

Aus der Anatomischen Anstalt  
Lehrstuhl Anatomie – Vegetative Anatomie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. Jens Waschke

**Die Rolle von adrenerger Stimulation für die Regulation der Zell-  
Zell-Haftung im Herzen – positive Adhäsotropie als neue Funktion  
des Sympathikus**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Camilla Barbara Josephine Schinner

aus  
Bayreuth

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jens Waschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Hans Theiss

Prof. Dr. rer. nat. Mechthild Stöckelhuber

PD Dr. rer. nat. Christoph Küper

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

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Februar 2019

*Für meine gesamte Familie*

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Das Herz .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2.</b>	<b>Komponenten des Glanzstreifens .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2.1.</b>	<b>Desmosomen .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2.2.</b>	<b>Adhärensjunktionen.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.3.</b>	<b>Gap Junctions .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.4.</b>	<b>Area composita und Connexom.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.</b>	<b>Arrhythmogene Kardiomyopathie .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4.</b>	<b>Regulation der Herzfunktion durch das sympathische Nervensystem.....</b>	<b>12</b>
<b>1.5.</b>	<b>Fragestellung .....</b>	<b>15</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1.</b>	<b>Modelle .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1.1.</b>	<b>HL-1-Kardiomyozyten-Kultur .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1.2.</b>	<b>Herzspezifische Plakoglobin-Knockout-Mauslinie.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.3.</b>	<b>Murine Herzschnittkultur .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2.</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2.1.</b>	<b>Zelltransfektion mit Plasmiden .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2.2.</b>	<b>siRNA-vermittelte Proteinreduktion.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2.3.</b>	<b>Expression und Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase-fusionierten Proteinen.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.4.</b>	<b>Immunfluoreszenzdarstellung .....</b>	<b>23</b>
<b>2.2.5.</b>	<b>Azan-Färbung.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2.6.</b>	<b>Proteinquantifizierung .....</b>	<b>26</b>
<b>2.2.7.</b>	<b>Elektrophorese und Western Blot-Analyse .....</b>	<b>27</b>
<b>2.2.8.</b>	<b>Triton-X-100-vermittelte Proteinfractionierung .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.9.</b>	<b>Analyse von Phosphoproteinen mittels Phos-Tag.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.10.</b>	<b>Immunpräzipitation.....</b>	<b>30</b>
<b>2.2.11.</b>	<b>Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest .....</b>	<b>31</b>
<b>2.2.12.</b>	<b><i>In vitro</i>-Kinase-Versuch .....</b>	<b>32</b>
<b>2.2.13.</b>	<b>Dissoziationsversuche .....</b>	<b>32</b>
<b>2.2.14.</b>	<b>Rasterkraftmikroskopie.....</b>	<b>35</b>
<b>2.2.15.</b>	<b>Herzperfusion nach Langendorff.....</b>	<b>39</b>
<b>2.3.</b>	<b>Antikörper und Testreagenzien .....</b>	<b>40</b>
<b>2.4.</b>	<b>Statistik und Datenauswertung .....</b>	<b>43</b>

3.	ERGEBNISSE .....	45
3.1.	Positive Adhäsotropie: Adrenerge Stimulation stärkt die kardiale Zell-Zell-Haftung.....	45
3.1.1.	Adