD⁺ zu erkennen ist, verlief in Kontrollen und PKP2-KO gleichermaßen (Abb. 30: B). In Ruhe und unter Arbeitslast blieb das $\Delta\Psi_m$ stabil und es konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (Abb. 30: C).

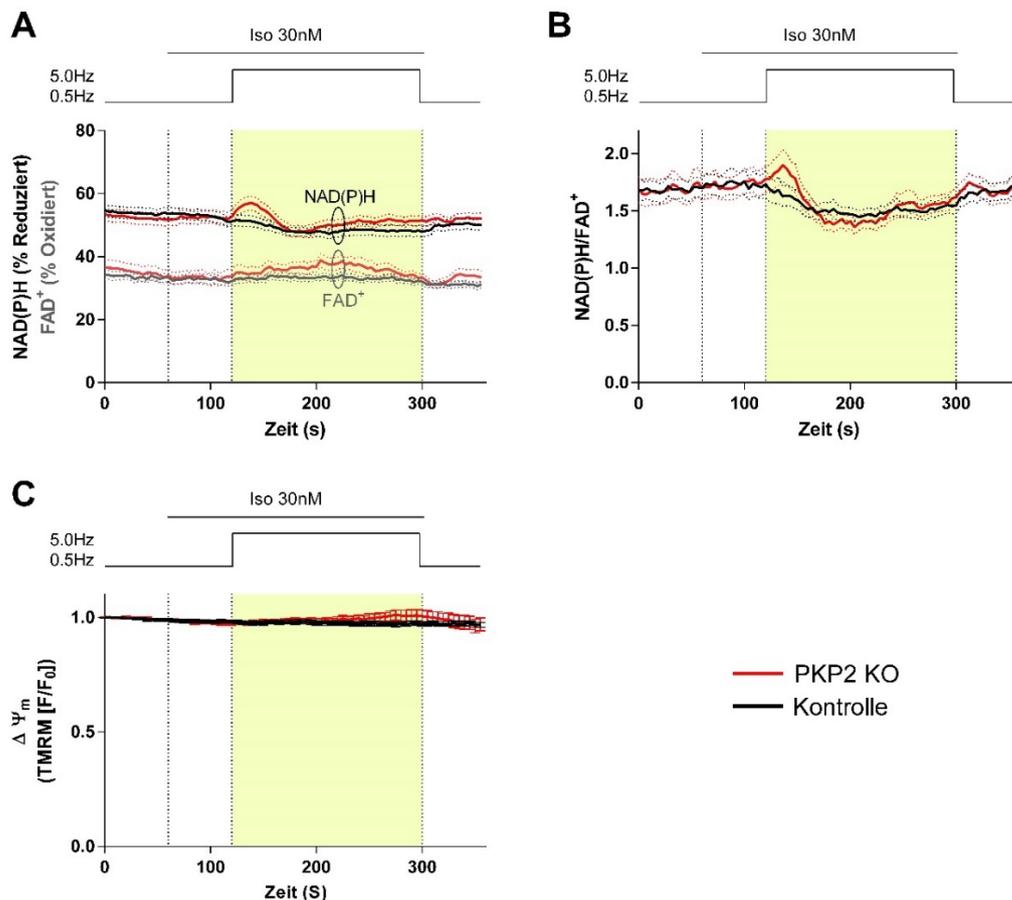


Abb. 30: Redoxstatus und $\Delta\Psi_m$ bei acht Wochen alten PKP2 KO Kardiomyozyten

Isolierte Herzmuskelzellen von PKP2 KO- und Kontrollmäusen unter simuliertem Stress: 5-Hz-Stimulation gelb schattiert, Isoprenalin-Gabe als Iso hinterlegt. (A) Autofluoreszenzen von NAD(P)H und FAD⁺ gemessen in Prozent des kalibrierten Maximums. (B) Verhältnis von reduziertem NAD(P)H zu oxidiertem FAD⁺ als Indikator für den mitochondrialen Redoxstatus. (C) $\Delta\Psi_m$ gemessen mittels TMRM-Fluoreszenz (Fluoreszenzsignal F/basale Fluoreszenzintensität F₀). Es wurden für (A, B) Kontrollen n=38/3, PKP2 KO n=36/3; für (C) Kontrollen n=26/3, PKP2 KO n=23/3 Zellen/Mäuseherzen verwendet. Darstellung als Mittelwerte \pm SEM und Signifikanztest mittels two-way ANOVA und einem Bonferroni-Post-hoc-Test für Mehrfachvergleiche.

Der Redox-Status der **zwölf Wochen** alten Kardiomyozyten unterschied sich signifikant zwischen PKP2 KO und Kontrollen. In Ruhe war der Redoxstatus zwischen den Gruppen noch vergleichbar. Unter initialer Arbeitslast stieg der Anteil des oxidierten FAD⁺ in PKP2 KO-Kardiomyozyten im Vergleich zu Kontroll-Kardiomyozyten signifikant stärker an (~33% vs. ~27%; Abb. 31: A). Der Quotient aus NAD(P)H und FAD⁺ bestätigte den signifikant oxidierteren Redoxstatus der PKP2 KO-Kardiomyozyten während der initialen Arbeitslast (88s-164s). Bereits kurz nach Beginn der 5 Hz Stimulation kam es zu einer stärkeren Oxidation der Kontroll-Kardiomyozyten als in den PKP2 KO-Zellen, sodass sich der Redoxstatus der Kontrollen an das Niveau der PKP2 KO anglich (Abb. 31: B). Das Ausmaß der NAD(P)H-Abnahme im Rahmen der Oxidation unterschied sich nicht zwischen den Versuchsgruppen und die Regeneration zu Ausgangswerten erfolgte im gleichen Maße (Abb. 31: A; B). Auch in den zwölf Wochen alten PKP2 KO-Mäusen war das $\Delta\Psi_m$ während des gesamten Stressprotokolls konstant (Abb. 31: C).

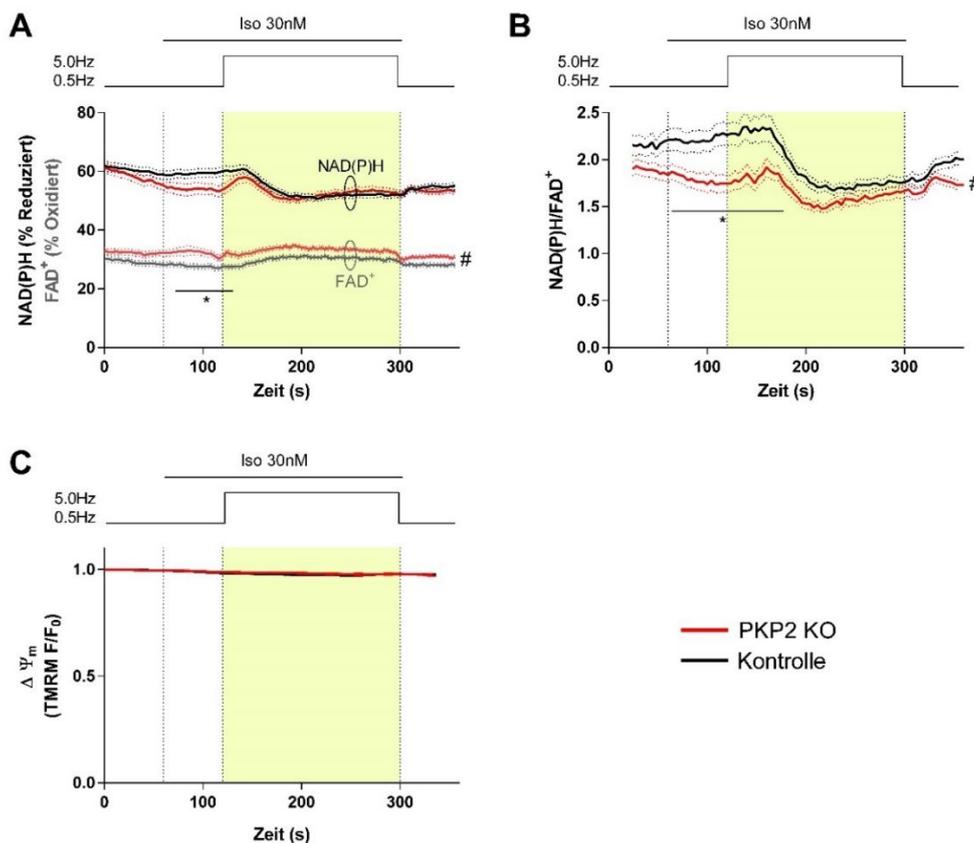


Abb. 31: Redoxstatus und $\Delta\Psi_m$ bei zwölf Wochen alten PKP2 KO Kardiomyozyten

Isolierte Herzmuskelzellen von PKP2 KO- und Kontrollmäusen unter simuliertem Stress: 5-Hz-Stimulation gelb schattiert, Isoprenalin-Gabe als Iso hinterlegt. (A) Autofluoreszenzen von NAD(P)H und FAD⁺ gemessen in Prozent des kalibrierten Maximums. (B) Verhältnis von reduziertem NAD(P)H zu oxidiertem FAD⁺ als Indikator für den mitochondrialen Redoxstatus. (C) $\Delta\Psi_m$ gemessen mittels TMRM-Fluoreszenz (Fluoreszenzsignal F/basale Fluoreszenzintensität F₀). Es wurden für (A, B) Kontrollen n=36/3, PKP2 KO n=33/3; für (C) Kontrollen n=40/2, PKP2 KO n=59/2 Zellen/Mäuseherzen verwendet. Darstellung als Mittelwerte \pm SEM. Zeitintervall mit signifikantem Unterschied als horizontale Linie markiert. # = p < 0,05 (2wayANOVA); * = p < 0,05; (Bonferroni's multiple comparisons test). $\Delta\Psi_m$ -Daten mit freundlicher Genehmigung von Anna-Florentine Schiuma.

Zusammengefasst ließ sich für die vier und acht Wochen alten PKP2 KO-Kardiomyozyten ein unbeeinflusster Redoxstatus feststellen, der auch während Stressexposition stabil gehalten wurde. Für die zwölf Wochen alten PKP2 KO-Herzmuskelzellen setzte dagegen mit Einsatz der Arbeitsbelastung eine stärkere Oxidation des Redoxgleichgewichts als in den Kontrollen ein. Dieser Unterschied, der auf ein vorübergehendes bioenergetisches Defizit hindeuten könnte, relativierte sich jedoch unter fortwährender Belastung. Transgene Kardiomyozyten aller Altersgruppen hielten das $\Delta\Psi_m$ stabil aufrecht.

4.2.3.2 Plakoglobin

Autofluoreszenzsignale von NAD(P)H und FAD^+ sowie $\Delta\Psi_m$ wurden in PG KO-Mauszellen und deren gesunden Geschwistertieren im Alter von sechs Wochen gemessen. In der **sechs Wochen** alten PG KO-Kardiomyozyten war der Redoxstatus während des Stressprotokolls signifikant oxidiert als in Kontroll-Kardiomyozyten. PG KO-Zellen wiesen bereits zu Beginn der Messung signifikant höhere FAD^+ - und signifikant niedrigere NAD(P)H-Werte als die Kontrollzellen auf (Abb. 32: A; FAD^+ : ~39% vs. ~28%; NAD(P)H: ~46% vs. ~58%). Dieser signifikant oxidierte Redoxstatus in PG KO blieb unter basalen Bedingungen (0,5 Hz NT) als auch nach dem Wechsel des Perfusionspuffers zu 30nM Isoprenalin bestehen. Mit Erhöhung der Stimulationsfrequenz auf 5Hz erfolgte in den transgenen Zellen eine kontinuierliche Reduktion der Redoxäquivalente. Reduziertes NAD(P)H stieg in PG KO-Kardiomyozyten bis zum Ende der 5Hz-Stimulation auf ~51% an, während FAD^+ auf ~31% sank, wodurch sich deren Redoxstatus den Werten der Kontroll-Kardiomyozyten angleich (Abb. 32: A). Der Quotient NAD(P)H/ FAD^+ verdeutlicht den signifikant oxidierten Redoxstatus der PG KO-Kardiomyozyten unter Ruhebedingungen mit rascher Erholung des Redoxstatus unter Stressbedingungen. Der transiente Abfall und die Regeneration der Redox-Paare waren in den Kontrollen weniger stark ausgeprägt (Abb. 32: B). Trotz NAD(P)H- und $FADH_2$ -Oxidation blieb $\Delta\Psi_m$ in beiden Gruppen unverändert (Abb. 32: C).

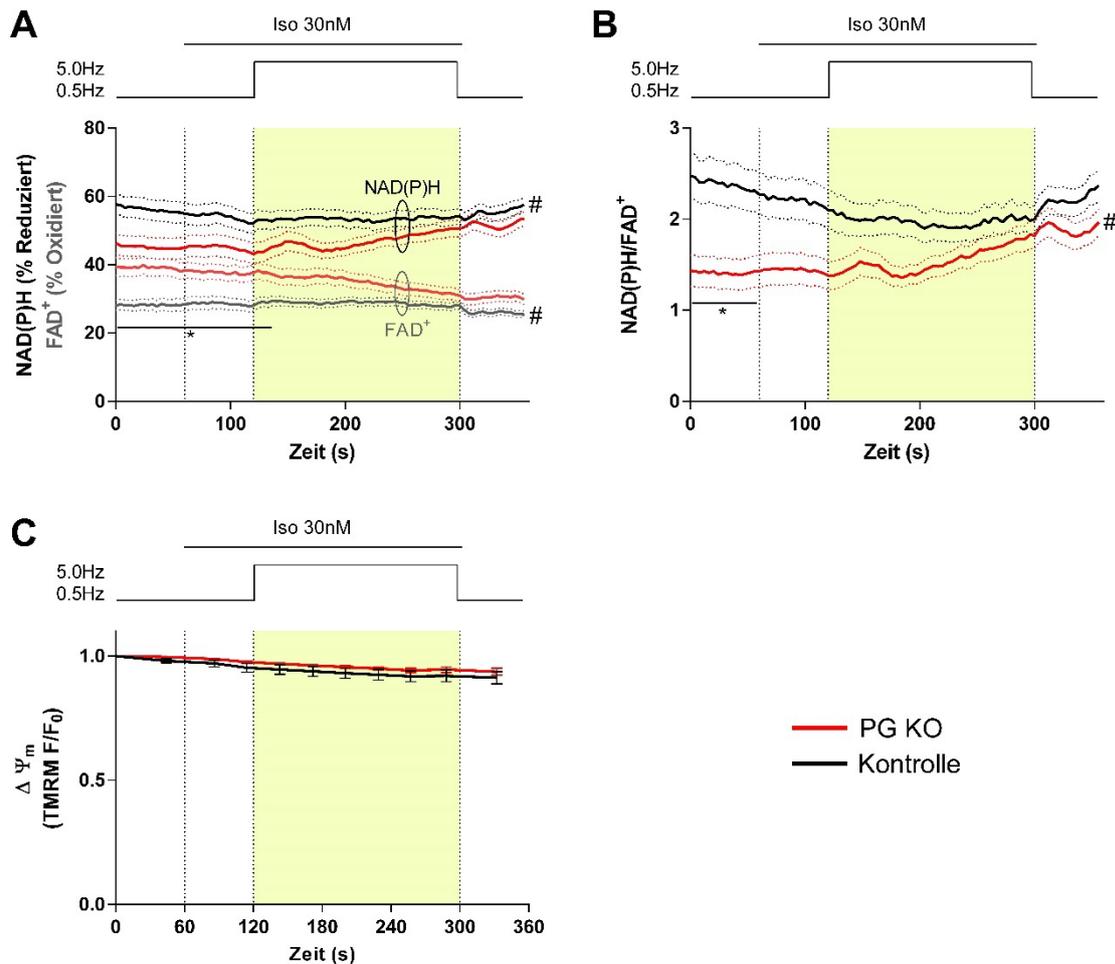


Abb. 32: Redoxstatus und $\Delta\Psi_m$ bei sechs Wochen alten PG KO Kardiomyozyten

Isolierte Herzmuskelzellen von PKP2 KO- und Kontrollmäusen unter simuliertem Stress: 5-Hz-Stimulation gelb schattiert, Isoprenalin-Gabe als Iso hinterlegt. (A) Autofluoreszenzen von NAD(P)H und FAD⁺ gemessen in Prozent des kalibrierten Maximums. (B) Verhältnis von reduziertem NAD(P)H zu oxidiertem FAD⁺ als Indikator für den mitochondrialen Redoxstatus. (C) $\Delta\Psi_m$ gemessen mittels TMRM-Fluoreszenz (Fluoreszenzsignal F/basale Fluoreszenzintensität F₀). Es wurden für (A, B) Kontrollen n=36/3, PG KO n=31/3; für (C) Control n=70/2, PKP2 KO n=60/2 Zellen/Mäuseherzen verwendet. Darstellung als Mittelwerte \pm SEM. Zeitintervall mit signifikantem Unterschied als horizontale Linie markiert. # = p < 0,05 (2wayANOVA); * = p < 0,05; (Bonferroni's multiple comparisons test). $\Delta\Psi_m$ -Daten mit freundlicher Genehmigung von Anna-Florentine Schioma.

Zusammenfassend zeigte sich in PG KO ein unter Ruhebedingungen oxidierterer Redoxstatus, welcher jedoch unter erhöhter Arbeitslast - womöglich durch Ca²⁺-induzierte Aktivierung des Citratzyklus – rasch wieder ausgeglichen werden konnte und $\Delta\Psi_m$ nicht beeinflusste.

4.3 Zelluläre Arrhythmie-Neigung

Es ist etabliert, dass mitochondriale Oxidation und ROS als auch ein gestörter diastolischer Ca^{2+} -Abbau das Risiko für Arrhythmien erhöhen^{34,195}. Auch in früheren Modellen von ACM konnte eine erhöhte Arrhythmie-Neigung von Kardiomyozyten nachgewiesen werden^{123,141,145}. Daher analysierte ich die Arrhythmie-Neigung in transgenen Kardiomyozyten anhand des Auftretens von nicht-stimulierten Spontankontraktionen. Daten zur Bestimmung der Arrhythmie-Neigung wurden am Ende des 5Hz/Isoprenalin-Stressprotokolls der Fluoreszenzmessungen von NAD(P)H und FADH erhoben (siehe 3.5.3). Zu diesem Zeitpunkt ist der mitochondriale Redoxstatus oxidiert, wodurch zelluläre Arrhythmien typischerweise auftreten.

4.3.1.1 Plakophilin 2

Die zelluläre Arrhythmie-Neigung wurde bei vier, acht und zwölf Wochen alten PKP2 KO Kardiomyozyten ermittelt und mit gleichaltrigen Kontroll-Kardiomyozyten verglichen.

PKP2 KO-Kardiomyozyten zeigten im Alter von acht und zwölf Wochen, nicht aber mit vier Wochen, im Vergleich zu den Kontroll-Kardiomyozyten mehr spontane (d. h. nicht-stimulierte) Kontraktionen, nachdem die Stimulation von 5 Hz auf 0,5 Hz reduziert worden war (Abb. 33).

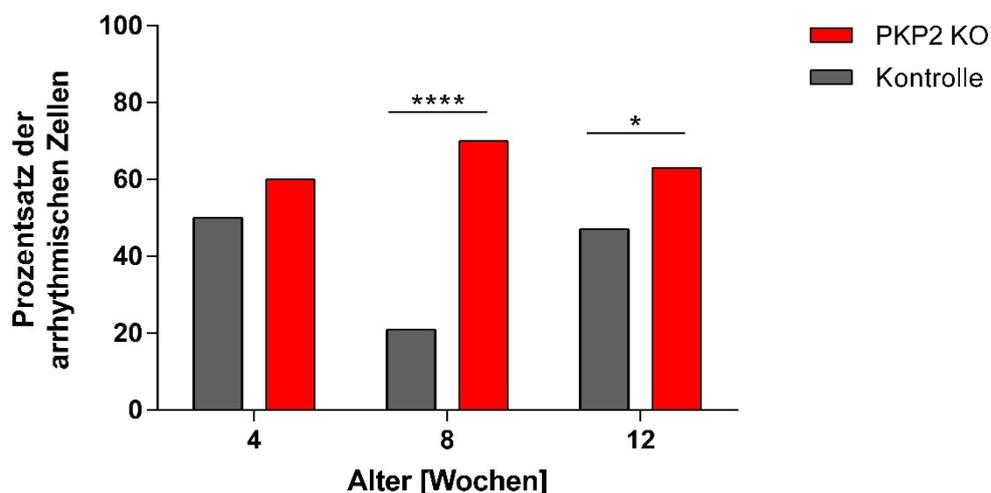


Abb. 33: Arrhythmie-Neigung bei PKP2 KO Kardiomyozyten

Prozentsatz der Herzmuskelzellen, die nicht-stimulierte Sarkomerverkürzungen ("arrhythmische Zellen") nach Iso/5 Hz im Alter von vier, acht und zwölf Wochen aufwiesen. Die Daten wurden aus den Experimenten dargestellt in Abb. 29-Abb. 31 extrahiert. Es wurden für vier Wochen: Kontrollen n=40/3, PKP2 KO n=35/3; acht Wochen: Kontrollen n=38/3, PKP2 KO n=40/3; zwölf Wochen: Kontrollen n=36/3, PKP2 KO n=40/3 Zellen/Mäuseherzen verwendet. P-Werte wurden mittels dem Fisher's Exact Test berechnet. *, **** = p < 0,05; 0,0001.

4.3.1.2 Plakoglobin

PG KO und Kontroll-Kardiomyozyten wurden im Alter von sechs Wochen auf ihre Arrhythmie-Neigung untersucht.

PG KO-Kardiomyozyten zeigten im Alter von sechs Wochen im Vergleich zu den Kontroll-Kardiomyozyten mehr spontane (d. h. nicht-stimulierte) Kontraktionen, nachdem die Stimulation von 5 Hz auf 0,5 Hz reduziert worden war (Abb. 34).

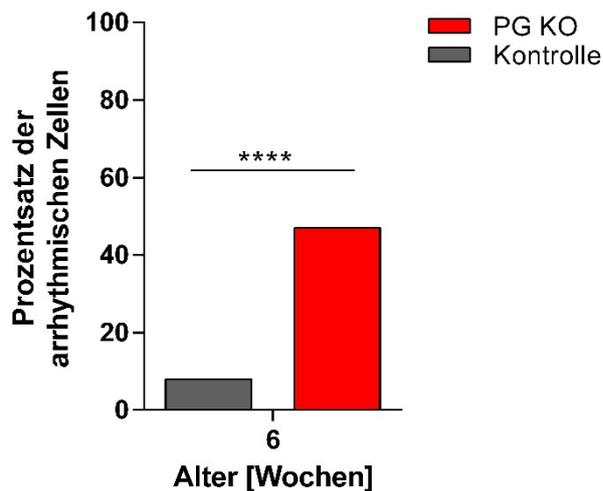


Abb. 34: Arrhythmie-Neigung bei PG KO Kardiomyozyten

Prozentsatz der Herzmuskelzellen, die nicht-stimulierte Sarkomerverkürzungen ("arrhythmische Zellen") nach Iso/5 Hz im Alter von sechs Wochen aufwiesen. Die Daten wurden aus den Experimenten dargestellt in Abb. 32 extrahiert. Es wurden für Kontrollen n=40/3, PG KO n=32/3 Zellen/Mäuseherzen verwendet. P-Werte wurden mittels dem Fisher's Exact Test berechnet. **** = $p < 0,0001$.

4.4 Ergebnisse der Messungen am Oroboros®-System

Mehrere Studien haben bereits eine gestörte Mitochondrienfunktion und oxidativen Stress als Ursache der ACM-Kardiomyopathie diskutiert^{57,127}. Zur genaueren Beurteilung der mitochondrialen Energetik der PKP2 und PG KO-Mäuse wurde an isolierten Mitochondrien deren Funktion mithilfe des Oroboros®-Systems untersucht. Hierbei wurden folgende Parameter ermittelt: der mitochondriale Sauerstoffverbrauch, das mitochondriale Membranpotential und die H₂O₂-Emission. Um Substratpräferenzen differenzierter zu erfassen, wurde die mitochondriale Funktion jeweils unter Zugabe von Pyruvat/Malat, Succinat oder Fettsäuren verglichen.

4.4.1.1 Plakophilin 2

Die mitochondrialen Messungen an PKP2 KO wurden im Alter von acht und zwölf Wochen durchgeführt. Anhang 1 und Abb. 35 stellen die Ergebnisse der respiratorischen Messungen an kardialen Mitochondrien aus den **acht Wochen** alten Kontroll- und PKP2 KO-Mäusen bei Verwertung von entweder Kohlenhydraten (Pyruvat/Malat, Succinat; Anhang 1) oder Fettsäuren (Abb. 35) dar. Der Sauerstoffverbrauch der kardialen Mitochondrien zeigte keine signifikanten Unterschiede in Abwesenheit (State 2) oder in Anwesenheit steigender ADP-Konzentrationen (State 3), wobei entweder Pyruvat/Malat (P/M), welche Komplex I der ETC speisen, Succinat (succ; Speisung von Komplex II der ETC) oder Fettsäuren umgesetzt wurden. In beiden Versuchsgruppen stieg nach Zugabe von ADP der Sauerstoffverbrauch erwartungsgemäß an und fiel nach Inhibition der F₁/F₀-ATPase durch Oligomycin wieder auf die Ausgangswerte, wie unter State 2 Bedingungen gemessen, zurück. Die dabei noch zu messende Restatmung (State 4) war in beiden Genotypen vergleichbar (Anhang 1, Abb. 35: A). Das Verhältnis (engl.: *ratio*) von State 3 zu State 2, „Respiratory control ratio“ (RCR), zeigte ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Gruppen, was auf gut gekoppelte Mitochondrien schließen lässt (Anhang 1, Abb. 35: B). $\Delta\Psi_m$ polarisierte nach der Zugabe von Substrat und depolarisierte, wenn ADP die Atmung beschleunigte. Bei den Zuständen 2, 3 und 4 wurden keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen festgestellt (Anhang 1, Abb. 35: C). Das mitochondriale H₂O₂ war in beiden Gruppen während der Atmung im State 2 oder 3 oder nach der Blockade von Komplex III mittels Antimycin A (AntA) vergleichbar (Anhang 1, Abb. 35: D). Antimycin A ruft eine übermäßige Bildung von Superoxid und damit H₂O₂ am Komplex III der ETC hervor und dient damit als positive Kontrolle¹⁹⁰.

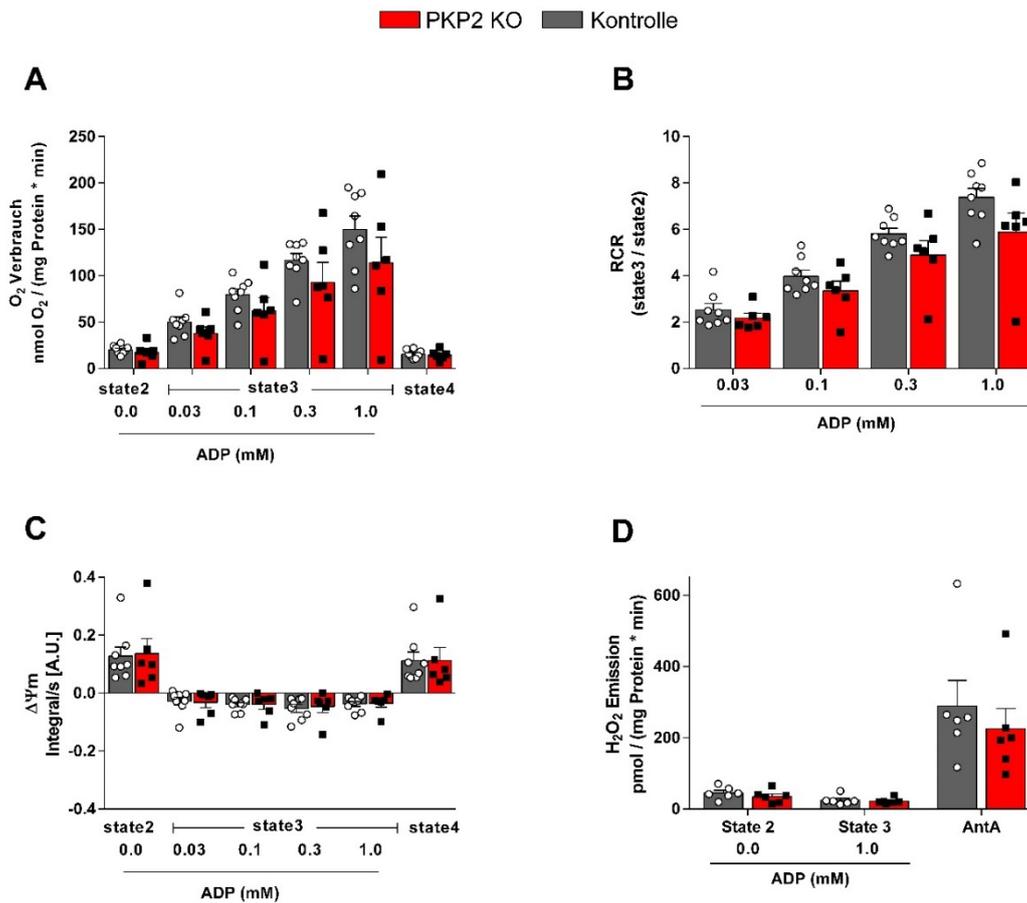


Abb. 35: Respirometrie und $\Delta\Psi_m$ bei acht Wochen alten PKP2 KO Mitochondrien mit Fettsäuren als Substrat

Sauerstoffverbrauch (A) und $\Delta\Psi_m$ (C) in isolierten Herzmitochondrien von acht Wochen alten PKP2 KO mit Fettsäuren als Substrat, jeweils in Abwesenheit von ADP (state 2), bei Zugabe steigender ADP-Konzentrationen (state 3) und nach Oligomycin-Behandlung (state 4). (B) Das Respiratory Control Ratio (RCR) entspricht dem Verhältnis von state 3 zu state 2. (D) Mitochondriale H₂O₂-Emission unter den Bedingungen von state 2 und 3 sowie nach Zugabe von Antimycin A (AntA). Es wurden für Kontrollen n=6-8, für PKP2 KO n=6 Mäuseherzen verwendet. Darstellung als Mittelwerte \pm SEM und Signifikanztest mittels two-way ANOVA und einem Bonferroni-Post-hoc-Test für Mehrfachvergleiche.

Die mitochondriale Funktion der PKP2 KO Mäuse wurde in einem späteren Krankheitsstadium, im Alter von **zwölf Wochen**, erneut erfasst. Anhang 2 und Abb. 36 verdeutlichen, dass auch die zwölf Wochen alten PKP2 KO sich im mitochondrialen Sauerstoffverbrauch nicht von ihren gleichaltrigen gesunden Geschwistertieren unterscheiden. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im State 2, State 3 oder State 4, weder mit Pyruvat/Malat, mit Succinat noch mit Fettsäuren als Substrate (Anhang 2, Abb. 36: A). Der RCR als Maß für die Integrität der Mitochondrien unterschied sich ebenfalls nicht zwischen den Mauspopulationen (Anhang 2, Abb. 36: B). Das durch die Zugabe von Substraten aufgebaute $\Delta\Psi_m$ dissipierte unter der „Pull“-Aktivierung der Atmungskette durch ADP kontinuierlich. Zwischen den Genotypen wurden in State 2, 3 und 4 keine Unterschiede im $\Delta\Psi_m$ festgestellt (Anhang 2, Abb. 36: C). Die H₂O₂-Emission von PKP2 KO und Kontrollen war vergleichbar in An- und Abwesenheit von Substrat sowie bei Zugabe von Antimycin A (Anhang 2, Abb. 36: D).

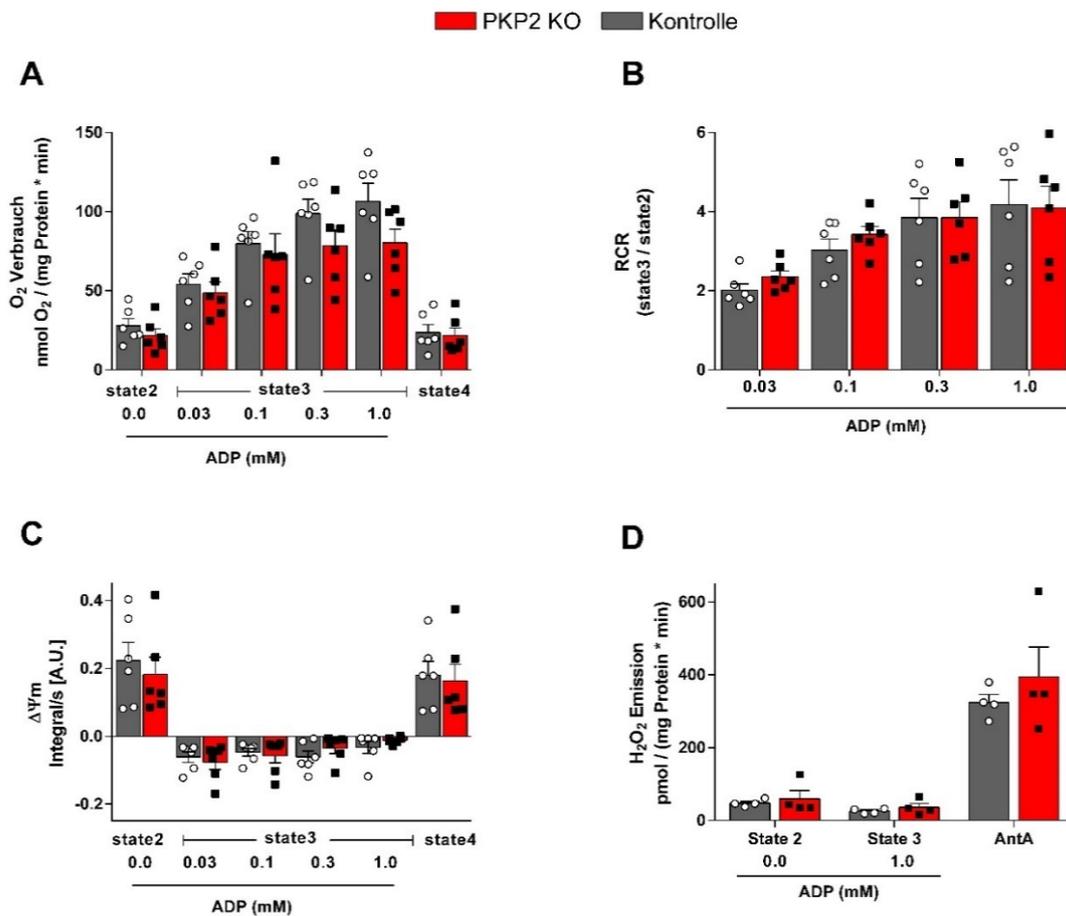


Abb. 36: Respirometrie und $\Delta\Psi_m$ bei zwölf Wochen alten PKP2 KO Mitochondrien mit Fettsäuren als Substrat

Sauerstoffverbrauch (A) und $\Delta\Psi_m$ (C) in isolierten Herzmitochondrien von zwölf Wochen alten PKP2 KO mit Fettsäuren als Substrat, jeweils in Abwesenheit von ADP (state 2), bei Zugabe steigender ADP-Konzentrationen (state 3) und nach Oligomycin-Behandlung (state 4). (B) Das Respiratory Control Ratio (RCR) entspricht dem Verhältnis von state 3 zu state 2. (D) Mitochondriale H_2O_2 -Emission unter den Bedingungen von state 2 und 3 sowie nach Zugabe von Antimycin A (AntA). Es wurden für Kontrollen $n=4-8$, für PKP2 KO $n=4-6$ Mäuseherzen verwendet. Darstellung als Mittelwerte \pm SEM und Signifikanztest mittels two-way ANOVA und einem Bonferroni-Post-hoc-Test für Mehrfachvergleiche.

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass isolierte kardiale Mitochondrien von PKP2 KO-Mäusen eine normale Atmungskapazität hatten und nicht mehr ROS freisetzen als die Mitochondrien von den Kontrolltieren. Es war keine Substratpräferenz zwischen Kohlenhydrat- oder Fettsäurenverstoffwechslung zu beobachten. Auffällig war auch eine hohe Variabilität der mitochondrialen Atmung innerhalb der PKP 2 KO-Versuchsgruppe.

4.4.1.2 Plakoglobin

Messungen am Oroboros-System wurden an sechs Wochen alten kardialen Mitochondrien der PG KO und deren Kontrolltieren durchgeführt. In Anhang 3 und Abb. 37 sind die mitochondrialen Funktionsmessungen der sechs Wochen alten PG KO Mäuse im Vergleich zu gesunden Geschwistertieren zu sehen. Wobei entweder Pyruvat/Malat und Succinat (Anhang 3) oder Fettsäuren (Abb. 37) als Substrat verstoffwechselt wurden. Es ergaben sich weder bei isolierter Zugabe von Substrat

(State 2) noch bei zusätzlichem ADP (State 3) und anschließender F1/FO-ATPase-Inhibierung durch Oligomycin (State 4) Unterschiede zwischen PG KO und Kontrollen (Anhang 3, Abb. 37: A). Die RCR beider Mauspopulationen unterschied sich unabhängig vom Substrat nicht (Anhang 3, Abb. 37: B). Das $\Delta\Psi_m$ baute sich in beiden Mauspopulationen in gleichem Maße unter Substratzufuhr auf, bzw. bei ADP-Zugabe durch Aktivierung der F1/FO-ATPase ab. Es konnten keine Unterschiede im $\Delta\Psi_m$ unter State 2, 3 oder 4 festgestellt werden (Anhang 3, Abb. 37: C). Die mitochondriale H_2O_2 -Emission beider Genotypen war im State 2, in welchen Elektronen vermehrt aberrant auf Atmungskettenkomplexe überspringen und ROS bilden können, als auch im physiologischen State 3 mit zusätzlicher „Push“-Aktivierung des Elektronentransports durch ADP, konstant niedrig und stieg unter Antimycin A Behandlung erwartungsgemäß an. Die H_2O_2 -Emission von PG KO unterschied sich nicht von Kontrollen (Anhang 3, Abb. 37: D).

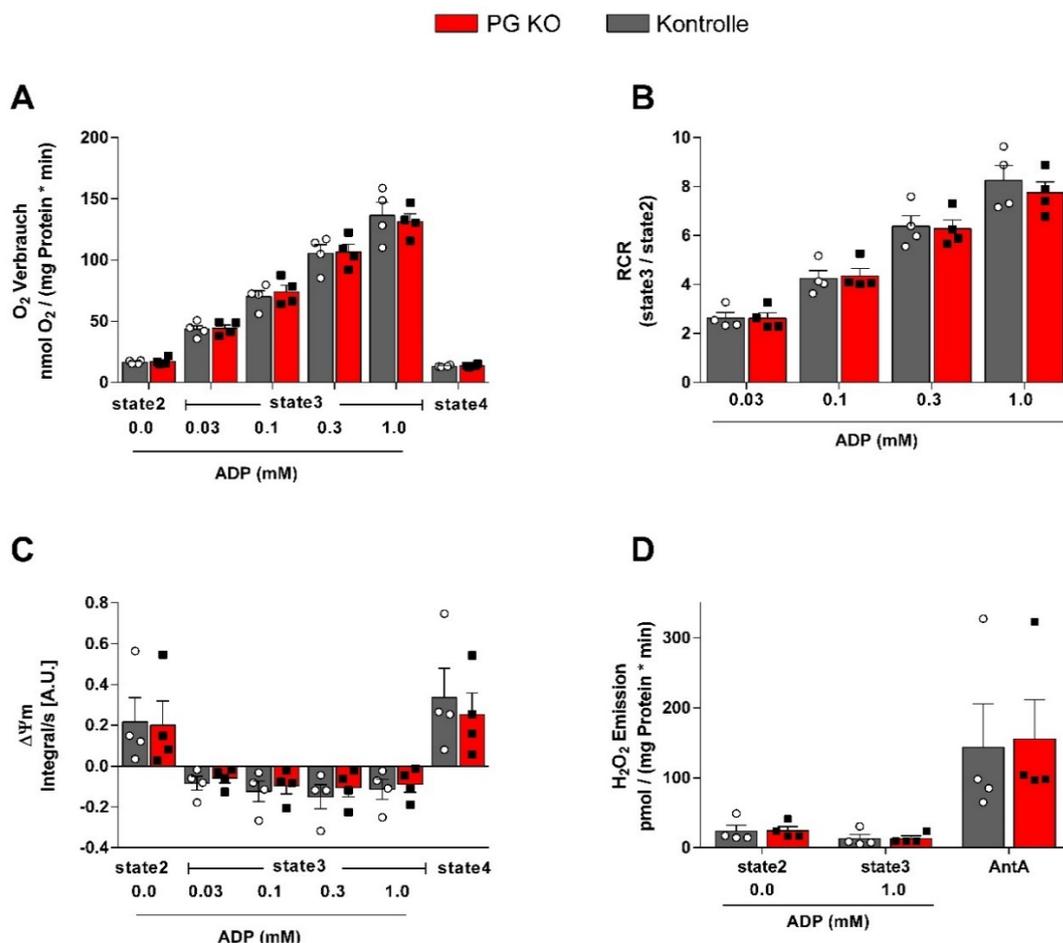


Abb. 37: Respirimetrie und $\Delta\Psi_m$ bei sechs Wochen alten PG KO Mitochondrien mit Fettsäuren als Substrat

Sauerstoffverbrauch (A) und $\Delta\Psi_m$ (C) in isolierten Herzmitochondrien von sechs Wochen alten PG KO mit Fettsäuren als Substrat, jeweils in Abwesenheit von ADP (state 2), bei Zugabe steigender ADP-Konzentrationen (state 3) und nach Oligomycin-Behandlung (state 4). (B) Das Respiratory Control Ratio (RCR) entspricht dem Verhältnis von state 3 zu state 2. (D) Mitochondriale H_2O_2 -Emission unter den Bedingungen von state 2 und 3 sowie nach Zugabe von Antimycin A (AntA). Es wurden für Kontrollen n=4, für PG KO n=4 Mäuseherzen verwendet. Darstellung als Mittelwerte \pm SEM und Signifikanztest mittels two-way ANOVA und einem Bonferroni-Post-hoc-Test für Mehrfachvergleiche.

Zusammengefasst zeigten die isolierten kardialen Mitochondrien von PG KO-Mäusen eine uneingeschränkte Atmungskapazität, eine gute Kopplung von Sauerstoffverbrauch und oxidativer Phosphorylierung und keine erhöhte ROS-Freisetzung. Kohlenhydrate und Fettsäuren wurden im gleichen Maße gut von den Mitochondrien umgesetzt.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen eines Kardiomyozyten-spezifischen, perinatalen Knockouts von jeweils PKP2 oder PG auf die mitochondriale Funktion und die EC-Kopplung untersucht. PKP2 KO- und PG KO-Kardiomyozyten entwickelten eine diastolische Dysfunktion bei erhaltenem fractional shortening auf Einzelzellebene, was im Gegensatz zu der stark eingeschränkten systolischen Herzfunktion *in vivo* steht. Während in PKP2 KO die diastolische $[Ca^{2+}]_c$ sowie die Amplitude der $[Ca^{2+}]_c$ -Transienten erhöht waren, zeigten sich in PG KO keine Veränderungen des Ca^{2+} -Haushaltes. In beiden Mausmodellen hatte der Verlust des jeweiligen desmosomalen Proteins keinen Einfluss auf die mitochondriale Atmungskapazität, H_2O_2 -Bildung oder Redoxstatus. Allerdings konnte in beiden transgenen Mauslinien eine erhöhte Neigung zu zellulären Arrhythmien beobachtet werden. In dieser Arbeit wird erstmals beschrieben, dass für die Entwicklung einer ACM in den verwendeten Mausmodellen eine mitochondriale Dysfunktion und ROS nicht erforderlich waren. Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit liefern demnach bedeutende Hinweise zum weiteren Verständnis der Pathophysiologie der ACM.

5.1 EC-Kopplung

PKP2 KO-Mäuse entwickelten im Alter ab 4 Wochen progressiv einen ACM-Phänotyp. Um die zellulären und molekularen Mechanismen zu durchdringen, untersuchte ich dieses Mausmodell zu mehreren Zeitpunkten der Krankheitsentwicklung (im Alter von vier, acht und zwölf Wochen – repräsentativ für frühes, mittleres und spätes Krankheitsstadium). Angesichts vorheriger Daten¹²³ und der Tatsache, dass der Phänotyp, sobald er in Erscheinung tritt, sowohl strukturelle als auch elektrische Pathologien aufweist, setzte ich den Fokus auf eine zelluläre Funktion, die im Mittelpunkt sowohl der Erregbarkeit als auch der Kontraktion steht, nämlich die EC-Kopplung.

Die Sarkomerlänge von PKP2-KO-Kardiomyozyten war zu jedem Analysezeitpunkt kürzer als die der Kontroll-Kardiomyozyten, was auf eine diastolische Dysfunktion auf zellulärer Ebene schließen lässt (Abb. 21-Abb. 23:A). Trotz einer echokardiographisch objektivierten verminderten Ejektionsfraktion wiesen PKP2 KO-Kardiomyozyten keine systolische Dysfunktion auf zellulärer Ebene auf, sondern konnten das zelluläre FS

erhalten und mit acht Wochen sogar im Vergleich zu Kontrollen steigern (Abb. 21-Abb. 23: B). Dies konnte auch in einem Kardiomyozyten-spezifischen, durch Tamoxifen aktivierten homozygoten *PKP2* Knockout (*PKP2cKO*) Mausmodell gezeigt werden, in welchem der Verlust von *PKP2* kardiale Kontraktionsdefizite verursachte, trotz erhöhtem FS einzelner Kardiomyozyten¹⁴¹. Der Energiebedarf unbelasteter, isolierter Kardiomyozyten wird tendenziell unterschätzt, da sie im Vergleich zu den Kardiomyozyten im intakten Herzen keiner Vorlast ausgesetzt sind. Nach dem Frank-Starling-Mechanismus steigert eine vorlastabhängige Potenzierung der Kraft den mitochondrialen O₂-Verbrauch in direktem Verhältnis zur kardialen Krafterzeugung¹⁹⁶. In unveröffentlichten Experimenten der Arbeitsgruppe von Gerull et al. konnte gezeigt werden, dass die verstärkte Sarkomerverkürzung unbelasteter Kardiomyozyten zu einer erhöhten Krafterzeugung einzelner Kardiomyozyten führt, wenn diese mechanisch auf eine physiologische Sarkomerlänge von ~2 µm vorbelastet werden. Dies weist darauf hin, dass *PKP2*-defiziente Kardiomyozyten hyperkontraktile sind und hierfür womöglich mehr O₂ und ATP verbrauchen. Es ist anzunehmen, dass die Steigerung des FS und der Kraftentwicklung einzelner Kardiomyozyten Teil des Anpassungsmechanismus ist, um für den Kardiomyozytenverlust und fibrösen Umbau im Herzen einen Ausgleich zu schaffen. Ein weiterer Erklärungsansatz für die Hyperkontraktilität der *PKP2* KO-Kardiomyozyten ist, dass die Integrität des Zellverbandes in Plakophilin 2-defizitären Herzen nicht mehr gegeben ist. Die gestörte Desmosomen-Formierung könnte durch fehlende Verankerung der Kardiomyozyten zu ihren Nachbarzellen bewirken, dass diese stärker kontrahieren müssen, um im Myokard insgesamt eine Kontraktion auszulösen. Studien auf zellulärer Ebene konnten zeigen, dass eine Beeinträchtigung der Assoziation von Desmosomen mit Intermediärfilamenten zu einer verringerten Zellspannung und Steifigkeit führt¹⁹⁷. Es ist zu vermuten, dass dies eine stärkere Kontraktion der einzelnen Kardiomyozyten zur Folge hat, weil diese einem geringeren Widerstand entgegenarbeiten müssen. Auf der Gewebeebene dagegen würde dies zu einer geschwächten Ventrikelwand und zu einer Dilatation des Herzens führen¹²¹. Zusammenfassend zeigen Ergebnisse dieser Arbeit, dass die verminderte systolische Herzfunktion nicht allein durch Defekte der EC-Kopplung zu erklären ist, wie es bei den meisten anderen Formen von Dilatativer Kardiomyopathie der Fall ist^{198,199}.

Des Weiteren wurde in der hier präsentierten Arbeit eine erhöhte diastolische und systolische [Ca²⁺]_c als auch erhöhte Amplituden von [Ca²⁺]_c-Transienten in *PKP2*-KO-Kardiomyozyten festgestellt. Dies zeigte sich für die diastolische und systolische

$[Ca^{2+}]_c$ sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit einer β -adrenergen Stimulation. $[Ca^{2+}]_c$ -Transientenamplituden waren lediglich in Abwesenheit einer β -adrenergen Stimulation erhöht (Abb. 25-Abb. 27: A, B). Diese Veränderungen waren in verschiedenen Krankheitsstadien sichtbar und gingen ausgedehnten strukturellen Veränderungen am Herzen voraus.

Veränderung der Ca^{2+} -Homöostase in Zusammenhang mit *PKP2*-Ablation konnte bereits in Arbeiten der Arbeitsgruppe von Delmar in *PKP2cKO*-Kardiomyozyten gezeigt werden¹²³. *PKP2cKO*-Kardiomyozyten wiesen analog 14 Tage nach Tamoxifen-Injektion erhöhte diastolische $[Ca^{2+}]_c$ und erhöhte Ca^{2+} -Transientenamplituden auf¹²³. Getrennte Untersuchungen an Kardiomyozyten vom rechtem und linkem Ventrikel desselben Mausmodells konnten eine Anhäufung von Ca^{2+} in drei intrazellulären Kompartimenten (dem SR, dem Zytoplasma und den Mitochondrien) nachweisen sowie eine stärkere Beeinflussung des rechten Ventrikels im Vergleich zum linken Ventrikel präzisieren. Zusätzlich wurde gezeigt, dass *PKP2*-Mangel einen Überschuss an „verwaisten“ Cx43 Membran-Hemikanälen verursacht, wodurch die Membranpermeabilität erhöht wurde¹²¹. Dies stellt einen potenziellen Mechanismus für den intrazellulären Kalziumüberschuss dar, der auch in der hier präsentierten Arbeit vorlag. Körperliche Belastung verstärkte den Phänotyp in *PKP2cKO*-Mäusen^{141,144}. Die vorliegende Arbeit erweitert den derzeitigen Wissenstand, indem gezeigt werden konnte, dass der Anstieg der diastolischen $[Ca^{2+}]_c$ auch mit einer stärkeren diastolischen Sarkomerverkürzung einherging, was insgesamt auf eine diastolische Dysfunktion in *PKP2 KO* Kardiomyozyten hinweist (Abb. 21-Abb. 23: A). Im späterem Krankheitsstadium (zwölf Wochen alte Tiere) war trotz diastolischer Dysfunktion nur die systolische $[Ca^{2+}]_c$ erhöht, während sich die diastolische $[Ca^{2+}]_c$ nicht von Kontrolltieren unterschied (Abb. 27: A). Eine erhöhte Ca^{2+} -Affinität der Myofilamente konnte ausgeschlossen werden (Abb. 27: E, F). Es kann angenommen werden, dass die verstärkte Sarkomerverkürzung in *PKP2 KO*-Kardiomyozyten in erster Linie durch den Anstieg von $[Ca^{2+}]_c$ bedingt ist. Jedoch könnten auch Veränderungen der Myofilamente die reduzierte diastolische Sarkomerlänge beeinflussen.

Auch Studien an aus menschlichen iPSC gewonnenen Kardiomyozyten (iPSC-CM) mit einer homozygoten *PKP2*-Mutation hatten Defizite bei der Kalziumverarbeitung. Insbesondere wiesen sie einen postsystolisch verlangsamten Ca^{2+} -Abfall mit einer globalen Herunterregulierung der SERCA- und der NCX-mRNA-Spiegel auf¹²⁷. Teilweise gegensätzlich dazu präsentieren sich die Ergebnisse dieser Doktorarbeit.

Neben einer unbeeinflussten Time to peak (TTP) relaxierten PKP2 KO Zellen zum Teil schneller als Kontroll-Kardiomyozyten (Abb. 21-Abb. 23: C, D; Abb. 25-Abb. 27: C, D). Jedoch waren unter physiologischen Stressbedingungen sowohl Relaxation der Sarkomere als auch $[Ca^{2+}]_c$ -Elimination beider Versuchsgruppen nicht unterschiedlich. Die Übertragbarkeit von Daten, welche in iPSC-CM gewonnen wurden, auf adulte Kardiomyozyten ist aufgrund des unreifen Phänotyps der iPSC-CM eingeschränkt. Ein großer Unterschied, der die Ca^{2+} -Kinetik zwischen adulten und iPSC-CM beeinflussen kann, ist, dass in iPSC-CM wichtige Proteine, die an der Vermittlung der Aufnahme und Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR beteiligt sind (Calsequestrin, RyR, Phospholamban) nur in geringem Umfang oder gar nicht exprimiert werden²⁰⁰.

Auch die Arbeitsgruppe von Delmar beobachtete in PKP2cKO Kardiomyozyten eine Verlängerung der $[Ca^{2+}]_c$ -Elimination als auch eine Verlängerung der Zeit bis zur maximalen $[Ca^{2+}]_c$ (TTP), was die Autoren auf ein verlängertes Aktionspotential der Zellen zurückführten¹²³. In gesonderten Untersuchungen der rechtsventrikulären Kardiomyozyten konnte lediglich eine verlängerte $[Ca^{2+}]_c$ -Elimination bei unveränderter TTP festgestellt werden, was diesmal durch eine verringerte SERCA2a-Proteinkonzentration (bei unveränderter Transkription) erklärt wurde¹²¹. In PKP2cKO-Kardiomyozyten beschleunigte körperliche Anstrengung die Relaxation¹⁴⁴. Dem zugrunde konnte ein stärkerer Anstieg von phosphoryliertem Phospholamban (PInS16,T17) in PKP2cKO festgestellt werden¹⁴⁴, was die $[Ca^{2+}]_c$ -Wiederaufnahme in das SR begünstigt²⁰¹.

Da bereits körperliche Belastungsphasen eine Anpassung der Ca^{2+} - und Kontraktionskinetik in PKP2-defizienten Mäusen hervorriefen¹⁴⁴, ist auch anzunehmen, dass sich Mäuse auf das Fehlen von PKP2 anpassen könnten. PKP2 fehlt Mäusen in PKP2-KO Kardiomyozyten dieser Arbeit bereits seit Geburt an, während PKP2 in dem Tamoxifen-induzierten Knockout-Modell juvenilen/adulten Mäusen „weggenommen“ wird¹²³. Unterschiede zwischen PKP2 KO- und PKP2cKO-Kardiomyozyten könnten daher auch auf Anpassungsmechanismen der PKP2 KO-Mäuse an das lebenslange Fehlen von PKP2 begründet sein. Beispielsweise wäre an eine funktionelle Hochregulierung der SERCA und des NCX zu denken, um die hohen Ca^{2+} -Spiegel abzutransportieren. Dies stellt einen potenziellen Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den PKP2cKO^{121,123,144} und den PKP2 KO Kardiomyozyten aus dieser Doktorarbeit dar.

Insgesamt lässt sich allerdings schlussfolgern, dass die Autoren der genannten Studien inkonsistente Erklärungsansätze (veränderte SERCA- und NCX-Funktion¹²⁷;

veränderte SERCA-Funktion bei unveränderter NCX-Funktion¹²¹; verlängertes Aktionspotential bei unveränderter NCX-Funktion¹²³) für die veränderte Ca²⁺- und Kontraktionskinetik bei funktionellem Verlust von PKP2 liefern. Bezüglich des Einflusses von PKP2 auf diese Parameter besteht weiterer Klärungsbedarf.

Obwohl diese Studien Licht in bisher unbekannte molekulare Interaktionen gebracht haben, sind sie doch durch die Verwendung Gen-spezifischer experimenteller Modelle begrenzt. Es bleibt unklar, ob eine gestörte Ca²⁺-Homöostase auch bei der durch Mutationen in anderen Genen verursachten ACM eine Rolle spielt. Explizit für ACM durch Mutationen im *JUP*-Gen und daraus resultierendem PG-Defizit gibt es derzeit keine Studien bezüglich der EC-Kopplung. In dieser Doktorarbeit werden nun erstmals Daten dazu präsentiert.

Die diastolische Sarkomerlänge von PG KO-Kardiomyozyten war signifikant verkürzt als die der Kontroll-Kardiomyozyten, was eine diastolische Dysfunktion impliziert (Abb. 24: A). Dennoch war das FS der PG KO-Kardiomyozyten vergleichbar mit dem FS der Kontroll-Kardiomyozyten (Abb. 24: B).

Im Gegensatz zu den Daten aus Modellen basierend auf PKP2-Defizienz^{121,123,127,141,142}, ging die veränderte Zellkontraktilität in PG KO-Kardiomyozyten nicht mit Veränderungen des Ca²⁺-Haushaltes einher. Somit konnte in dieser Doktorarbeit erstmals gezeigt werden, dass ein kardialer Verlust von *JUP* während der frühen Postnatalphase keinen Einfluss auf [Ca²⁺]_c, Ca²⁺-Amplituden oder Ca²⁺-Kinetik der Kardiomyozyten nimmt (Abb. 28: A-D). In einem anderen ACM-Modell zeigten Untersuchungen an iPSC-Kardiomyozyten mit Desmoglein 2 (Dsg2)-Mutation analog zum PG KO-Modell keine Unterschiede der systolischen und diastolischen Ca²⁺-Spiegel²⁰². In Desmosomen bildet PG einen Komplex mit Dsg2²⁰³, wodurch anzunehmen ist, dass der Verlust des einen oder anderen Proteins ähnliche Auswirkungen haben könnte. Vor kurzem wurde eine neue autosomal dominante Plakoglobin-Mutation (S39_K40insS) in einer deutschen Familie mit ACM identifiziert. Dieses mutierte PG-Protein stellte neuartige Wechselwirkungen mit dem Histidinreichen kalziumbindenden Protein her²⁰⁴; ein Protein, welches im sarkoplasmatischen Retikulum von Herzmuskelzellen lokalisiert und für die Kontrolle der Ca²⁺-Freisetzung verantwortlich ist²⁰⁵. Inwieweit dies Auswirkungen auf die Ca²⁺-Homöostase hat, wurde jedoch nicht untersucht²⁰⁴.

Da in der vorliegenden Doktorarbeit die diastolische Vorspannung der Sarkomere und das erhaltene FS in PG KO-Kardiomyozyten weder durch erhöhte Ca²⁺-Spiegel noch durch eine erhöhte Ca²⁺-Affinität der Myofilamente erklärbar war, ist anzunehmen,

dass Veränderungen der Myofilamente selbst Ursache für die diastolische Dysfunktion sein könnten. Auf diese Hypothese weisen auch ultrastrukturelle Untersuchungen der Sarkomere von Mauskardiomyozyten in einem induzierten PG-Knockout-Modell hin, welche verzerrte und komprimierte Sarkomere feststellten¹⁵⁵. Grund dafür könnte eine fehlende Stabilisierung und damit veränderte Verankerung der Myofilamente an der Plasmamembran sein. Zur genaueren Einschätzung der zellulären Kraftentwicklung wären weitere Experimente in vorbelasteten Kardiomyozyten, einem Szenario, das Bedingungen im intakten Herzen simuliert, notwendig. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *in vivo* beobachtete systolische Dysfunktion des Herzens in PG KO-Mäusen wahrscheinlich nicht durch eine gestörte EC-Kopplung zustande kommt.

5.2 Zelluläre Arrhythmie Neigung

Untersuchungen der zellulären Spontanaktivität zielten darauf ab eine erhöhte Arrhythmie Neigung aufgrund von intrazellulären Mechanismen zu identifizieren. PKP2 KO-Kardiomyozyten zeigten ab einem Alter von acht Wochen proarrhythmogene Veränderungen.

Analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit konnte eine erhöhte zelluläre Arrhythmie Neigung auch in Studien an den bereits erwähnten PKP2cKO-Kardiomyozyten festgestellt werden¹²³, welche vermehrt rechtsventrikulär¹²¹ und zu einem Zeitpunkt auftraten, der vor dem Auftreten von elektrischen oder strukturellen Phänotypen lag. In den späten Stadien der ACM kann das Vorhandensein anatomischer Strukturen Reentry-Arrhythmien recht einfach erklären. Dagegen sind die Mechanismen, die der hohen Inzidenz von Arrhythmien in der frühen, so genannten "verborgenen" Phase der Krankheit zugrunde liegen, noch weitgehend unklar⁹⁵. Ein neu entdeckter Mechanismus, der die Arrhythmogenität bei der frühen PKP2-getriebenen ACM zumindest teilweise erklären könnte, lieferte die Arbeitsgruppe von Delmar. Infolge eines erniedrigten SR-Ca²⁺-Lecks war in PKP2cKO-Kardiomyozyten der SR-Ca²⁺-Gehalt deutlich erhöht. Hieraus resultierte eine erhöhte Amplitude und Häufigkeit spontaner Ca²⁺-Freisetzungseignisse („Sparks“) aus dem SR während der EC-Kopplung. Während der β -adrenergen Stimulation mit Isoprenalin konnten frühe und späte Nachpolarisation in PKP2cKO-Kardiomyozyten detektiert werden. Diese ISO-induzierten zellulären Arrhythmien wurden auf die erhöhte RyR2-abhängige Ca²⁺-Freisetzung zurückgeführt. Die Behandlung mit Flecainid, welches den Ca²⁺-Fluss durch RyR2-Kanäle begrenzen kann, konnte das Auftreten von ventrikulären Arrhythmien wirksam reduzieren¹²³. Lyon et al. bewerteten in einem bioinformatischen

Ansatz die Übertragung der Ergebnisse aus den Studien an PKP2cKO-Mäusen auf den Menschen, indem sie ein Computermodell für menschliche ventrikuläre Kardiomyozyten verwendeten¹⁴⁵. Demnach trugen β -adrenerge Stimulation und Cnx43-vermittelter Ca^{2+} -Eintritt bei Verlust der PKP2-Funktion zur Entstehung später Nachpolarisationen bei, für welche die Dysregulation von RyR2 eine Schlüsselrolle spielte¹⁴⁵.

Arrhythmien stellen auch für Patienten mit *JUP*-bedingter ACM ein konstantes Risiko dar²⁰⁶. In diesem Zusammenhang konnte auch in dieser Doktorarbeit in PG KO-Kardiomyozyten eine erhöhte Arrhythmieneigung einzelner Kardiomyozyten festgestellt werden.

In dem von Li et al. 2011 etablierten Mausmodell mit Kardiomyozyten-restriktiven *JUP*-Knockout in der frühen Postnatalphase bestätigten elektrokardiogramm-Aufzeichnungen eine erhöhte Neigung zu spontanen ventrikulären Arrhythmien¹⁵². Im Gegensatz dazu zeigte der herzspezifische Knockout von *JUP* unter Verwendung einer kardialen Tamoxifen-induzierbaren $\alpha\text{MHC/MerCreMer}$ -Transgenie-Linie, bei PG-defizienten Mäusen einen viel milderen kardialen Phänotyp ohne das Auftreten von induzierten oder spontanen Arrhythmien¹⁵⁵. Dies betont, dass es aus physiologischer Sicht sinnvoller ist, *JUP* in der frühen Postnatalphase zu deletieren unter anderem auch da ACM vorwiegend junge Menschen betrifft⁷⁷.

Analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit konnten kürzlich durchgeführte Untersuchungen an iPSC-Kardiomyozyten mit DSG2-Mutation keine Unterschiede der systolischen und diastolischen Ca^{2+} -Spiegel feststellen. Trotzdem zeigten diese ACM iPSC-Kardiomyozyten in Abwesenheit als auch in Anwesenheit einer β -adrenergen Stimulation eine spontane SR- Ca^{2+} -Freisetzung und späte Nachpolarisationen, welche Arrhythmien auslösen könnten²⁰². Demnach könnten Ca^{2+} -Funken auch im PG KO Mausmodell trotz unbeeinflusster $[\text{Ca}^{2+}]_c$ Arrhythmien auslösen. Weitere Faktoren könnten die Dysregulierung der Gap Junctions oder des Na^+ -Stroms sein. Beides wurde bereits in Zusammenhang mit PG-Defizienz beschrieben¹⁵⁶.

5.3 Mitochondriale Funktion

In beiden Mausmodellen hatte der Verlust des jeweiligen desmosomalen Proteins keinen Einfluss auf die mitochondriale Funktion. Klassischerweise kann die mitochondriale Funktion über den Ca^{2+} -Haushalt oder den Redoxstatus beeinflusst werden.

Die unter 5.1 für PKP2-defiziente Kardiomyozyten beschriebene, intrazelluläre Ca^{2+} -Überladung scheint direkt auf eine erhöhte Verfügbarkeit von Cx43-Hemikanälen im Sarkolemm zurückzuführen sein¹²¹. Da Cx43 sowohl in den Glanzstreifen als auch in der mitochondrialen Membran vorkommt, und auch Studien zeigen konnten, dass Cx43-Hemikanäle am Ca^{2+} -Fluss in die Mitochondrien beteiligt sind²⁰⁷, ist ein pathophysiologischer Prozess zwischen einem gestörten Ca^{2+} -Haushalt und der mitochondrialen Funktion vermutbar. Bei einer Reihe anderer pathophysiologischer Prozesse, wie z.B. der Ischämie-Reperfusion, wurden Mitochondrien als entscheidendes Zentrum zur Pufferung des Ca^{2+} -Haushalts nachgewiesen^{43,124,194}. Die Pufferkapazität ist allerdings begrenzt, und sobald ein Schwellenwert überschritten wird, führt eine mitochondriale Ca^{2+} -Überladung zur Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion, was zu einer verminderten ATP-Produktion und erhöhten ROS-Freisetzung führt¹²⁴. Übersteigt die ROS-Produktion die Entgiftungskapazität der Zelle, kann so oxidativer Stress zu Repolarisations- und Erregungsleitungsanomalien führen, die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase verändern und Fibrosebildung sowie Zelltod-Induktion verursachen^{58,62}. In vorherigen Arbeiten wurde postuliert, dass in ACM ein Anstieg der mitochondrialen Permeabilität über mitochondriale Cx43-Kanäle eine mitochondriale Ca^{2+} -Überladung und dadurch oxidativen Stress zur Folge haben könnte⁵⁷. Aufgrund der begrenzten Menge an experimentellen Beweisen in ACM-Modellen ist es jedoch schwierig festzustellen, ob eine mitochondriale Dysfunktion tatsächlich der ACM-Pathogenese vorausgeht und/oder sie begleitet. Diese Doktorarbeit trägt dazu bei, die mitochondriale Funktion für ACM weiter zu entschlüsselt.

In von Patienten mit einer *PKP2*-Mutation gewonnenen iPSC-Kardiomyozyten (PKP2iPSC-CMs) konnte nach Koaktivierung von Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren, PPAR-alpha und PPAR-gamma, ein insgesamt verminderter Energiestoffwechsel mit stärkeren Defiziten in der Oxidation von Fettsäuren als in der Oxidation von Glukose festgestellt werden¹²⁷. Im Herzen findet nach der Geburt eine Umstellung des Stoffwechsels statt, bei der die Substratoxidation von vorwiegend Glukose auf vorwiegend Fettsäuren umgestellt wird. In dem bei Herzinsuffizienz beobachteten, so genannten metabolischen Burnout-Zustand, lag eine erneute Verschiebung zurück zu embryonalen Gegebenheiten mit vorwiegender Glukoseverwertung anstelle von Fettsäuren vor^{43,146}. Dies ähnelt der in PKP2-iPSC-CMs beobachteten Änderung der Substratpräferenz. Darüber hinaus verhinderte die Gabe von Antioxidantien den Zelltod der PKP2iPSC-CM. Autoren dieser Studie

folgerten demnach, dass pathologische metabolische Veränderungen dem Fortschreiten der durch *PKP2*-Mutation bedingten ACM zugrunde lägen¹²⁷. In rechtsventrikulären Biopsien von ACM-Patienten mit *PKP2*-Mutation konnte kürzlich die transkriptionelle Herabregulierung von Genen, die für Proteine der Elektronentransportkette kodieren, gezeigt werden¹²⁸. Gleichzeitig waren Gene, die an der Beseitigung von ROS beteiligt sind, hochreguliert. In dem zuvor bereits diskutierten *PKP2*cKO-Mausmodell führte der Verlust von *PKP2* zu einer eingeschränkten mitochondrialen Atmung mit erhöhtem Protonenleck in isolierten Kardiomyozyten. In derselben Studie fanden sich sowohl in *PKP2*cKO-Kardiomyozyten als auch iPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten (iPSC-CM) mit *PKP2*-Deletion im Vergleich zu den Kontrollen ein signifikant höheres Niveau von ROS. Überstände dieser iPSC-CM mit *PKP2*-Deletion wiesen höhere H₂O₂-Konzentrationen auf und Inkubation mit diesem Überstand erhöhte die ROS-Bildung in Kontroll-iPSC-CM Kardiomyozyten. Dieser Effekt konnte durch Co-Inkubation mit Katalase abgeschwächt werden¹²⁸. Daten dieser Studie deuten darauf hin, dass H₂O₂ von *PKP2*-defizienten Zellen in die extrazelluläre Umgebung freigesetzt wird und zu einer parakrinen Regulierung von entfernten Nachbarzellen im Sinne einer ROS-induzierten ROS-Freisetzung führen könnte.

Daten dieser Doktorarbeit zur mitochondrialen Funktion in ACM weichen von den oben genannten Studien ab. Isolierte Mitochondrien von *PKP2* KO-Herzen zeigten in Abwesenheit und Anwesenheit von ADP einen unveränderten mitochondrialen O₂-Verbrauch im Vergleich zu Kontrollen (Abb. 35-Abb. 36: A). Es wurde sowohl die Oxidation von Endprodukten der Glykolyse als auch die Fettsäureoxidation geprüft. Im Gegensatz zu den von Kim et al. 2013 beschriebenen Ergebnissen an *PKP2*iPSC-CMs¹²⁷, konnte keine Substratpräferenz hin zur Verstoffwechslung von Glukose in *PKP2* KO-Mitochondrien festgestellt werden. Die Respiratorische Control Ratio (RCR), als Maß der Integrität der Mitochondrien, wies eine gute Kopplung der *PKP2* KO-Mitochondrien nach, weshalb von einer gut funktionierenden oxidativen Phosphorylierung auszugehen ist (Abb. 35-Abb. 36: B). Gleichzeitig führten Substrat- und ADP-Zugabe in *PKP2* KO-Mitochondrien im gleichen Maße zum Auf- und Abbau des $\Delta\psi_m$ wie in Kontroll-Mitochondrien (Abb. 35-Abb. 36: C). In Abwesenheit und Anwesenheit von ADP als auch nach Antimycin A-Zugabe zeigte sich in *PKP2* KO keine erhöhte H₂O₂-Emission ganz gleich welche Substrate verstoffwechselt wurden (Abb. 35-Abb. 36: D). Diese Ergebnisse waren für *PKP2* KO-Mäuse in verschiedenen Altersstufen (acht und zwölf Wochen), trotz bereits eingetretener kardialer Dysfunktion

in vivo, nachweisbar. Zusammengenommen deuten diese Daten darauf hin, dass die Herzmitochondrien der PKP2 KO-Mäuse über eine intakte Atmungskette verfügen, ohne Anzeichen einer Entkopplung²⁰⁸ und ohne Beeinträchtigung der Fähigkeit, aus der Glykolyse stammendes Pyruvat oder Fettsäuren als die wichtigsten kardialen Brennstoffe zu verwerten²⁰⁹. Außerdem schließen diese Daten eine übermäßige ROS-Bildung an der Atmungskette oder eine beeinträchtigte antioxidative Kapazität weitgehend aus. Eine Einschränkung bei der Untersuchung isolierter Mitochondrien ist, dass es nicht auf die intakte Zelle oder das Gewebe extrapoliert werden kann. Während isolierte Mitochondrien meist sehr robust sind, demaskieren sich Unterschiede der mitochondrialen Atmung somit häufig erst in intakten Kardiomyozyten. Wenn sich Mitochondrien in ihrem physiologischen Kontext intakter Zellen befinden, arbeiten sie in einem intermediären Redoxstatus, der die ADP-Phosphorylierung maximiert und gleichzeitig die ROS-Produktion auf einem Minimum hält („Redox-optimierte ROS-Balance“). Oxidativer Stress entsteht in Zuständen extremer Reduktion durch Überwiegen der ROS-Produktion oder extremer Oxidation durch Depletion der antioxidativen Systeme⁵². Diese Prozesse sind in intakten Zellen durch dynamische Ca^{2+} - und ADP-Fluktuationen eng reguliert, weshalb in dieser Doktorarbeit die mitochondrialen NAD(P)H/FAD⁺-Redoxstatus als indirekte Marker der mitochondrialen Atmung und ROS-Emission in intakten Arbeitskardiomyozyten untersucht wurden. Der Redoxstatus unterschied sich auch bei Simulation einer erhöhten Arbeitslast nicht zwischen PKP2 KO- und Kontroll-Kardiomyozyten (Abb. 29-Abb. 31: A, B). Im Falle einer gestörten Atmungskette wäre eine Anreicherung von NAD(P)H und FADH₂ (Reduktion des Redoxstatus) zu erwarten, da diese nicht mehr abgebaut werden könnten⁵². Man könnte spekulieren, dass die verstärkte Sarkomerverkürzung der PKP2 KO-Herzmuskelzellen, den Energieaufwand an den Myofilamenten erhöht und dadurch ein Missverhältnis zwischen Energieangebot und -nachfrage schafft, wodurch möglicherweise der NAD(P)H/FAD⁺-Redoxstatus oxidiert wird. Eine transiente Oxidation des Redoxstatus war jedoch lediglich während des Übergangs zur erhöhten Arbeitsbelastung in PKP2 KO-Kardiomyozyten im Alter von zwölf Wochen zu beobachten, wobei sich der Redoxstatus nach Anpassung an die neuen Gegebenheiten schnell erholte (Abb. 31: A, B). Dies deutet darauf hin, dass der erhöhte Energieverbrauch von einem physiologischen Anstieg des mitochondrialen Ca^{2+} begleitet wird, der die Regeneration der Redoxäquivalente im Citratzyklus gewährleistet. Entgegen der Hypothese, dass eine mitochondriale Ca^{2+} -Überladung direkt oder indirekt über ROS die mitochondriale Atmung beeinträchtigt, spricht auch,

dass das $\Delta\psi_m$ in PKP2 KO-Zellen konstant aufrechterhalten wurde (Abb. 29-Abb. 31: C). Mitochondriale Ca^{2+} -Überladung würde die Öffnung einer großen Pore in den Mitochondrienmembranen, der so genannten Permeabilitäts-Transitions-Pore, auslösen, was zu einer $\Delta\psi_m$ -Depolarisation führen würde⁵⁶. Da Mitochondrien zwar als Hauptquelle jedoch nicht als die einzige Quelle von ROS gelten⁴⁸, wurde in unveröffentlichten Experimenten der Arbeitsgruppe Gerull die zytosolische ROS-Produktion in isolierten PKP2 KO-Kardiomyozyten mittels Dichlorodihydrofluorescein-Fluoreszenz während des beschriebenen Stressprotokolls gemessen (Ergebnisse in dieser Arbeit nicht dargestellt). PKP2 KO-Kardiomyozyten produzierten nicht mehr H_2O_2 als Kontrollen und waren gleichermaßen in der Lage extern zugefügtes H_2O_2 zu eliminieren, was gegen eine begrenzte antioxidative Kapazität spricht. Zusammengefasst war in PKP2 KO-Mäusen die mitochondriale Funktion weder in isolierten Mitochondrien noch im intakten zellulären Kontext betrachtet eingeschränkt. Das funktionelle Kontinuum zwischen EC-Kopplung und dem mitochondrialen oxidativen Stoffwechsel, sprich die kardiale mechanisch-energetische Kopplung³⁰, war in PKP2 KO Kardiomyozyten durchweg erhalten.

Es bestehen grundlegende Unterschiede bezüglich ACM-Model und Methodik von dieser Arbeit zu den oben erwähnten Studien zur mitochondrialen Funktion von ACM. Bei Betrachtung der ersten erwähnten Studie¹²⁷ ist zu beachten, dass iPSC-abgeleitete Kardiomyozyten metabolisch weniger ausgereift als erwachsene Mauskardiomyozyten sind²⁰⁰. Die metabolische Funktion der iPSC-Kardiomyozyten ist demnach, trotz gezielter Aktivierung von PPAR alpha zur Förderung ihre Abhängigkeit von Fettsäureoxidation¹²⁷, nicht mit der adulter Kardiomyozyten gleichzusetzen. Es ist auch ein veränderter Ca^{2+} -Haushalt für iPSC-CM beschrieben worden^{200,210}, was speziell bezüglich der Hypothese des Ca^{2+} -induzierten mitochondrialen Schadens Einfluss nehmen könnte. Darüber hinaus war der Nachweis für pathologische ROS eher indirekt, da die Gabe von unspezifischen Antioxidantien den Zelltod verhinderte, während die Quelle der ROS nicht aufgedeckt wurde¹²⁷. Diese Studie als auch die Studie an PKP2cKO-Mäusen¹²⁸ verwendeten einen Seahorse-Metabolic-Flux-Analysator, um die Atmung in ruhenden, intakten Kardiomyozyten zu messen, während in dieser Doktorarbeit die mitochondriale Atmung in isolierten Mitochondrien mittels des Oroboros-3k-Oxygraphen gemessen wurde. Wie bereits erläutert wurde aber auch die mitochondriale Funktion anhand des NAD(P)H/FAD⁺-Redoxstatus in intakten, arbeitenden Kardiomyozyten ermittelt und unterschied sich nicht zwischen den Genotypen. Nachdem es im Hinblick auf die

PKP2cKO-Mäuse unwahrscheinlich ist, dass die beschriebenen methodischen Unterschiede ursächlich für die abweichenden Ergebnisse sind, spielen womöglich die unterschiedlichen Tiermodelle eine Rolle¹²⁸. Zeitpunkt und Art und Weise der PKP2-Deletion in den Mausmodellen sind verschieden. Während den in dieser Arbeit verwendeten Mäusen PKP2 bereits seit der frühen Postnatalphase fehlt, fand die PKP2-Ablation in der genannten Studie erst in jugendlichen/adulten Mäusen statt. Dies könnte den PKP2 KO-Mäusen dieser Arbeit eine Anpassung an den Verlust des Proteins ermöglichen, wodurch womöglich das Genprogramm unterschiedlich reguliert wird. Weiterhin verwendete die genannte Studie das induzierbare Cre/lox System, welches eine Tamoxifen-Injektion zur Induktion der Gendeletion benötigt¹²⁸. Es ist bekannt, dass Tamoxifen kardiotoxisch wirkt. In C67BL/6J Mäusen lösten Tamoxifen-Injektionen eine dilatative Kardiomyopathie aus und führten zu einer dysregulierten Expression von Genen, welche für die Regulation des Metabolismus und der EC-Kopplung wichtig sind²¹¹. Es ist ungewiss, ob die Tamoxifen-Injektion auch den Phänotyp der PKP2cKO-Mäuse beeinflusste. Dagegen spräche, dass die toxische Dosis von Tamoxifen höher ist als die gewählte Dosis in der Studie¹²⁸ und auch die dilatative Kardiomyopathie sich außerhalb der Zeitperiode der Tamoxifen-Toxizität entwickelte^{128,211}. Eine wahrscheinlichere Erklärung für die Unterschiede zwischen den PKP2cKO- und den PKP2 KO-Mäusen dieser Doktorarbeit wird unter 5.4 erläutert.

Untersuchungen der mitochondrialen Funktion in PG-spezifischen experimentellen Modellen liegen nach meinem Kenntnisstand zum Zeitpunkt der Verfassung dieser Arbeit nicht vor. Grundsätzlich ist zu erwarten, dass Auswirkungen des konditionellen Knockouts von PG denen des PKP2-Knockouts ähneln, nachdem beide Mausmodelle auf dieselbe Weise entwickelt wurden und PKP2 und PG in Desmosomen eng zueinander assoziiert sind²¹. Dementsprechend war auch in PG KO-Kardiomyozyten die mitochondriale Funktion unbeeinflusst.

Neben den bereits erwähnten Studien zum Einfluss von PKP2 auf die mitochondriale Funktion^{127,128}, konnten in einem ACM-Modell mit homozygoten Desmoglein-2-mutierten Mäusen (*Dsg2*^{mut/mut}) Hinweise auf mitochondrial induzierte Nekrose gefunden werden. In den Herzen der *Dsg2*^{mut/mut}-Mäuse führte die Oxidation des mitochondrial gebundenen Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) zur großflächigen DNA-Fragmentierung und Nekrose. Posttranslationale Oxidation des AIF war zum Teil auf ein erschöpftes mitochondriales Thioredoxin-2-Redoxsystem, eine wichtige Komponente der zellulären antioxidativen Kapazität, zurückzuführen¹²⁹.

Die Untersuchung der PG-defizienten Mäuse dieser Arbeit zeigten dagegen keine Hinweise auf eine eingeschränkte mitochondriale Funktion oder eine ROS-Erhöhung. Isolierte Mitochondrien von PG KO-Herzen wiesen eine uneingeschränkte mitochondriale Atmung und Kopplung des O₂-Verbrauchs an die ATP-Synthese auf (Abb. 37: A, B), sodass von einer funktional uneingeschränkten ETC auszugehen ist. Weiterhin wurde eine mitochondriale ROS-Erhöhung durch die niedrigen Level der gemessenen H₂O₂-Emission ausgeschlossen (Abb. 37: D). Demgegenüber erfolgte in den *Dsg2*^{mut/mut}-Mäusen keinerlei Quantifizierung mitochondrialer oder zellulärer ROS, sondern lediglich der indirekte Hinweis mittels Nachweis von oxidiertem AIF¹²⁹. Ein eingeschränktes Thioredoxin-2-Redoxsystem könnte zwar zu erhöhten ROS führen, jedoch bildet es das antioxidative Arsenal weder in den Mitochondrien noch im Zytosol vollständig ab⁴⁸.

Gegen eine eingeschränkte antioxidative Kapazität und ROS in PG KO-Kardiomyozyten dieser Doktorarbeit sprachen zusätzlich ein stabiler Redoxstatus und $\Delta\psi_m$ unter erhöhter Arbeitslast (Abb. 32).

Man könnte spekulieren, dass der durch die diastolische Dysfunktion erhöhte Energieaufwand an den Myofilamenten den ADP-Fluss erhöht, sodass der Redoxstatus oxidiert. Insbesondere, da bei PG KO-Mäusen keine erhöhten Ca²⁺-Spiegel, welche eine Aktivierung des Citratzyklus bewirken, festzustellen war, wäre eine Dekompensation des Redoxsystems gut denkbar. Da mitochondriale H₂O₂-Entgiftungssysteme durch reduziertes NADPH in ihrer aktiven Form gehalten werden, könnte dies wiederum die H₂O₂-Entgiftung bei Belastungswechseln beeinträchtigen⁴⁸. Ergebnisse dieser Arbeit lassen jedoch auf eine intakte mechanisch-energetische Kopplung in PG KO-Herzen schließen, da der mitochondriale Redoxstatus in PG KO-Kardiomyozyten zwar zu Beginn des Messprotokolls oxidiert ist, jedoch sich während der erhöhten Arbeitslast wieder erholt, anstatt sich weiter zu verschlimmern (Abb. 32: A, B). In unveröffentlichten Experimenten der Arbeitsgruppe Gerull wurden analog wie bei PKP2 KO-Kardiomyozyten erhöhte zytosolische ROS-Spiegel in stimulierten Kardiomyozyten ausgeschlossen.

Unterschiede zwischen den *Dsg2*^{mut/mut}- und PG KO-Mausmodellen bestehen nicht nur in der Untersuchung eines anderen desmosomalen Proteins, sondern auch darin, dass das *Dsg2*-Modell nicht herzspezifisch ist¹⁵⁸. Damit kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Pathologien auf eine Störung von *Dsg2* unabhängigen Genen zurückzuführen sind. ACM-Modelle unterschiedlicher Genmutationen können nur unter Vorbehalt miteinander verglichen werden, da bereits festgestellt wurde, dass

die klinische Präsentation und Prognose stark vom desmosomalen Mutationslokus abhängt und zusätzlich große interindividuelle Heterogenität bei gleicher desmosomaler Mutation besteht⁸⁰.

5.4 Rolle der mitochondrialen Transhydrogenase

Am erstaunlichsten, waren die unterschiedlichen Ergebnisse zur mitochondrialen Funktion zwischen den PKP2 KO-Mäusen und den PKP2cKO-Mäusen von Pérez-Hernández et al. 2022, da die zwei ACM-Modelle auf den ersten Blick nicht sehr verschieden erscheinen. Neben den bereits erwähnten Unterschieden besteht ein weiterer wichtiger Unterschied darin, dass die PKP2cKO-Mäuse einen C57BL/6N-Hintergrund haben¹²⁸, während die Mäuse dieser Arbeit einen C57BL/6J-Hintergrund haben. Der J-Stamm weist im Gegensatz zum N-Stamm eine Missense-Mutation in dem Gen auf, das für die Nikotinamid Nukleotid Transhydrogenase (NNT) kodiert und zu dessen Funktionsverlust führt²¹². Die NNT katalysiert in Mitochondrien die Reaktion $\text{NADH} + \text{NADP}^+ \rightleftharpoons \text{NAD}^+ + \text{NADPH}$, wobei das Gleichgewicht der Reaktion an den Protonengradienten über der inneren mitochondrialen Membran gekoppelt ist und unter physiologischen Bedingungen zugunsten der NADPH-Regeneration verschoben ist. NADPH ist für die Regeneration antioxidativer Systeme wie die Glutathionperoxidase und das Thioredoxin-System unerlässlich²¹². Steigt jedoch unter pathologischen Belastungszuständen der ADP-Fluss an der ETC, wechselt die NNT in einen so genannten „Rückwärtsmodus“ und katalysiert vorwiegend die Regeneration von NADH, welches zur ATP-Produktion und damit Deckung des Energiebedarfs benötigt wird. Dies geschieht auf Kosten des NADPHs und damit der antioxidativen Kapazität, wodurch vermehrt H_2O_2 anfällt⁵⁰. Tatsächlich zeigten Studien, dass eine pathologische Arbeitsbelastung durch eine transversale Aortenverengung bei C57BL/6N-Mäusen zur mitochondrialen H_2O_2 -Emission führte. Dies wiederum verursachte Nekrose, eine linksventrikuläre Dysfunktion, Fibrose und eine erhöhte Mortalität bei C57BL/6N-Mäusen. Im Gegensatz dazu waren C57BL/6J-Mäuse vor mitochondrialer H_2O_2 -Emission als Reaktion auf dieselbe kardiale Arbeitslast durch den NNT-Mangel geschützt⁵⁰. In Tiermodellen der hypertrophen Kardiomyopathie führte eine erhöhte Ca^{2+} -Affinität der Myofilament infolge von Sarkomer-Mutationen zu pathologischer Arbeitsbelastung und der hierdurch begünstigte Rückwärtsmodus des NNT zu mitochondrialen ROS (unveröffentlichte Experimente der Arbeitsgruppe Maack). Zusammengenommen werfen diese Ergebnisse die Frage auf, ob die Hyperkontraktilität der PKP2 KO-Kardiomyozyten, im

Zusammenhang mit der erhöhten $[Ca^{2+}]_c$, eine pathologische Arbeitsbelastung darstellt, die mitochondriale ROS-Emissionen auslösen würde, wenn eine funktionsfähige NNT vorhanden wäre. Auch die PG KO-Mäuse basieren auf einem C57BL/6J-Hintergrund und könnten womöglich durch das Fehlen der NNT in gewissem Maße vor mitochondrialer ROS-Emission geschützt sein. Künftige Studien sollten darauf abzielen, diese Frage weiter zu klären, z.B. durch Rückkreuzung der hier verwendeten Mäuse auf den C57BL/6N-Hintergrund.

5.5 Gegenüberstellung beider Mausmodelle

Mutationen in den Genen *PKP2* und *JUP*, die für PKP2 und PG kodieren, führen zu dem kardialen Phänotyp der ACM. ACM wird mit reduzierter Penetranz und variabler Expressivität vererbt, wobei das Spektrum von lebensbedrohlichen Arrhythmien, biventrikulärer Herzinsuffizienz bis hin zu lebenslanger Symptombefreiheit reicht²¹³. Bei der dominanten ACM infolge von *PKP2*-Mutationen erreichte die höchste berichtete Penetranz 66% im Jugendalter²¹⁴, während die *JUP*-vermittelte rezessive ACM eine Penetranz von 100% bis zur Adoleszenz aufweist²¹⁵. *PKP2*- und PG-vermittelte ACM ist in Individuen ähnlich ausgeprägt, wobei für PG-defiziente Individuen ein höheres Arrhythmie Risiko beschrieben wurde. Die Gründe für die umfassenderen Defekte in der elektrischen Kopplung durch PG-Defizienz sind noch unklar²¹⁶.

Schwierige Risikostratifizierung und mangelnde Therapieoptionen zeigen die Notwendigkeit auf, molekulare Pathomechanismen aufzudecken, denen desmosomalen Mutationen zugrunde liegen, sodass personalisierte Therapien den Krankheitsverlauf modifizieren können. Ergebnisse dieser Arbeit leisten hierzu einen wichtigen Beitrag, indem Veränderungen auf zellulärer Ebene aufgedeckt werden, die im Zusammenhang mit zwei unterschiedlichen Genmutationen auftreten. Kardiomyozyten-spezifischer Verlust von PKP2 oder PG führte in Mäusen zu klassischen Charakteristika von ACM – Kardiomyozytenverlust, Fibrose, progressive Herzinsuffizienz. Obwohl in beiden Knockout-Kardiomyozyten eine diastolische Dysfunktion mit erhaltener oder sogar erhöhtem FS festgestellt wurde, konnte dies lediglich in PKP2 KO-Kardiomyozyten durch die erhöhte $[Ca^{2+}]_c$ und Ca^{2+} -Amplituden erklärt werden. Nach Ausschluss einer gesteigerten Ca^{2+} -Affinität der Myofilamente, kommen in PG KO-Kardiomyozyten Veränderungen der Myofilamente selbst als Ursache der veränderten Kontraktilität in Betracht. Wieso PKP2-Verlust Einfluss auf $[Ca^{2+}]_c$ nimmt ist noch unzureichend geklärt. Ein Mechanismus, welcher die erhöhten $[Ca^{2+}]_c$ in PKP2 KO-Kardiomyozyten erklären könnte, ist, dass das Fehlen von PKP2

zu einem Stabilitätsverlust der benachbarten Gap Junctions führt. Daraus könnte eine alternative Lokalisation der verwaisten Cx43-Hemikanäle im Perinexus folgen, welche die Membranpermeabilität für Ca^{2+} erhöhen¹²¹. Obwohl dies eine mögliche Erklärung darstellt, zeigten unveröffentlichte Untersuchungen von der Arbeitsgruppe Gerull keine Veränderungen bezüglich Expression und Lokalisation von Cx43 an den Glanzstreifen der PKP2 KO- und PG KO-Mäuse. Auch in der Dissertation von Robert Zinke hatte der induzierte Kardiomyozyten-spezifische Knockout des *PKP2*-Gens mittels Tamoxifen keinen Einfluss auf Cx43 im Herzen¹⁶¹. Ein weiteres PG-Knockout-Mausmodell, welches unbeeinflusste Cx43-Proteine beobachtete, ist das von Li, Liu, et al. 2011, bei welchem Exon 4 und 5 des *JUP*-Gens mittels der Cre/loxP-Methodik entfernt wurde¹⁵². Auch wenn eine erhöhte Cx43-vermittelte Membranpermeabilität nicht ausgeschlossen ist, macht es die unbeeinflusste Lage und Expression von Cx43 in PKP2 KO und PG KO unwahrscheinlicher. Dementsprechend kann angenommen werden, dass dem erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in dem PKP2 KO-Mausmodell dieser Arbeit andere oder weitere Mechanismen zugrunde liegen, die noch identifiziert werden müssen. Während *in vivo* in beiden Mausmodellen keine Arrhythmien beobachtet wurden, zeigten PKP2 KO- und PG KO-Kardiomyozyten vermehrt spontane elektrische Aktivitäten. Als Ursache proarrhythmogener Veränderungen in ACM sind mehrere Mechanismen denkbar, deren Zusammenspiel zu Herzrhythmusstörungen *in vivo* führen könnten. Sowohl in den PKP2 KO- als auch PG KO-Kardiomyozyten sind proarrhythmogene Ereignisse durch die bereits beschriebenen RyR2-vermittelten Ca^{2+} -Sparks möglich^{121,202}. Aber auch Veränderungen anderer Ionenströme (z.B. des Nav1.5) wurden im Zusammenhang ACM-bedingter Arrhythmien diskutiert⁹⁵. Die Hypothese, dass ROS maßgeblich zum proarrhythmogenen ACM-Phänotyp beiträgt⁵⁷, konnte in PKP2 KO und PG KO Mausmodellen nicht bestätigt werden, wobei ein Beitrag zu Arrhythmogenität in anderen Modellen nicht ausgeschlossen werden kann. Sowohl PKP2 KO- als auch PG KO-Mäuse zeigten weder in mitochondrialen noch in zellulären Experimenten Hinweise auf eine eingeschränkte mitochondriale Funktion.

5.6 Limitationen

Die mitochondrialen Experimente erfolgten mittels Respirimetrie und Detektion von Immunfloreszenz Farbstoffen in isolierten Mitochondrien. Eine bereits diskutierte Limitation ist, dass die dynamische Beeinflussung der mitochondrialen Funktion durch Ca^{2+} und ADP in Mitochondrien, wenn sie aus ihrem zellulären Kontext gerissen werden, nur eingeschränkt zu beurteilen sind. Weiterhin wurden für die Isolierung der

Mitochondrien beide Ventrikel des Herzens verwendet. Eine gesonderte Betrachtung der Ventrikel wäre sinnvoll, da frühere Studien auf Unterschiede im mitochondrialen Stoffwechsel zwischen dem linken und rechten Ventrikel des Herzens hingewiesen haben²¹⁷ und ACM überwiegend den rechten Ventrikel betrifft²¹³. Weiterhin ist bei einem durch Fibrose und Inflammation charakterisierten Krankheitsbild nicht auszuschließen, dass die Mitochondrien nicht nur aus Kardiomyozyten, sondern auch aus Fibrozyten oder Entzündungszellen stammten. Tatsächlich nehmen Mitochondrien 1/3 des Volumens der Kardiomyozyten ein²¹⁸ und durch den unterschiedlichen Energiebedarf ist es logisch, dass Kardiomyozyten weitaus mehr Mitochondrien enthalten als Fibrozyten oder Entzündungszellen²¹⁹, sodass der Anteil der Kardiomyozyten fremden Mitochondrien trotz fibrotisch durchsetzter Herzen gering sein sollte.

Die zellulären Experimente wurden an einzelnen, isolierten Kardiomyozyten ohne Kontakt zu benachbarten Zellen durchgeführt. Insbesondere bei einer Erkrankung wie ACM, bei der der mechanische und elektrische Kontakt zwischen Zellen von der Integrität der Desmosomen abhängt, wäre zumindest ein zweidimensionales Modell, beispielsweise von Zellmonolayern, interessant. Auch kardiovaskuläre Einflüsse auf die Kardiomyozyten können so nicht miteinbezogen werden. Es ergaben sich Hinweise auf proarrhythmogene Veränderungen auf Einzelzell-Ebene. Für die Entstehung kardialer Arrhythmien bildet die gesteigerte spontane elektrische Aktivität von Kardiomyozyten zwar einen Trigger²²⁰, ob dies ausreicht, um kardiale Arrhythmien im dreidimensionalen Zellverband auszulösen ist schwer zu beurteilen. Zur Isolation der Kardiomyozyten wurde das gesamte Herz der jeweiligen Mauslinie verwendet, sodass keine Zuordnung der einzelnen Kardiomyozyten zu Subkompartimenten wie beispielsweise dem rechten Ventrikel möglich war. Obwohl Ventrikel ca. 85% des murinen Herzgewichts ausmachen²²¹ und Kardiomyozyten vom ventrikulären Typ damit die deutliche Mehrheit der Kardiomyozyten darstellen, ist bei transgenen Herzen, deren Muskelmasse verringert ist, eine Verzerrung der Ergebnisse durch atriale Kardiomyozyten nicht vollständig ausgeschlossen. Vor allem da Studien veränderte Ca^{2+} -Dynamiken für rechts- und linksventrikuläre Kardiomyozyten zeigen konnten¹²¹, wäre eine getrennte Betrachtung in zukünftigen Studien wünschenswert. Eine weitere Möglichkeit ist, dass sowohl Kardiomyozyten als auch Mitochondrien, die bereits vorgeschädigt waren, den Prozess der Isolation nicht überlebten und somit nicht in Messungen miteinbezogen werden konnten.

Sportliche Betätigung als negativer Krankheitsmodifikator der ACM konnte sowohl in Tiermodellen als auch in klinischen Studien nachgewiesen werden²¹³. Ergebnisse dieser Arbeit bilden durch das Stressprotokoll lediglich die Auswirkungen einer akuten Belastung der Kardiomyozyten ab. Um den Einfluss umfangreicherer und intensiverer körperlicher Belastung zu untersuchen, wäre eine chronische β -adrenerge-Belastung nötig.

Obwohl die Beobachtungen in dieser Doktorarbeit mit denen von menschlicher ACM weitgehend übereinstimmen, muss jede Extrapolation mit Vorsicht genossen werden, da es klar ist, dass Tiermodelle nicht die Bedingungen eines Patienten mit der Krankheit reproduzieren. Dies gilt in der Tat für alle Tier- oder Zellmodelle der ACM, die veröffentlicht wurden, und ist eine offensichtliche Folge der Einschränkungen, die mit der Untersuchung einer menschlichen Krankheit verbunden sind. Um dennoch den menschlichen Bedingungen näher zu kommen und die embryonale Letalität bei globalem Knockout zu umgehen, wurde in dieser Doktorarbeit ein perinataler Verlust der krankheitsverursachenden Proteine PKP2 und PG methodisch umgesetzt. Dadurch soll ein analog zum Menschen möglicher Anpassungsmechanismus im Laufe des Lebens simuliert werden. Vor allem in den PKP2 KO-Mäusen konnte eine erhebliche Variabilität des Phänotyps festgestellt werden, die gegebenenfalls auf eine unterschiedliche Effizienz der Cre-vermittelten homologen Rekombination zurückzuführen ist. Wie unter 1.5.1 beschrieben, spiegelt diese heterogene Ausprägung der Erkrankung tatsächlich die realen Gegebenheiten der ACM im Menschen wider, bei der dieselbe Mutation innerhalb einer Familie sehr variable Verläufe nehmen kann²¹³. Ob die hier beschriebenen molekularen Schritte in menschlichen Herzen mit *PKP2* oder *JUP*-Mutation auftreten, bleibt unbestimmt. Insbesondere die Ca^{2+} -abhängige metabolische Anpassung des mitochondrialen oxidativen Stoffwechsels wurde bisher hauptsächlich in Mäusen charakterisiert, jedoch könnte die physiologische Rolle dieser Anpassung beim Menschen einen größeren Stellenwert einnehmen aufgrund der größeren kontraktilen Reserve des menschlichen Herzens. Die Ruhfrequenz muriner Herzen beträgt 500-600 Schläge pro Minute, wobei sie bei körperlicher Anstrengung auf 700-800 Schläge pro Minute ansteigen kann. Das Herz junger gesunder Menschen dagegen kann seine Frequenz von 60-80 Schlägen pro Minute in Ruhe auf 170-190 Schläge pro Minute bei körperlicher Anstrengung steigern. Ähnliche Verhältnisse liegen bei Vergleich der Kraft-Frequenz-Beziehung vor. Während in Mäusen die kontraktile Kraft (gemessen durch Messungen der isometrischen Kraftentwicklung in den Herztrabekeln ex vivo) bei einem

Frequenzanstieg um 240 Schläge pro Minute nur geringfügig zunimmt, entwickeln menschliche Herztrabekel 81-168% mehr Kraft bei der Hälfte des Frequenzanstiegs²²². Diese erhöhte kardiale Arbeitsbelastung bedingt folglich einen wesentlich größeren Anstieg des ATP-Bedarfs in Menschen als in Mäusen.

Darüber hinaus könnten Unterschiede in der EC-Kopplung zwischen Mäusen und Menschen Auswirkungen auf die mechanisch-energetische Kopplung haben. Mitochondriales Ca^{2+} wird primär über den mitochondrialen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX_m) ausgeschleust, dessen Hauptantriebskraft der Na^+ -Gradient über der IMM ist. Da die zytosolische Na^+ -Konzentrationen ($[\text{Na}^+]_c$) in Mäusen mit 9-14 mmol/L weit höher als im Menschen (4-8 mmol/L) liegt^{31,223,224}, könnte die verstärkte NCX_m -Aktivität einen schnelleren mitochondrialen Ca^{2+} -Efflux bei Mäusen als bei Menschen bewirken, wodurch eine mitochondriale Ca^{2+} -Überladung verhindert werden könnte.

6 Schlussfolgerung

ACM ist eine familiäre Herzmuskelerkrankung, die pathologisch durch den Verlust von Kardiomyozyten und einem fibrotisch-fettigen Ersatz des Myokards gekennzeichnet ist. Klinisch führt ACM zu Herzinsuffizienz und vor allem bei jungen Patienten und Sportlern zu ventrikulären Arrhythmien bis hin zum plötzlichen Herztod. Dabei treten insbesondere Herzrhythmusstörungen häufig bereits vor Veränderungen des Herzgewebes auf. Die äußerst variable Prognose spiegelt das breite Spektrum der klinischen Erscheinungsformen von ACM und das Vorhandensein von Untergruppen mit unterschiedlicher Penetranz und Arrhythmie-Risiko wider. ACM ist eine Kardiomyopathie der Zell-Zell-Verbindungen, die typischerweise durch genetisch bedingte Mutationen der kardialen Desmosomen verursacht wird.

In dieser Doktorarbeit wurde die Rolle der desmosomalen Proteine PKP2 und PG in knockout Mausmodellen untersucht. Der Fokus lag hierbei auf der Charakterisierung der kardialen mitochondrialen Biologie von ACM im Zusammenhang mit der damit eng verknüpften EC-Kopplung. PKP2 KO-Mäuse wurden im Alter von vier, acht und zwölf Wochen untersucht, wodurch repräsentativ frühe, mittlere und späte Krankheitsstadien abgebildet wurden. Untersuchungen an PG KO-Mäusen erfolgten im Alter von sechs Wochen in einem mittleren Krankheitsstadium. Beide Mauslinien entwickelten phänotypisch einen klassischen Verlauf von ACM – frühen Verlust von Kardiomyozyten, fibrotischer Ersatz von Herzmuskelgewebe sowie systolische Dysfunktion *in vivo*. Im Gegensatz zu der *in vivo* beobachteten systolischen kardialen Dysfunktion, entwickelten isolierte Kardiomyozyten beider Mausmodelle vorwiegend eine diastolische Dysfunktion. Wohingegen die systolische Funktion von PG KO- und PKP2 KO-Kardiomyozyten erhalten oder sogar gesteigerter war, wahrscheinlich in dem Bemühen, die durch die Unterbrechung der Desmosomen verursachten Mängel in der interzellulären Adhäsion auszugleichen. In Übereinstimmung mit früheren Studien, die ein induzierbares PKP2cKO-Mausmodell verwendeten^{123,144}, war die systolische und diastolische $[Ca^{2+}]_c$ sowie die Amplitude der $[Ca^{2+}]_c$ -Transienten in PKP2 KO erhöht und stellen die wahrscheinlichste Ursache der veränderten Kontraktilität einzelner PKP2 KO-Kardiomyozyten dar. Demgegenüber beeinflusste der Verlust von PG den Ca^{2+} -Haushalt nicht. Nach Ausschluss einer erhöhten Ca^{2+} -Affinität der Myofilamente, stellen direkte Veränderungen der Myofilamente in PG KO-Kardiomyozyten eine wahrscheinliche Ursache der diastolischen Dysfunktion dar. Trotz

der daraus resultierenden erhöhten Arbeitslast einzelner Kardiomyozyten konnten PKP2 KO- und PG KO-Kardiomyozyten für den erhöhten Energiebedarf ausreichend ATP bereitstellen, im Sinne einer intakten mechanisch-energetischen Kopplung. Daraus resultierte weder für PKP2 KO noch für PG KO eine mitochondriale Dysfunktion oder übermäßige ROS-Emission. Weiterhin konnten in beiden transgenen Zelllinien eine erhöhte Neigung zu zellulären Arrhythmien beobachtet werden. Nachdem lange die Hypothese bestand, dass Herzrhythmusstörungen eine Folge von Reentry-Mechanismen um anatomische Hindernisse herum sind, die auf den lückenhaften Verlust von Kardiomyozyten und die Infiltration von Fibrose zurückzuführen sind, konnten weitere Mechanismen gefunden werden, die Hinweise auf die erhöhte Arrhythmogenität in der Frühphase der Krankheit vor struktureller Schädigung geben. Als Ursache einer gesteigerten spontanen elektrischen Aktivität von Kardiomyozyten wird vor allem eine veränderte Ca^{2+} -Kinetik und intrazelluläre Ca^{2+} -Überladung genannt⁹⁵. Insbesondere die Ergebnisse der PG KO-Kardiomyozyten zeigen, dass auch in Abwesenheit dieser Ca^{2+} -Veränderungen als auch in Abwesenheit von ROS zelluläre Arrhythmien ausgelöst werden können und somit weitere proarrhythmogene Veränderungen eine Rolle spielen müssen.

Zusammenfassend zeigen Daten dieser Arbeit eine funktionelle Überschneidung des Verlustes der interzellulären Adhäsion an Glanzstreifen mit der EC-Kopplung, obwohl es sich um strukturell getrennte Funktionen im Kardiomyozytenraum handelt. Im Gegensatz zu einem anderen ACM-Modell mit *PKP2*-Mangel konnte in dieser Doktorarbeit keine mitochondriale Dysfunktion und ROS nachgewiesen werden¹²⁸. Dies könnte mit Unterschieden des genetischen Hintergrundes und möglicherweise einer unterschiedlichen NNT-Expression zusammenhängen. In den Mausmodellen dieser Doktorarbeit ist eine mitochondriale Dysfunktion als treibender Faktor der ACM-Progression eher unwahrscheinlich. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass erhöhte mitochondriale ROS in anderen ACM-Modellen mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen zur Krankheitsentwicklung beitragen. Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Notwendigkeit in folgenden Studien modellspezifische Unterschiede in ACM-Phänotypen zu klären. Weiterführende Untersuchungen der Myofilamente könnten klären, ob und inwieweit Veränderungen der Myofilamente an der diastolischen Dysfunktion in beiden Mausmodellen beteiligt sind. In diesem Zusammenhang steht auch noch die Frage offen, wie zunächst die erhöhten Ca^{2+} -Spiegel durch Verlust von PKP2 zustande kommen und wodurch sich die diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_c$ im Verlauf der ACM wieder normalisieren. Mechanismen, welche der zellulären

Arrhythmieneigung zugrunde liegen, sollten weiter entschlüsselt werden. Die Entwicklung einer ACM in Abwesenheit einer mitochondrialen Dysfunktion sowie ohne erhöhte ROS sollte in anderen ACM-Modellen bestätigt werden.

7 Danksagung

Ich möchte mich bei all denjenigen, die mich während meiner Arbeit an der vorliegenden Dissertation unterstützt haben, ganz herzlich bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Brenda Gerull für die Vergabe des Themas meiner Doktorarbeit, die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, sowie die Betreuung und engagierte Förderung. Auch Prof. Dr. Christoph Maack gilt ein großer Dank meinerseits. So durfte ich sowohl den Großteil meiner Experimente in seinem Forschungslabor durchführen als auch seine aufmerksame, wissenschaftliche Unterstützung genießen. Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Kristina Lorenz und Prof. Dr. Kai Schuh für die Betreuung und Begutachtung meiner Doktorarbeit.

Bei Dr. Tatjana Williams möchte ich für die Projektleitung, ihre enge Betreuung, Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und Hilfe zur Realisierung dieser Arbeit bedanken. Dr. Michael Kohlhaas und Dr. Alexander Nickel möchte ich herzlich für ihre geduldige Einarbeitung, ihre stets hilfsbereite Betreuung und ihre fundierten wissenschaftlichen und auch zwischenmenschlichen Ratschläge bedanken – ohne die ich sicherlich an manch einer Fragestellung oder Versuchsdurchführung verzweifelt wäre. Vielen Dank an Dr. Alexander Nickel und Anja Sauer für die Durchführung der mitochondrialen Messungen. Dr. Tatjana Williams, Dr. Michael Kohlhaas und Dr. Alexander Nickel gilt auch ein besonderer Dank für die Korrektur meiner Arbeit.

Ein großes Dankeschön geht an alle meine Kollegen und Kolleginnen im Labor; für ihre hervorragende Anleitung, gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima: Anne Kilinc, Anja Sauer, Michelle Gulentz, Annette Berbner, Dr. Anna Janz, Dr. Ruping Chen, Susanna Schraut, Alexandra Cirnu, Miriam Zink und Anne Seewald. Insbesondere bei Anna-Florentine Schiuma möchte ich mich für die Durchführung der letzten IonOptix-Versuche bedanken.

Schließlich möchte ich an dieser Stelle meiner Familie und meinen Freunden für ihren Rückhalt und ihre liebevolle Unterstützung danken. Ohne sie wäre diese Promotion niemals möglich gewesen. Mein tiefster Dank gilt Dr. Florian Rumpf. Er hat mich von Beginn an bis zum Abschluss meiner Dissertation in allem unterstützt, gefördert und stand mir dabei immer zur Seite.

I Abbildungsverzeichnis

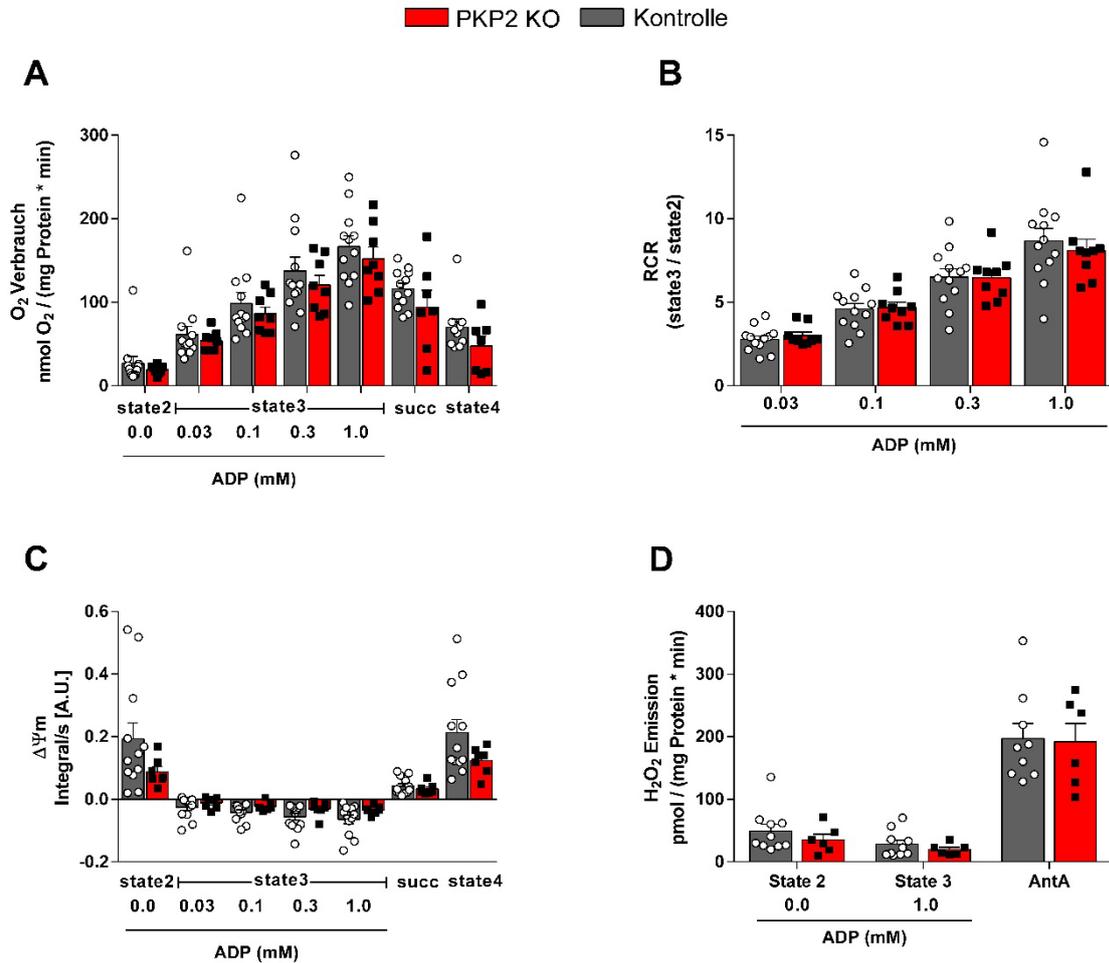
Abb. 1: Die Bestandteile der Glanzstreifen.....	3
Abb. 2: Elektromechanische Kopplung in Kardiomyozyten	7
Abb. 3: Der Citratzyklus.....	9
Abb. 4: Die mitochondriale Elektronentransportkette.....	11
Abb. 5: Mitochondriale ROS-Produktion und -Elimination	13
Abb. 6: Histologische Merkmale der ACM.....	16
Abb. 7: Krankheitsentwicklung ACM.....	18
Abb. 8: Darstellung der mit ACM-assoziierten Gene	20
Abb. 9: Schematischer Aufbau von Plakoglobin und Plakophilin 2.....	24
Abb. 10: Kreuzung konditioneller, herzspezifischer Knockout-Mäuse	40
Abb. 11: Aufbau der Langendorff-Perfusionsanlage zur Kardiomyozytenisolation ...	45
Abb. 12: Beispielbild eines isolierten Kardiomyozyten.....	47
Abb. 13: Aufbau des IonOptix-Systems.....	49
Abb. 14: Aufbau des Perfusionssystems und Auflichtmikroskops	51
Abb. 15: Stressprotokoll.....	52
Abb. 16: Kalibrierung von NAD(P)H/FAD ⁺	54
Abb. 17: Sarkomerverkürzung rhythmischer und arrhythmischer Kardiomyozyten	57
Abb. 18: Aufbau des Oroboros-2k-Oxygraphen.....	60
Abb. 19: Exemplarische Messung der mitochondrialen Atmung und $\Delta\Psi_m$	62
Abb. 20: <i>PKP2</i> bzw. <i>JUP</i> Expression in KO und Kontrollen im Alter von acht bzw. sechs Wochen	65
Abb. 21: Kontraktilität bei vier Wochen alten <i>PKP2</i> KO Kardiomyozyten	67
Abb. 22: Kontraktilität bei acht Wochen alten <i>PKP2</i> KO Kardiomyozyten	68
Abb. 23: Kontraktilität bei zwölf Wochen alten <i>PKP2</i> KO Kardiomyozyten.....	69
Abb. 24: Kontraktilität bei sechs Wochen alten <i>PG</i> KO Kardiomyozyten.....	71
Abb. 25: $[Ca^{2+}]_c$ bei vier Wochen alten <i>PKP2</i> KO Kardiomyozyten	73
Abb. 26: $[Ca^{2+}]_c$ bei acht Wochen alten <i>PKP2</i> KO Kardiomyozyten	74
Abb. 27: $[Ca^{2+}]_c$ bei zwölf Wochen alten <i>PKP2</i> KO Kardiomyozyten.....	75
Abb. 28: $[Ca^{2+}]_c$ bei sechs Wochen alten <i>PG</i> KO Kardiomyozyten.....	77
Abb. 29: Redoxstatus und $\Delta\Psi_m$ bei vier Wochen alten <i>PKP2</i> KO Kardiomyozyten	79

Abb. 30: Redoxstatus und $\Delta\Psi_m$ bei acht Wochen alten PKP2 KO Kardiomyozyten	80
Abb. 31: Redoxstatus und $\Delta\Psi_m$ bei zwölf Wochen alten PKP2 KO Kardiomyozyten	81
Abb. 32: Redoxstatus und $\Delta\Psi_m$ bei sechs Wochen alten PG KO Kardiomyozyten	83
Abb. 33: Arrhythmie-Neigung bei PKP2 KO Kardiomyozyten.....	84
Abb. 34: Arrhythmie-Neigung bei PG KO Kardiomyozyten.....	85
Abb. 35: Respirometrie und $\Delta\Psi_m$ bei acht Wochen alten PKP2 KO Mitochondrien mit Fettsäuren als Substrat	87
Abb. 36: Respirometrie und $\Delta\Psi_m$ bei zwölf Wochen alten PKP2 KO Mitochondrien mit Fettsäuren als Substrat.....	88
Abb. 37: Respirometrie und $\Delta\Psi_m$ bei sechs Wochen alten PG KO Mitochondrien mit Fettsäuren als Substrat	89

II Tabellenverzeichnis

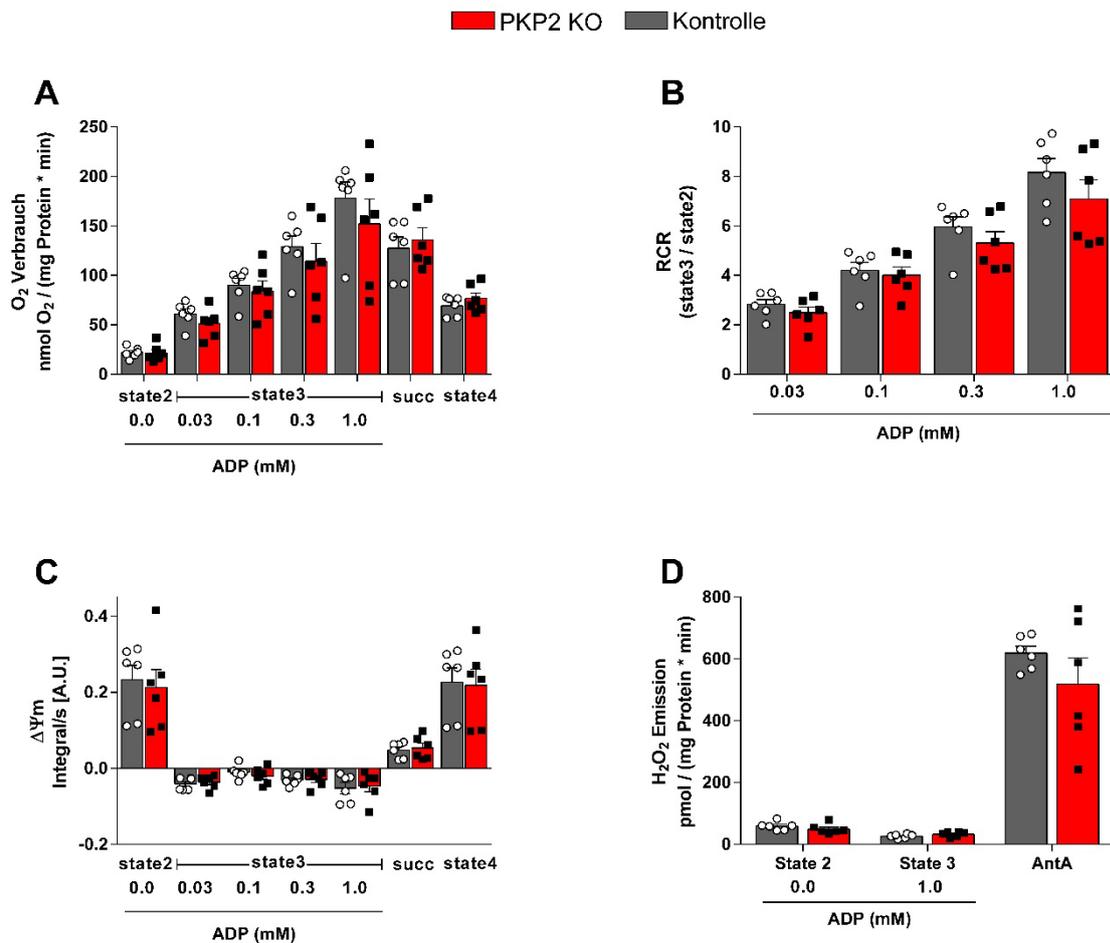
Tabelle 1: Material für die RNA-Analysen.....	33
Tabelle 2: Verwendete Primer für die quantitative real-time PCR.....	33
Tabelle 3: Geräte und sonstiges Verbrauchsmaterial für die RNA-Analysen	34
Tabelle 4: Direkt an den Versuchstieren angewandte Substanzen	34
Tabelle 5: Präparations- und Isolationsinstrumentarium der Kardiomyozytenisolation	34
Tabelle 6: Lösungen und Substanzen zur Kardiomyozytenisolation.....	35
Tabelle 7: Zusammensetzung der Normaltyrode (NT).....	35
Tabelle 8: Substanzen zur Kalibrierung, Stresssimulation, Färbung und Ausplattierung der Kardiomyozyten	36
Tabelle 9: Geräte der IonOptix-Anlage	36
Tabelle 10: Isolations- und MSS-Lösung für die Mitochondrienisolation	36
Tabelle 11: Ansatz für BSA/Proteinase-Lösung.....	37
Tabelle 12: Zusammensetzung des Atmungspuffers.....	37
Tabelle 13: Substanzen für die Atmungsmessung	37
Tabelle 14: Reagenzien zur Proteinbestimmung und zur Messung des mitochondrialen Membranpotentials	37
Tabelle 15: Sonstige Laborgeräte und Verbrauchsmaterial.....	38
Tabelle 16: Ansatz für DNA-Verdau der RNA-Mixtur (10 µl Gesamt).....	42
Tabelle 17: Ansatz für die RT der RNA in cDNA	43
Tabelle 18: Thermocycler Konditionen	43
Tabelle 19: Ansatz pro Probe der SybrGreen RT-qPCR	44
Tabelle 20: Programm für RT-qPCR	44
Tabelle 21: Autofluoreszenz zur NAD(P)H- und FAD ⁺ -Bestimmung.....	53
Tabelle 22: Filter- und Spiegeleinstellungen zur NAD(P)H- und FAD ⁺ - Bestimmung	53
Tabelle 23: Fluoreszenzfarbstoffe zur Messung von [Ca ²⁺] _c und ΔΨ _m	55
Tabelle 24: Filter- und Spiegeleinstellungen zur Messung von [Ca ²⁺] _c und ΔΨ _m	56
Tabelle 25: Pipettierschema zur Mitochondrien-Proteinbestimmung.....	58
Tabelle 26: Definition der verwendeten Atmungsstates.....	62

III Anhang



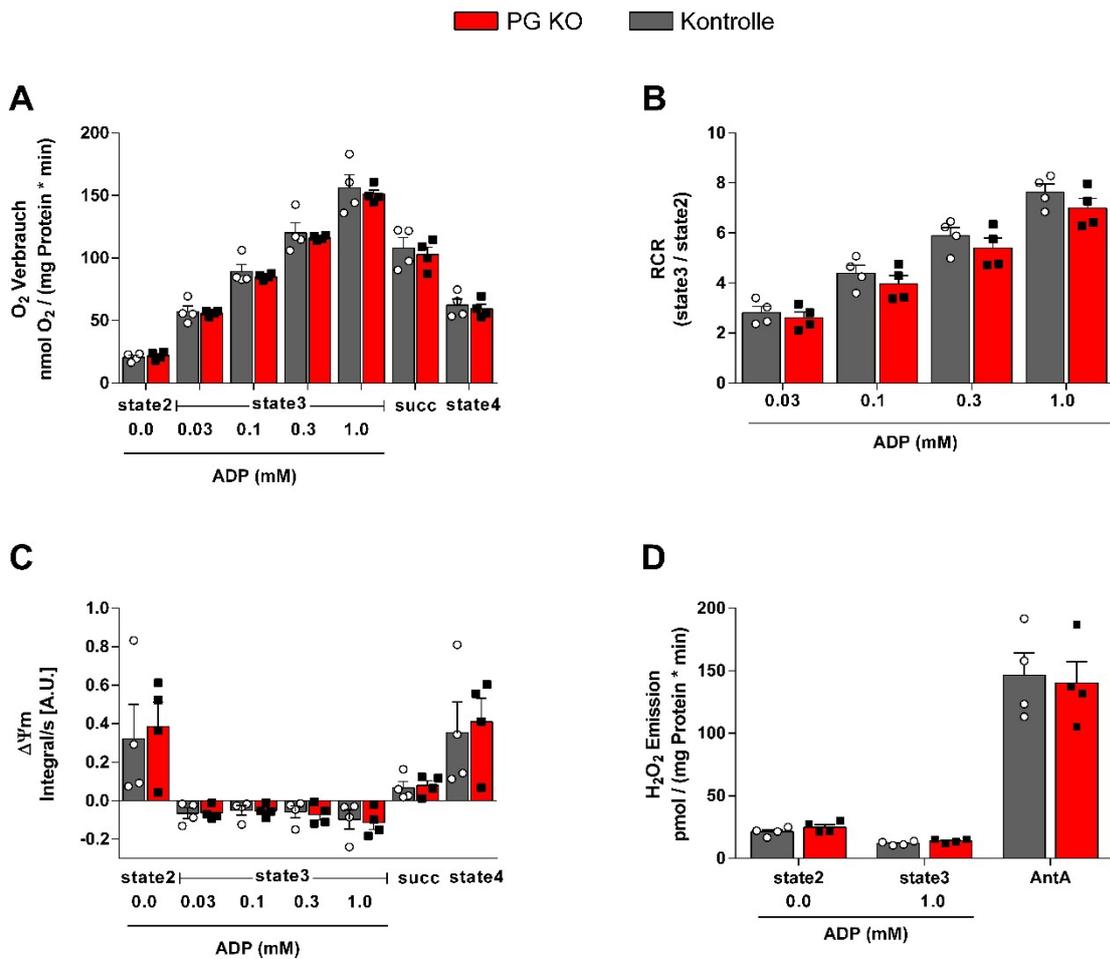
Anhang 1: Respirometrie und $\Delta\Psi_m$ bei acht Wochen alten PKP2 KO Mitochondrien mit Kohlenhydraten als Substrat

Sauerstoffverbrauch (A) und $\Delta\Psi_m$ (C) in isolierten Herzmitochondrien von acht Wochen alten PKP2 KO mit Pyruvat/Malat (P/M) als Substraten, jeweils in Abwesenheit von ADP (state 2), bei Zugabe steigender ADP-Konzentrationen (state 3), nach Zugabe von Succinat (succ) und nach Oligomycin-Behandlung (state 4). (B) Das Respiratory Control Ratio (RCR) entspricht dem Verhältnis von state 3 zu state 2. (D) Mitochondriale H₂O₂-Emission unter den Bedingungen von state 2 und 3 sowie nach Zugabe von Antimycin A (AntA). Es wurden für Kontrollen n=10-12, für PKP2 KO n=6-9 Mäuseherzen verwendet. Darstellung als Mittelwerte \pm SEM und Signifikanztest mittels two-way ANOVA und einem Bonferroni-Post-hoc-Test für Mehrfachvergleiche.



Anhang 2: Respirometrie und $\Delta\Psi_m$ bei zwölf Wochen alten PKP2 KO Mitochondrien mit Kohlenhydraten als Substrat

Sauerstoffverbrauch (A) und $\Delta\Psi_m$ (C) in isolierten Herzmitochondrien von zwölf Wochen alten PKP2 KO mit Pyruvat/Malat (P/M) als Substraten, jeweils in Abwesenheit von ADP (state 2), bei Zugabe steigender ADP-Konzentrationen (state 3), nach Zugabe von Succinat (succ) und nach Oligomycin-Behandlung (state 4). (B) Das Respiratory Control Ratio (RCR) entspricht dem Verhältnis von state 3 zu state 2. (D) Mitochondriale H_2O_2 -Emission unter den Bedingungen von state 2 und 3 sowie nach Zugabe von Antimycin A (AntA). Es wurden für Control $n=6$, für PKP2 KO $n=6$ Mäuseherzen verwendet. Darstellung als Mittelwerte \pm SEM und Signifikanztest mittels two-way ANOVA und einem Bonferroni-Post-hoc-Test für Mehrfachvergleiche.



Anhang 3: Respirometrie und $\Delta\Psi_m$ bei sechs Wochen alten PG KO Mitochondrien mit Kohlenhydraten als Substrat

Sauerstoffverbrauch (A) und $\Delta\Psi_m$ (C) in isolierten Herzmitochondrien von sechs Wochen alten PG KO mit Pyruvat/Malat (P/M) als Substraten, jeweils in Abwesenheit von ADP (state 2), bei Zugabe steigender ADP-Konzentrationen (state 3), nach Zugabe von Succinat (succ) und nach Oligomycin-Behandlung (state 4). (B) Das Respiratory Control Ratio (RCR) entspricht dem Verhältnis von state 3 zu state 2. (D) Mitochondriale H₂O₂-Emission unter den Bedingungen von state 2 und 3 sowie nach Zugabe von Antimycin A (AntA). Es wurden für Control n=4, für PG KO n=4 Mäuseherzen verwendet. Darstellung als Mittelwerte \pm SEM und Signifikanztest mittels two-way ANOVA und einem Bonferroni-Post-hoc-Test für Mehrfachvergleiche.

IV Bibliographie

1. Larsen, R. and R. Larsen, *Physiologie des Herzens und des Kreislaufs. Anästhesie und Intensivmedizin für die Fachpflege*, 2012: p. 778-794.
2. Katz, A.M., *Physiology of the Heart*. 2010: Lippincott Williams & Wilkins.
3. van der Voorn, S.M., A. Te Riele, C. Basso, H. Calkins, C.A. Remme, and T.A.B. van Veen, *Arrhythmogenic cardiomyopathy: pathogenesis, pro-arrhythmic remodelling, and novel approaches for risk stratification and therapy*. *Cardiovasc Res*, 2020. **116**(9): p. 1571-1584.
4. Noorman, M., M.A. van der Heyden, T.A. van Veen, M.G. Cox, R.N. Hauer, J.M. de Bakker, and H.V. van Rijen, *Cardiac cell-cell junctions in health and disease: Electrical versus mechanical coupling*. *J Mol Cell Cardiol*, 2009. **47**(1): p. 23-31.
5. Vermij, S.H., H. Abriel, and T.A. van Veen, *Refining the molecular organization of the cardiac intercalated disc*. *Cardiovasc Res*, 2017. **113**(3): p. 259-275.
6. Delva, E., D.K. Tucker, and A.P. Kowalczyk, *The desmosome*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009. **1**(2): p. a002543.
7. Cohen, S.A., *Immunocytochemical localization of rH1 sodium channel in adult rat heart atria and ventricle. Presence in terminal intercalated disks*. *Circulation*, 1996. **94**(12): p. 3083-6.
8. Melnyk, P., L. Zhang, A. Shrier, and S. Nattel, *Differential distribution of Kir2.1 and Kir2.3 subunits in canine atrium and ventricle*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. **283**(3): p. H1123-33.
9. Leo-Macias, A., E. Agullo-Pascual, J.L. Sanchez-Alonso, S. Keegan, X. Lin, T. Arcos, . . . M. Delmar, *Nanoscale visualization of functional adhesion/excitability nodes at the intercalated disc*. *Nature Communications*, 2016. **7**(1): p. 10342.
10. Cunha, S.R. and P.J. Mohler, *Cardiac ankyrins: Essential components for development and maintenance of excitable membrane domains in heart*. *Cardiovasc Res*, 2006. **71**(1): p. 22-9.
11. Moncayo-Arlandi, J. and R. Brugada, *Unmasking the molecular link between arrhythmogenic cardiomyopathy and Brugada syndrome*. *Nat Rev Cardiol*, 2017. **14**(12): p. 744-756.
12. Sheikh, F., R.S. Ross, and J. Chen, *Cell-cell connection to cardiac disease*. *Trends Cardiovasc Med*, 2009. **19**(6): p. 182-90.
13. Meşe, G., G. Richard, and T.W. White, *Gap Junctions: Basic Structure and Function*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2007. **127**(11): p. 2516-2524.
14. Nielsen, M.S., L.N. Axelsen, P.L. Sorgen, V. Verma, M. Delmar, and N.H. Holstein-Rathlou, *Gap junctions*. *Compr Physiol*, 2012. **2**(3): p. 1981-2035.
15. Rhett, J.M. and R.G. Gourdie, *The perinexus: a new feature of Cx43 gap junction organization*. *Heart Rhythm*, 2012. **9**(4): p. 619-23.
16. Agullo-Pascual, E., X. Lin, A. Leo-Macias, M. Zhang, F.X. Liang, Z. Li, . . . M. Delmar, *Super-resolution imaging reveals that loss of the C-terminus of connexin43 limits microtubule plus-end capture and NaV1.5 localization at the intercalated disc*. *Cardiovasc Res*, 2014. **104**(2): p. 371-81.
17. Severs, N.J., A.F. Bruce, E. Dupont, and S. Rothery, *Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium*. *Cardiovascular Research*, 2008. **80**(1): p. 9-19.
18. Severs, N.J., S.R. Coppen, E. Dupont, H.I. Yeh, Y.S. Ko, and T. Matsushita, *Gap junction alterations in human cardiac disease*. *Cardiovasc Res*, 2004. **62**(2): p. 368-77.
19. Severs, N.J., *Gap junction remodeling in heart failure*. *J Card Fail*, 2002. **8**(6 Suppl): p. S293-9.

20. Ganz, A., M. Lambert, A. Saez, P. Silberzan, A. Buguin, R.M. Mège, and B. Ladoux, *Traction forces exerted through N-cadherin contacts*. Biol Cell, 2006. **98**(12): p. 721-30.
21. Garrod, D. and M. Chidgey, *Desmosome structure, composition and function*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2008. **1778**(3): p. 572-587.
22. Spindler, V., R. Eming, E. Schmidt, M. Amagai, S. Grando, M.F. Jonkman, . . . J. Waschke, *Mechanisms Causing Loss of Keratinocyte Cohesion in Pemphigus*. Journal of Investigative Dermatology, 2018. **138**(1): p. 32-37.
23. Pieperhoff, S. and W.W. Franke, *The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates - IV: coalescence and amalgamation of desmosomal and adhaerens junction components - late processes in mammalian heart development*. Eur J Cell Biol, 2007. **86**(7): p. 377-91.
24. Bernstein, S.A. and G.E. Morley, *Gap junctions and propagation of the cardiac action potential*. Adv Cardiol, 2006. **42**: p. 71-85.
25. Levine, H.J., *Rest heart rate and life expectancy*. J Am Coll Cardiol, 1997. **30**(4): p. 1104-6.
26. Bers, D.M., *Cardiac excitation–contraction coupling*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 198-205.
27. Eisner, D.A., J.L. Caldwell, K. Kistamás, and A.W. Trafford, *Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart*. Circulation Research, 2017. **121**(2): p. 181-195.
28. Kohlhaas, M. and C. Maack, *Calcium release microdomains and mitochondria*. Cardiovascular research, 2013. **98**(2): p. 259-268.
29. Bers, D.M., *Sarcoplasmic reticulum Ca release in intact ventricular myocytes*. Front Biosci, 2002. **7**: p. d1697-711.
30. Bertero, E. and C. Maack, *Calcium Signaling and Reactive Oxygen Species in Mitochondria*. Circulation Research, 2018. **122**(10): p. 1460-1478.
31. Bertero, E., *Mechano-energetic uncoupling in Barth syndrome cardiomyopathy Mechano-energetische Entkopplung bei der Barth Syndrom Kardiomyopathie*. 2022.
32. Brown, D.A., J.B. Perry, M.E. Allen, H.N. Sabbah, B.L. Stauffer, S.R. Shaikh, . . . M. Gheorghiade, *Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure*. Nature Reviews Cardiology, 2017. **14**(4): p. 238-250.
33. Doenst, T., T.D. Nguyen, and E.D. Abel, *Cardiac Metabolism in Heart Failure: implications beyond ATP production*. Circulation Research, 2013. **113**(6): p. 709-724.
34. Yang, K.C., M.G. Bonini, and S.C. Dudley, Jr., *Mitochondria and arrhythmias*. Free Radic Biol Med, 2014. **71**: p. 351-361.
35. Griffiths, E.J., *Mitochondria and heart disease*. Adv Exp Med Biol, 2012. **942**: p. 249-67.
36. Dayer, M. and M.R. Cowie, *Heart failure: diagnosis and healthcare burden*. Clin Med (Lond), 2004. **4**(1): p. 13-8.
37. Harris, D.A. and A.M. Das, *Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart*. Biochem J, 1991. **280** (Pt 3)(Pt 3): p. 561-73.
38. Stanley, W.C., F.A. Recchia, and G.D. Lopaschuk, *Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart*. Physiological reviews, 2005. **85**(3): p. 1093-1129.
39. Neubauer, S., *The Failing Heart — An Engine Out of Fuel*. New England Journal of Medicine, 2007. **356**(11): p. 1140-1151.

40. van der Vusse, G.J., M. van Bilsen, and J.F.C. Glatz, *Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease*. Cardiovascular Research, 2000. **45**(2): p. 279-293.
41. Glatz, J.F.C., J.J.F.P. Luiken, F.A. van Nieuwenhoven, and G.J. Van der Vusse, *Molecular mechanism of cellular uptake and intracellular translocation of fatty acids*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 1997. **57**(1): p. 3-9.
42. Abel, E.D., *Glucose transport in the heart*. Frontiers in Bioscience-Landmark, 2004. **9**(1): p. 201-215.
43. Torrealba, N., P. Aranguiz, C. Alonso, B.A. Rothermel, and S. Lavandero, *Mitochondria in Structural and Functional Cardiac Remodeling*. Adv Exp Med Biol, 2017. **982**: p. 277-306.
44. Doenst, T., G. Pytel, A. Schreppe, P. Amorim, G. Färber, Y. Shingu, . . . M. Schwarzer, *Decreased rates of substrate oxidation ex vivo predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload*. Cardiovasc Res, 2010. **86**(3): p. 461-70.
45. Nolfi-Donagan, D., A. Braganza, and S. Shiva, *Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement*. Redox Biology, 2020. **37**: p. 101674.
46. Gambardella, J., D. Sorriento, M. Ciccarelli, C. Del Giudice, A. Fiordelisi, L. Napolitano, . . . G. Santulli, *Functional Role of Mitochondria in Arrhythmogenesis*. Adv Exp Med Biol, 2017. **982**: p. 191-202.
47. Yin, M. and L.A.J. O'Neill, *The role of the electron transport chain in immunity*. The FASEB Journal, 2021. **35**(12): p. e21974.
48. Nickel, A., M. Kohlhaas, and C. Maack, *Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2014. **73**: p. 26-33.
49. Aon, M.A., B.A. Stanley, V. Sivakumaran, J.M. Kembro, B. O'Rourke, N. Paolocci, and S. Cortassa, *Glutathione/thioredoxin systems modulate mitochondrial H₂O₂ emission: an experimental-computational study*. Journal of General Physiology, 2012. **139**(6): p. 479-491.
50. Nickel, Alexander G., A. von Hardenberg, M. Hohl, Joachim R. Löffler, M. Kohlhaas, J. Becker, . . . C. Maack, *Reversal of Mitochondrial Transhydrogenase Causes Oxidative Stress in Heart Failure*. Cell Metabolism, 2015. **22**(3): p. 472-484.
51. Kohlhaas, M., T. Liu, A. Knopp, T. Zeller, M.F. Ong, M. Böhm, . . . C. Maack, *Elevated cytosolic Na⁺ increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes*. Circulation, 2010. **121**(14): p. 1606-1613.
52. Aon, M., S. Cortassa, and B. O'rourke, *Redox-optimized ROS balance: a unifying hypothesis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2010. **1797**(6-7): p. 865-877.
53. Gauthier, L.D., J.L. Greenstein, S. Cortassa, B. O'Rourke, and R.L. Winslow, *A computational model of reactive oxygen species and redox balance in cardiac mitochondria*. Biophysical journal, 2013. **105**(4): p. 1045-1056.
54. Ahlquist, R.P., *A studz of the adrenotropic receptors*. American Journal of Physiology-Legacy Content, 1948. **153**(3): p. 586-600.
55. Steinberg, S.F., *The Molecular Basis for Distinct β -Adrenergic Receptor Subtype Actions in Cardiomyocytes*. Circulation Research, 1999. **85**(11): p. 1101-1111.

56. Briston, T., M. Roberts, S. Lewis, B. Powney, J. M. Staddon, G. Szabadkai, and M.R. Duchon, *Mitochondrial permeability transition pore: sensitivity to opening and mechanistic dependence on substrate availability*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 10492.
57. van Opbergen, C.J.M., L. den Braven, M. Delmar, and T.A.B. van Veen, *Mitochondrial Dysfunction as Substrate for Arrhythmogenic Cardiomyopathy: A Search for New Disease Mechanisms*. Front Physiol, 2019. **10**: p. 1496.
58. Tse, G., B.P. Yan, Y.W. Chan, X.Y. Tian, and Y. Huang, *Reactive Oxygen Species, Endoplasmic Reticulum Stress and Mitochondrial Dysfunction: The Link with Cardiac Arrhythmogenesis*. Front Physiol, 2016. **7**: p. 313.
59. Parihar, P. and M.S. Parihar, *Metabolic enzymes dysregulation in heart failure: the prospective therapy*. Heart Failure Reviews, 2017. **22**(1): p. 109-121.
60. Brown, D.A. and B. O'Rourke, *Cardiac mitochondria and arrhythmias*. Cardiovascular Research, 2010. **88**(2): p. 241-249.
61. Iravanian, S., A.A. Sovari, H.A. Lardin, H. Liu, H.D. Xiao, E. Dolmatova, . . . S.C. Dudley, *Inhibition of renin-angiotensin system (RAS) reduces ventricular tachycardia risk by altering connexin43*. Journal of Molecular Medicine, 2011. **89**(7): p. 677-687.
62. Köhler, A.C., C.M. Sag, and L.S. Maier, *Reactive oxygen species and excitation–contraction coupling in the context of cardiac pathology*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2014. **73**: p. 92-102.
63. Cerrone, M., C.J.M. van Opbergen, K. Malkani, N. Irrera, M. Zhang, T.A.B. Van Veen, . . . M. Delmar, *Blockade of the Adenosine 2A Receptor Mitigates the Cardiomyopathy Induced by Loss of Plakophilin-2 Expression*. Frontiers in Physiology, 2018. **9**.
64. Zhang, L., T. Deng, Y. Sun, K. Liu, Y. Yang, and X. Zheng, *Role for nitric oxide in permeability of hippocampal neuronal hemichannels during oxygen glucose deprivation*. Journal of Neuroscience Research, 2008. **86**(10): p. 2281-2291.
65. Cucoranu, I., R. Clempus, A. Dikalova, P.J. Phelan, S. Ariyan, S. Dikalov, and D. Sorescu, *NAD(P)H Oxidase 4 Mediates Transforming Growth Factor- β 1–Induced Differentiation of Cardiac Fibroblasts Into Myofibroblasts*. Circulation Research, 2005. **97**(9): p. 900-907.
66. Thiene, G., A. Nava, D. Corrado, L. Rossi, and N. Pennelli, *Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people*. N Engl J Med, 1988. **318**(3): p. 129-33.
67. Basso, C., D. Corrado, F.I. Marcus, A. Nava, and G. Thiene, *Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*. The Lancet, 2009. **373**(9671): p. 1289-1300.
68. Wichter, T., T.M. Paul, L. Eckardt, P. Gerdes, P. Kirchhof, D. Böcker, and G. Breithardt, *Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy*. Herz Kardiovaskuläre Erkrankungen, 2005. **30**(2): p. 91-101.
69. Corrado, D., C. Basso, M. Schiavon, and G. Thiene, *Screening for hypertrophic cardiomyopathy in young athletes*. N Engl J Med, 1998. **339**(6): p. 364-9.
70. McKenna, W.J., G. Thiene, A. Nava, F. Fontaliran, C. Blomstrom-Lundqvist, G. Fontaine, and F. Camerini, *Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Task Force of the Working Group Myocardial and Pericardial Disease of the European Society of Cardiology and of the Scientific Council on Cardiomyopathies of the International Society and Federation of Cardiology*. Br Heart J, 1994. **71**(3): p. 215-8.
71. Miani, D., B. Pinamonti, R. Bussani, F. Silvestri, G. Sinagra, and F. Camerini, *Right ventricular dysplasia: a clinical and pathological study of two families with left ventricular involvement*. Br Heart J, 1993. **69**(2): p. 151-7.

72. Nava, A., G. Thiene, B. Canciani, R. Scognamiglio, L. Daliento, G. Buja, . . . G. Fasoli, *Familial occurrence of right ventricular dysplasia: a study involving nine families*. J Am Coll Cardiol, 1988. **12**(5): p. 1222-8.
73. Corrado, D. and G. Thiene, *Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: clinical impact of molecular genetic studies*. Circulation, 2006. **113**(13): p. 1634-7.
74. Gemayel, C., A. Pelliccia, and P.D. Thompson, *Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(7): p. 1773-81.
75. Austin, K.M., M.A. Trembley, S.F. Chandler, S.P. Sanders, J.E. Saffitz, D.J. Abrams, and W.T. Pu, *Molecular mechanisms of arrhythmogenic cardiomyopathy*. Nat Rev Cardiol, 2019. **16**(9): p. 519-537.
76. Herren, T., P.A. Gerber, and F. Duru, *Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: a not so rare "disease of the desmosome" with multiple clinical presentations*. Clin Res Cardiol, 2009. **98**(3): p. 141-58.
77. Thiene, G., C. Basso, G. Danieli, A. Rampazzo, D. Corrado, and A. Nava, *Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy a still underrecognized clinic entity*. Trends Cardiovasc Med, 1997. **7**(3): p. 84-90.
78. Niroomand, F., C. Carbucicchio, C. Tondo, S. Riva, G. Fassini, A. Apostolo, . . . P.D. Bella, *Electrophysiological characteristics and outcome in patients with idiopathic right ventricular arrhythmia compared with arrhythmogenic right ventricular dysplasia*. Heart, 2002. **87**(1): p. 41-7.
79. Sen-Chowdhry, S., M.D. Lowe, S.C. Sporton, and W.J. McKenna, *Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: clinical presentation, diagnosis, and management*. Am J Med, 2004. **117**(9): p. 685-95.
80. Sen-Chowdhry, S., R.D. Morgan, J.C. Chambers, and W.J. McKenna, *Arrhythmogenic Cardiomyopathy: Etiology, Diagnosis, and Treatment*. Annual Review of Medicine, 2010. **61**(1): p. 233-253.
81. Marcus, F.I., G.H. Fontaine, G. Guiraudon, R. Frank, J.L. Laurenceau, C. Malergue, and Y. Grosogoeat, *Right ventricular dysplasia: a report of 24 adult cases*. Circulation, 1982. **65**(2): p. 384-98.
82. Miles, C., G. Finocchiaro, M. Papadakis, B. Gray, J. Westaby, B. Ensam, . . . M.N. Sheppard, *Sudden Death and Left Ventricular Involvement in Arrhythmogenic Cardiomyopathy*. Circulation, 2019. **139**(15): p. 1786-1797.
83. Nava, A., B. Canciani, L. Daliento, G. Miraglia, G. Buja, G. Fasoli, . . . G. Thiene, *Juvenile sudden death and effort ventricular tachycardias in a family with right ventricular cardiomyopathy*. Int J Cardiol, 1988. **21**(2): p. 111-26.
84. Pinamonti, B., G. Sinagra, A. Salvi, A. Di Lenarda, T. Morgera, F. Silvestri, . . . F. Camerini, *Left ventricular involvement in right ventricular dysplasia*. Am Heart J, 1992. **123**(3): p. 711-24.
85. Sen-Chowdhry, S., P. Syrris, S.K. Prasad, S.E. Hughes, R. Merrifield, D. Ward, . . . W.J. McKenna, *Left-dominant arrhythmogenic cardiomyopathy: an under-recognized clinical entity*. J Am Coll Cardiol, 2008. **52**(25): p. 2175-87.
86. Jacoby, D. and W.J. McKenna, *Genetics of inherited cardiomyopathy*. European Heart Journal, 2011. **33**(3): p. 296-304.
87. Marcus, F.I., W.J. McKenna, D. Sherrill, C. Basso, B. Bauce, D.A. Bluemke, . . . W. Zareba, *Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: proposed modification of the task force criteria*. Circulation, 2010. **121**(13): p. 1533-41.
88. Towbin, J.A., W.J. McKenna, D.J. Abrams, M.J. Ackerman, H. Calkins, F.C.C. Darrieux, . . . W. Zareba, *2019 HRS expert consensus statement on evaluation, risk stratification, and management of arrhythmogenic cardiomyopathy*. Heart Rhythm, 2019. **16**(11): p. e301-e372.

89. Marcus, G.M., D.V. Glidden, B. Polonsky, W. Zareba, L.M. Smith, D.S. Cannom, . . . M.M. Scheinman, *Efficacy of antiarrhythmic drugs in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a report from the North American ARVC Registry*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(7): p. 609-15.
90. Wichter, T., M. Borggrefe, W. Haverkamp, X. Chen, and G. Breithardt, *Efficacy of antiarrhythmic drugs in patients with arrhythmogenic right ventricular disease. Results in patients with inducible and noninducible ventricular tachycardia*. Circulation, 1992. **86**(1): p. 29-37.
91. Corrado, D., H. Calkins, M.S. Link, L. Leoni, S. Favale, M. Bevilacqua, . . . F.I. Marcus, *Prophylactic implantable defibrillator in patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia and no prior ventricular fibrillation or sustained ventricular tachycardia*. Circulation, 2010. **122**(12): p. 1144-52.
92. Basso, C., D. Corrado, and G. Thiene, *Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: what's in a name? From a congenital defect (dysplasia) to a genetically determined cardiomyopathy (dystrophy)*. Am J Cardiol, 2010. **106**(2): p. 275-7.
93. Zipes, D.P., A.J. Camm, M. Borggrefe, A.E. Buxton, B. Chaitman, M. Fromer, . . . J.L. Zamorano, *ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death)*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(5): p. e247-346.
94. Gerull, B. and A. Brodehl, *Insights Into Genetics and Pathophysiology of Arrhythmogenic Cardiomyopathy*. Current Heart Failure Reports, 2021. **18**(6): p. 378-390.
95. Costa, S., M. Cerrone, A.M. Saguner, C. Brunckhorst, M. Delmar, and F. Duru, *Arrhythmogenic cardiomyopathy: An in-depth look at molecular mechanisms and clinical correlates*. Trends in Cardiovascular Medicine, 2021. **31**(7): p. 395-402.
96. Li, G.L., A.M. Saguner, and G.H. Fontaine, *Naxos disease: from the origin to today*. Orphanet J Rare Dis, 2018. **13**(1): p. 74.
97. Srinivas, S.M., P. Kumar, and G.V. Basavaraja, *Carvajal Syndrome*. Int J Trichology, 2016. **8**(1): p. 53-5.
98. Marcus, F.I., W. Zareba, H. Calkins, J.A. Towbin, C. Basso, D.A. Bluemke, . . . S. McNitt, *Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia clinical presentation and diagnostic evaluation: results from the North American Multidisciplinary Study*. Heart Rhythm, 2009. **6**(7): p. 984-92.
99. Lazzarini, E., J.D.H. Jongbloed, K. Pilichou, G. Thiene, C. Basso, H. Bikker, . . . P.A. van der Zwaag, *The ARVD/C Genetic Variants Database: 2014 Update*. Human Mutation, 2015. **36**(4): p. 403-410.
100. Rampazzo, A., M. Calore, J. van Hengel, and F. van Roy, *Intercalated discs and arrhythmogenic cardiomyopathy*. Circ Cardiovasc Genet, 2014. **7**(6): p. 930-40.
101. Awad, M.M., H. Calkins, and D.P. Judge, *Mechanisms of Disease: molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy*. Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine, 2008. **5**(5): p. 258-267.
102. Brodehl, A., D.D. Belke, L. Garnett, K. Martens, N. Abdelfatah, M. Rodriguez, . . . B. Gerull, *Transgenic mice overexpressing desmocollin-2 (DSC2) develop cardiomyopathy associated with myocardial inflammation and fibrotic remodeling*. PLoS One, 2017. **12**(3): p. e0174019.

103. Maione, A.S., C.A. Pilato, M. Casella, A. Gasperetti, I. Stadiotti, G. Pompilio, and E. Sommariva, *Fibrosis in Arrhythmogenic Cardiomyopathy: The Phantom Thread in the Fibro-Adipose Tissue*. Front Physiol, 2020. **11**: p. 279.
104. Garcia-Gras, E., R. Lombardi, M.J. Giocondo, J.T. Willerson, M.D. Schneider, D.S. Khoury, and A.J. Marian, *Suppression of canonical Wnt/ β -catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*. The Journal of Clinical Investigation, 2006. **116**(7): p. 2012-2021.
105. Chen, S.N., P. Gurha, R. Lombardi, A. Ruggiero, J.T. Willerson, and A.J. Marian, *The hippo pathway is activated and is a causal mechanism for adipogenesis in arrhythmogenic cardiomyopathy*. Circ Res, 2014. **114**(3): p. 454-68.
106. Maione, A.S., I. Stadiotti, C.A. Pilato, G.L. Perrucci, V. Saverio, V. Catto, . . . E. Sommariva, *Excess TGF- β 1 Drives Cardiac Mesenchymal Stromal Cells to a Pro-Fibrotic Commitment in Arrhythmogenic Cardiomyopathy*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(5).
107. Dubash, A.D., C.Y. Kam, B.A. Aguado, D.M. Patel, M. Delmar, L.D. Shea, and K.J. Green, *Plakophilin-2 loss promotes TGF- β 1/p38 MAPK-dependent fibrotic gene expression in cardiomyocytes*. J Cell Biol, 2016. **212**(4): p. 425-38.
108. Asimaki, A., H. Tandri, E.R. Duffy, J.R. Winterfield, S. Mackey-Bojack, M.M. Picken, . . . J.E. Saffitz, *Altered desmosomal proteins in granulomatous myocarditis and potential pathogenic links to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2011. **4**(5): p. 743-52.
109. Lubos, N., S. van der Gaag, M. Gerçek, S. Kant, R.E. Leube, and C.A. Krusche, *Inflammation shapes pathogenesis of murine arrhythmogenic cardiomyopathy*. Basic Res Cardiol, 2020. **115**(4): p. 42.
110. Zheng, G., C. Jiang, Y. Li, D. Yang, Y. Ma, B. Zhang, . . . X. Lin, *TMEM43-S358L mutation enhances NF- κ B-TGF β signal cascade in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy*. Protein & Cell, 2019. **10**(2): p. 104-119.
111. Rowland, E., W.J. McKenna, D. Sugrue, R. Barclay, R.A. Foale, and D.M. Krikler, *Ventricular tachycardia of left bundle branch block configuration in patients with isolated right ventricular dilatation. Clinical and electrophysiological features*. Br Heart J, 1984. **51**(1): p. 15-24.
112. Sato, P.Y., H. Musa, W. Coombs, G. Guerrero-Serna, G.A. Patiño, S.M. Taffet, . . . M. Delmar, *Loss of plakophilin-2 expression leads to decreased sodium current and slower conduction velocity in cultured cardiac myocytes*. Circ Res, 2009. **105**(6): p. 523-6.
113. Cerrone, M., X. Lin, M. Zhang, E. Agullo-Pascual, A. Pfenniger, H. Chkourko Gusky, . . . M. Delmar, *Missense mutations in plakophilin-2 cause sodium current deficit and associate with a Brugada syndrome phenotype*. Circulation, 2014. **129**(10): p. 1092-103.
114. Cerrone, M., M. Noorman, X. Lin, H. Chkourko, F.X. Liang, R. van der Nagel, . . . M. Delmar, *Sodium current deficit and arrhythmogenesis in a murine model of plakophilin-2 haploinsufficiency*. Cardiovasc Res, 2012. **95**(4): p. 460-8.
115. Cerrone, M. and M. Delmar, *Desmosomes and the sodium channel complex: implications for arrhythmogenic cardiomyopathy and Brugada syndrome*. Trends Cardiovasc Med, 2014. **24**(5): p. 184-90.
116. Noorman, M., S. Hakim, E. Kessler, J.A. Groeneweg, M.G.P.J. Cox, A. Asimaki, . . . T.A.B. van Veen, *Remodeling of the cardiac sodium channel, connexin43, and plakoglobin at the intercalated disk in patients with arrhythmogenic cardiomyopathy*. Heart Rhythm, 2013. **10**(3): p. 412-419.

117. Gomes, J., M. Finlay, A.K. Ahmed, E.J. Ciaccio, A. Asimaki, J.E. Saffitz, . . . P.D. Lambiase, *Electrophysiological abnormalities precede overt structural changes in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy due to mutations in desmoplakin-A combined murine and human study*. Eur Heart J, 2012. **33**(15): p. 1942-53.
118. Kaplan, S.R., J.J. Gard, N. Protonotarios, A. Tsatsopoulou, C. Spiliopoulou, A. Anastasakis, . . . J.E. Saffitz, *Remodeling of myocyte gap junctions in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy due to a deletion in plakoglobin (Naxos disease)*. Heart Rhythm, 2004. **1**(1): p. 3-11.
119. Paul, M., T. Wichter, J. Gerss, V. Arps, E. Schulze-Bahr, H. Robenek, . . . G. Weissen-Plenz, *Connexin expression patterns in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*. Am J Cardiol, 2013. **111**(10): p. 1488-95.
120. Fidler, L.M., G.J. Wilson, F. Liu, X. Cui, S.W. Scherer, G.P. Taylor, and R.M. Hamilton, *Abnormal connexin43 in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by plakophilin-2 mutations*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(10): p. 4219-28.
121. Kim, J.C., M. Pérez-Hernández, F.J. Alvarado, S.R. Maurya, J. Montnach, Y. Yin, . . . M. Delmar, *Disruption of Ca(2+)(i) Homeostasis and Connexin 43 Hemichannel Function in the Right Ventricle Precedes Overt Arrhythmogenic Cardiomyopathy in Plakophilin-2-Deficient Mice*. Circulation, 2019. **140**(12): p. 1015-1030.
122. Jansen, J.A., M. Noorman, H. Musa, M. Stein, S. de Jong, R. van der Nagel, . . . H.V. van Rijen, *Reduced heterogeneous expression of Cx43 results in decreased Nav1.5 expression and reduced sodium current that accounts for arrhythmia vulnerability in conditional Cx43 knockout mice*. Heart Rhythm, 2012. **9**(4): p. 600-7.
123. Cerrone, M., J. Montnach, X. Lin, Y.-T. Zhao, M. Zhang, E. Agullo-Pascual, . . . M. Delmar, *Plakophilin-2 is required for transcription of genes that control calcium cycling and cardiac rhythm*. Nature Communications, 2017. **8**(1): p. 106.
124. Lemasters, J.J., T.P. Theruvath, Z. Zhong, and A.-L. Nieminen, *Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2009. **1787**(11): p. 1395-1401.
125. Bertero, E. and C. Maack, *Metabolic remodelling in heart failure*. Nature Reviews Cardiology, 2018. **15**(8): p. 457-470.
126. El Hadi, H., R. Vettor, and M. Rossato, *Cardiomyocyte mitochondrial dysfunction in diabetes and its contribution in cardiac arrhythmogenesis*. Mitochondrion, 2019. **46**: p. 6-14.
127. Kim, C., J. Wong, J. Wen, S. Wang, C. Wang, S. Spiering, . . . H.S. Chen, *Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs*. Nature, 2013. **494**(7435): p. 105-10.
128. Pérez-Hernández, M., C.J.M.v. Opbergen, N. Bagwan, C.R. Vissing, G.M. Marrón-Liñares, M. Zhang, . . . A. Lundby, *Loss of Nuclear Envelope Integrity and Increased Oxidant Production Cause DNA Damage in Adult Hearts Deficient in PKP2: A Molecular Substrate of ARVC*. Circulation, 2022. **146**(11): p. 851-867.
129. Chelko, S.P., G. Keceli, A. Carpi, N. Doti, J. Agrimi, A. Asimaki, . . . D. Bedja, *Exercise triggers CAPN1-mediated AIF truncation, inducing myocyte cell death in arrhythmogenic cardiomyopathy*. Science translational medicine, 2021. **13**(581): p. eabf0891.

130. Romero, J., E. Mejia-Lopez, C. Manrique, and R. Lucariello, *Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy (ARVC/D): A Systematic Literature Review*. Clin Med Insights Cardiol, 2013. **7**: p. 97-114.
131. Gerull, B., A. Heuser, T. Wichter, M. Paul, C.T. Basson, D.A. McDermott, . . . L. Thierfelder, *Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*. Nat Genet, 2004. **36**(11): p. 1162-4.
132. van Tintelen, J.P., M.M. Entius, Z.A. Bhuiyan, R. Jongbloed, A.C. Wiesfeld, A.A. Wilde, . . . R.N. Hauer, *Plakophilin-2 mutations are the major determinant of familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy*. Circulation, 2006. **113**(13): p. 1650-8.
133. Kirchner, F., A. Schuetz, L.H. Boldt, K. Martens, G. Dittmar, W. Haverkamp, . . . B. Gerull, *Molecular insights into arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by plakophilin-2 missense mutations*. Circ Cardiovasc Genet, 2012. **5**(4): p. 400-11.
134. Andrew, P.K. and J.G. Kathleen, *Chapter Five - Structure, Function, and Regulation of Desmosomes*, in *The Molecular Biology of Cadherins*, Frans, Editor. 2013, Academic Press. p. 95-118.
135. Delmar, M. and W.J. McKenna, *The cardiac desmosome and arrhythmogenic cardiomyopathies: from gene to disease*. Circ Res, 2010. **107**(6): p. 700-14.
136. Sato, P.Y., W. Coombs, X. Lin, O. Nekrasova, K.J. Green, L.L. Isom, . . . M. Delmar, *Interactions between ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin43 at the cardiac intercalated disc*. Circ Res, 2011. **109**(2): p. 193-201.
137. Oxford, E.M., H. Musa, K. Maass, W. Coombs, S.M. Taffet, and M. Delmar, *Connexin43 Remodeling Caused by Inhibition of Plakophilin-2 Expression in Cardiac Cells*. Circulation Research, 2007. **101**(7): p. 703-711.
138. Agullo-Pascual, E., D.A. Reid, S. Keegan, M. Sidhu, D. Fenyö, E. Rothenberg, and M. Delmar, *Super-resolution fluorescence microscopy of the cardiac connexome reveals plakophilin-2 inside the connexin43 plaque*. Cardiovascular Research, 2013. **100**(2): p. 231-240.
139. Leo-Macias, A., E. Agullo-Pascual, and M. Delmar, *The cardiac connexome: Non-canonical functions of connexin43 and their role in cardiac arrhythmias*. Semin Cell Dev Biol, 2016. **50**: p. 13-21.
140. Moe, G., *Evidence for reentry as a mechanism of cardiac arrhythmias*. Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Volume 72: Volume: 72, 1975: p. 55-81.
141. Cerrone, M., G.M. Marrón-Liñares, C.J. van Opbergen, S. Costa, M. Bourfiss, M. Pérez-Hernández, . . . K. Drenkova, *Role of plakophilin-2 expression on exercise-related progression of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a translational study*. European heart journal, 2022. **43**(12): p. 1251-1264.
142. Opbergen, C.J.M.v., N. Bagwan, S.R. Maurya, J.-C. Kim, A.N. Smith, D.J. Blackwell, . . . M. Delmar, *Exercise Causes Arrhythmogenic Remodeling of Intracellular Calcium Dynamics in Plakophilin-2-Deficient Hearts*. Circulation, 2022. **145**(19): p. 1480-1496.
143. van Opbergen, C.J.M., M. Noorman, A. Pfenniger, J.S. Copier, S.H. Vermij, Z. Li, . . . T.A.B. van Veen, *Plakophilin-2 Haploinsufficiency Causes Calcium Handling Deficits and Modulates the Cardiac Response Towards Stress*. International journal of molecular sciences, 2019. **20**(17): p. 4076.

144. van Opbergen, C.J.M., N. Bagwan, S.R. Maurya, J.C. Kim, A.N. Smith, D.J. Blackwell, . . . M. Delmar, *Exercise Causes Arrhythmogenic Remodeling of Intracellular Calcium Dynamics in Plakophilin-2-Deficient Hearts*. *Circulation*, 2022. **145**(19): p. 1480-1496.
145. Lyon, A., C.J. Van Opbergen, M. Delmar, J. Heijman, and T.A. Van Veen, *In silico identification of disrupted myocardial calcium homeostasis as proarrhythmic trigger in arrhythmogenic cardiomyopathy*. *Frontiers in physiology*, 2021: p. 1584.
146. Ventura-Clapier, R., A. Garnier, and V. Veksler, *Energy metabolism in heart failure*. *The Journal of Physiology*, 2004. **555**(1): p. 1-13.
147. McKoy, G., N. Protonotarios, A. Crosby, A. Tsatsopoulou, A. Anastasakis, A. Coonar, . . . W.J. McKenna, *Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease)*. *The Lancet*, 2000. **355**(9221): p. 2119-2124.
148. Lewis, J.E., J.K. Wahl, 3rd, K.M. Sass, P.J. Jensen, K.R. Johnson, and M.J. Wheelock, *Cross-talk between adherens junctions and desmosomes depends on plakoglobin*. *J Cell Biol*, 1997. **136**(4): p. 919-34.
149. Leopoulou, M., G. Mattsson, J.A. LeQuang, J.V. Pergolizzi, G. Varrassi, M. Wallhagen, and P. Magnusson, *Naxos disease - a narrative review*. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2020. **18**(11): p. 801-808.
150. Lombardi, R., M. da Graca Cabreira-Hansen, A. Bell, R.R. Fromm, J.T. Willerson, and A.J. Marian, *Nuclear plakoglobin is essential for differentiation of cardiac progenitor cells to adipocytes in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*. *Circ Res*, 2011. **109**(12): p. 1342-53.
151. Sommariva, E., S. Brambilla, C. Carbucicchio, E. Gambini, V. Meraviglia, A. Dello Russo, . . . G. Pompilio, *Cardiac mesenchymal stromal cells are a source of adipocytes in arrhythmogenic cardiomyopathy*. *European Heart Journal*, 2015. **37**(23): p. 1835-1846.
152. Li, D., Y. Liu, M. Maruyama, W. Zhu, H. Chen, W. Zhang, . . . W. Shou, *Restrictive loss of plakoglobin in cardiomyocytes leads to arrhythmogenic cardiomyopathy*. *Human Molecular Genetics*, 2011. **20**(23): p. 4582-4596.
153. McLennan, I.S. and K. Koishi, *The transforming growth factor-betas: multifaceted regulators of the development and maintenance of skeletal muscles, motoneurons and Schwann cells*. *Int J Dev Biol*, 2002. **46**(4): p. 559-67.
154. Taniguti, A.P., A. Pertille, C.Y. Matsumura, H. Santo Neto, and M.J. Marques, *Prevention of muscle fibrosis and myonecrosis in mdx mice by suramin, a TGF- β 1 blocker*. *Muscle Nerve*, 2011. **43**(1): p. 82-7.
155. Li, J., D. Swope, N. Raess, L. Cheng, E.J. Muller, and G.L. Radice, *Cardiac Tissue-Restricted Deletion of Plakoglobin Results in Progressive Cardiomyopathy and Activation of β -Catenin Signaling*. *Molecular and Cellular Biology*, 2011. **31**(6): p. 1134-1144.
156. Asimaki, A., S. Kapoor, E. Plovie, A. Karin Arndt, E. Adams, Z. Liu, . . . J.E. Saffitz, *Identification of a new modulator of the intercalated disc in a zebrafish model of arrhythmogenic cardiomyopathy*. *Sci Transl Med*, 2014. **6**(240): p. 240ra74.
157. Eldar-Finkelman, H. and A. Martinez, *GSK-3 Inhibitors: Preclinical and Clinical Focus on CNS*. *Front Mol Neurosci*, 2011. **4**: p. 32.
158. Chelko, S.P., A. Asimaki, P. Andersen, D. Bedja, N. Amat-Alarcon, D. DeMazumder, . . . D.P. Judge, *Central role for GSK3 β in the pathogenesis of arrhythmogenic cardiomyopathy*. *JCI Insight*, 2016. **1**(5).

159. Bierkamp, C., K.J. McLaughlin, H. Schwarz, O. Huber, and R. Kemler, *Embryonic Heart and Skin Defects in Mice Lacking Plakoglobin*. Developmental Biology, 1996. **180**(2): p. 780-785.
160. Grossmann, K.S., C. Grund, J. Huelsken, M. Behrend, B. Erdmann, W.W. Franke, and W. Birchmeier *Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation*. Journal of Cell Biology, 2004. **167**(1): p. 149-160.
161. Zinke, R., *Funktionelle Charakterisierung von Plakophilin-2 und Desmoplakin im adulten*. 2013.
162. Kelmenson, P. *Cre Lox Breeding for Beginners, Part 1*. 2011 [cited 03.02.2023]; Available from: <https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2011/september/cre-lox-breeding>.
163. Mülhardt, C., *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 2009: Springer.
164. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-408.
165. IonOptix *Myocyte Calcium & Contractility Recording System (μ Step Configuration)*. 2011.
166. Grisan, F., A. Burdyga, L.F. Iannucci, N.C. Surdo, T. Pozzan, G. Di Benedetto, and K. Lefkimmiatis, *Studying β 1 and β 2 adrenergic receptor signals in cardiac cells using FRET-based sensors*. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 2020. **154**: p. 30-38.
167. Kamp, T.J. and J.W. Hell, *Regulation of Cardiac L-Type Calcium Channels by Protein Kinase A and Protein Kinase C*. Circulation Research, 2000. **87**(12): p. 1095-1102.
168. Balaban, R.S., *Cardiac Energy Metabolism Homeostasis: Role of Cytosolic Calcium*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2002. **34**(10): p. 1259-1271.
169. Blacker, T.S. and M.R. Duchen, *Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence*. Free Radical Biology and Medicine, 2016. **100**: p. 53-65.
170. Chi, H., G. Bhosale, and M.R. Duchen, *Assessing the Redox Status of Mitochondria Through the NADH/FAD₂⁺ Ratio in Intact Cells*, in *Mitochondria: Methods and Protocols*, N. Tomar, Editor. 2022, Springer US: New York, NY. p. 313-318.
171. Eng, J., R.M. Lynch, and R.S. Balaban, *Nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence spectroscopy and imaging of isolated cardiac myocytes*. Biophys J, 1989. **55**(4): p. 621-30.
172. Heytler, P.G. and W.W. Prichard, *A new class of uncoupling agents — Carbonyl cyanide phenylhydrazones*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1962. **7**(4): p. 272-275.
173. Leavesley, H.B., L. Li, K. Prabhakaran, J.L. Borowitz, and G.E. Isom, *Interaction of Cyanide and Nitric Oxide with Cytochrome c Oxidase: Implications for Acute Cyanide Toxicity*. Toxicological Sciences, 2008. **101**(1): p. 101-111.
174. Takahashi, A., P. Camacho, J.D. Lechleiter, and B. Herman, *Measurement of Intracellular Calcium*. Physiological Reviews, 1999. **79**(4): p. 1089-1125.
175. Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien, *A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties*. Journal of Biological Chemistry, 1985. **260**(6): p. 3440-3450.

176. Floryk, D. and J. Houštěk, *Tetramethyl Rhodamine Methyl Ester (TMRM) is Suitable for Cytofluorometric Measurements of Mitochondrial Membrane Potential in Cells Treated with Digitonin*. Bioscience Reports, 1999. **19**(1): p. 27-34.
177. Mela, L. and S. Seitz, [4] *Isolation of mitochondria with emphasis on heart mitochondria from small amounts of tissue*, in *Methods in Enzymology*. 1979, Academic Press. p. 39-46.
178. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
179. Leland C. Clark, J., R. Wolf, D. Granger, and Z. Taylor, *Continuous Recording of Blood Oxygen Tensions by Polarography*. Journal of Applied Physiology, 1953. **6**(3): p. 189-193.
180. Walker, D., *The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis*. 1987: Citeseer.
181. Koudelka, M., *Performance characteristics of a planar 'clark-type' oxygen sensor*. Sensors and Actuators, 1986. **9**(3): p. 249-258.
182. Clark, L.C., Jr., R. Wolf, D. Granger, and Z. Taylor, *Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography*. J Appl Physiol, 1953. **6**(3): p. 189-93.
183. Severinghaus, J.W. and P.B. Astrup, *History of blood gas analysis. IV. Leland Clark's oxygen electrode*. Journal of Clinical Monitoring, 1986. **2**(2): p. 125-139.
184. Gnaiger, E., *The Oxygraph for High-Resolution Respirometry (HRR)*. Mitochondrial Physiology Network, 2011(06.01.): p. 1.
185. Chance, B. and G. Williams, *Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation*. J Biol Chem, 1955. **217**(1): p. 324-327.
186. Huijing, F. and E. Slater, *The use of oligomycin as an inhibitor of oxidative phosphorylation*. The Journal of Biochemistry, 1961. **49**(6): p. 493-501.
187. Brand, M.D., L.-F. Chien, E.K. Ainscow, D.F. Rolfe, and R.K. Porter, *The causes and functions of mitochondrial proton leak*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1994. **1187**(2): p. 132-139.
188. Estabrook, R.W., [7] *Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios*, in *Methods in enzymology*. 1967, Elsevier. p. 41-47.
189. Chowdhury, Subir R., J. Djordjevic, Benedict C. Albeni, and P. Fernyhough, *Simultaneous evaluation of substrate-dependent oxygen consumption rates and mitochondrial membrane potential by TMRM and safranin in cortical mitochondria*. Bioscience Reports, 2016. **36**(1): p. e00286.
190. Krumschnabel, G., M. Makrecka-Kuka, S. Kumphune, M. Fontana-Ayoub, M. Fasching, and E. Gnaiger, *O₂k-fluorometry: HRR and simultaneous determination of H₂O₂ production with Amplex Red*. Mitochondr Physiol Network, 2014. **19**: p. 1-6.
191. Murphy, M.P., *How mitochondria produce reactive oxygen species*. Biochem J, 2009. **417**(1): p. 1-13.
192. Takuwa, Y., N. Takuwa, and H. Rasmussen, *The effects of isoproterenol on intracellular calcium concentration*. Journal of Biological Chemistry, 1988. **263**(2): p. 762-768.
193. Ren, X., N. Hensley, M.B. Brady, and W.D. Gao, *The Genetic and Molecular Bases for Hypertrophic Cardiomyopathy: The Role for Calcium Sensitization*. Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia, 2018. **32**(1): p. 478-487.
194. Cortassa, S., M.A. Aon, E. Marbán, R.L. Winslow, and B. O'Rourke, *An Integrated Model of Cardiac Mitochondrial Energy Metabolism and Calcium Dynamics*. Biophysical Journal, 2003. **84**(4): p. 2734-2755.

195. Li, Q., D. Su, B. O'Rourke, S.M. Pogwizd, and L. Zhou, *Mitochondria-derived ROS bursts disturb Ca²⁺ cycling and induce abnormal automaticity in guinea pig cardiomyocytes: a theoretical study*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015. **308**(6): p. H623-36.
196. Saks, V., P. Dzeja, U. Schlattner, M. Vendelin, A. Terzic, and T. Wallimann, *Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-Starling law*. *J Physiol*, 2006. **571**(Pt 2): p. 253-73.
197. Broussard, J.A., R. Yang, C. Huang, S.S.P. Nathamgari, A.M. Beese, L.M. Godsel, . . . H.D. Espinosa, *The desmoplakin-intermediate filament linkage regulates cell mechanics*. *Mol Biol Cell*, 2017. **28**(23): p. 3156-3164.
198. Houser, S.R. and K.B. Margulies, *Is Depressed Myocyte Contractility Centrally Involved in Heart Failure?* *Circulation Research*, 2003. **92**(4): p. 350-358.
199. Bers, D.M., *Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure*. *Physiology* (Bethesda), 2006. **21**: p. 380-7.
200. Veerman, C., G. Kosmidis, C. Mummery, S. Casini, A. Verkerk, and M. Bellin, *Immaturity of Human Stem-Cell-Derived Cardiomyocytes in Culture: Fatal Flaw or Soluble Problem?* *Stem cells and development*, 2015. **24**.
201. Simmerman, H.K.B. and L.R. Jones, *Phospholamban: Protein Structure, Mechanism of Action, and Role in Cardiac Function*. *Physiological Reviews*, 1998. **78**(4): p. 921-947.
202. El-Battrawy, I., Z. Zhao, H. Lan, L. Cyganek, C. Tombers, X. Li, . . . I. Akin, *Electrical dysfunctions in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from a patient with an arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*. *EP Europace*, 2018. **20**(F11): p. f46-f56.
203. Chitaev, N.A., A.Z. Averbakh, R.B. Troyanovsky, and S.M. Troyanovsky, *Molecular organization of the desmoglein-plakoglobin complex*. *Journal of Cell Science*, 1998. **111**(14): p. 1941-1949.
204. Asimaki, A., P. Syrris, T. Wichter, P. Matthias, J.E. Saffitz, and W.J. McKenna, *A Novel Dominant Mutation in Plakoglobin Causes Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy*. *The American Journal of Human Genetics*, 2007. **81**(5): p. 964-973.
205. Kim, E., D.W. Shin, C.S. Hong, D. Jeong, D.H. Kim, and W.J. Park, *Increased Ca²⁺ storage capacity in the sarcoplasmic reticulum by overexpression of HRC (histidine-rich Ca²⁺ binding protein)*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003. **300**(1): p. 192-196.
206. Alcalai, R., S. Metzger, S. Rosenheck, V. Meiner, and T. Chajek-Shaul, *A recessive mutation in desmoplakin causes arrhythmogenic right ventricular dysplasia, skin disorder, and woolly hair*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2003. **42**(2): p. 319-327.
207. Gadicherla, A.K., N. Wang, M. Bulic, E. Agullo-Pascual, A. Lissoni, M. De Smet, . . . L. Leybaert, *Mitochondrial Cx43 hemichannels contribute to mitochondrial calcium entry and cell death in the heart*. *Basic Research in Cardiology*, 2017. **112**(3): p. 27.
208. Echtay, K.S., D. Roussel, J. St-Pierre, M.B. Jekabsons, S. Cadenas, J.A. Stuart, . . . M.D. Brand, *Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins*. *Nature*, 2002. **415**(6867): p. 96-99.
209. Murashige, D., C. Jang, M. Neinast, J.J. Edwards, A. Cowan, M.C. Hyman, . . . Z. Arany, *Comprehensive quantification of fuel use by the failing and nonfailing human heart*. *Science*, 2020. **370**(6514): p. 364-368.

210. Paci, M., J. Hyttinen, B. Rodriguez, and S. Severi, *Human induced pluripotent stem cell-derived versus adult cardiomyocytes: an in silico electrophysiological study on effects of ionic current block*. British Journal of Pharmacology, 2015. **172**(21): p. 5147-5160.
211. Koitabashi, N., D. Bedja, A.L. Zaiman, Y.M. Pinto, M. Zhang, K.L. Gabrielson, . . . D.A. Kass, *Avoidance of transient cardiomyopathy in cardiomyocyte-targeted tamoxifen-induced MerCreMer gene deletion models*. Circ Res, 2009. **105**(1): p. 12-5.
212. Toye, A.A., J.D. Lippiat, P. Proks, K. Shimomura, L. Bentley, A. Hugill, . . . R.D. Cox, *A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice*. Diabetologia, 2005. **48**(4): p. 675-686.
213. Corrado, D., C. Basso, and D.P. Judge, *Arrhythmogenic Cardiomyopathy*. Circulation Research, 2017. **121**(7): p. 784-802.
214. Syrris, P., D. Ward, A. Asimaki, S. Sen-Chowdhry, H.Y. Ebrahim, A. Evans, . . . W.J. McKenna, *Clinical Expression of Plakophilin-2 Mutations in Familial Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy*. Circulation, 2006. **113**(3): p. 356-364.
215. Protonotarios, N., A. Tsatsopoulou, A. Anastasakis, E. Sevdalis, G. McKoy, K. Stratos, . . . P. Toutouzas, *Genotype-phenotype assessment in autosomal recessive arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (Naxos disease) caused by a deletion in plakoglobin*. Journal of the American College of Cardiology, 2001. **38**(5): p. 1477-1484.
216. Antoniadou, L., A. Tsatsopoulou, A. Anastasakis, P. Syrris, A. Asimaki, D. Panagiotakos, . . . N. Protonotarios, *Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by deletions in plakophilin-2 and plakoglobin (Naxos disease) in families from Greece and Cyprus: genotype-phenotype relations, diagnostic features and prognosis*. Eur Heart J, 2006. **27**(18): p. 2208-16.
217. Schlüter, K.-D., H.S. Kutsche, C. Hirschhäuser, R. Schreckenber, and R. Schulz, *Review on Chamber-Specific Differences in Right and Left Heart Reactive Oxygen Species Handling*. Frontiers in Physiology, 2018. **9**.
218. Garbern, J.C. and R.T. Lee, *Mitochondria and metabolic transitions in cardiomyocytes: lessons from development for stem cell-derived cardiomyocytes*. Stem Cell Research & Therapy, 2021. **12**(1): p. 177.
219. Fernández-Vizcarra, E., J.A. Enríquez, A. Pérez-Martos, J. Montoya, and P. Fernández-Silva, *Tissue-specific differences in mitochondrial activity and biogenesis*. Mitochondrion, 2011. **11**(1): p. 207-213.
220. Tse, G., *Mechanisms of cardiac arrhythmias*. Journal of Arrhythmia, 2016. **32**(2): p. 75-81.
221. Hein, L., M.E. Stevens, G.S. Barsh, R.E. Pratt, B.K. Kobilka, and V.J. Dzau, *Overexpression of angiotensin AT₁ receptor transgene in the mouse myocardium produces a lethal phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(12): p. 6391-6396.
222. Milani-Nejad, N. and P.M.L. Janssen, *Small and large animal models in cardiac contraction research: Advantages and disadvantages*. Pharmacology & Therapeutics, 2014. **141**(3): p. 235-249.
223. Maack, C., S. Cortassa, M.A. Aon, A.N. Ganesan, T. Liu, and B. O'Rourke, *Elevated cytosolic Na⁺ decreases mitochondrial Ca²⁺ uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes*. Circulation research, 2006. **99**(2): p. 172-182.

224. Weber, C.R., V. Piacentino, 3rd, S.R. Houser, and D.M. Bers, *Dynamic regulation of sodium/calcium exchange function in human heart failure*. *Circulation*, 2003. **108**(18): p. 2224-9.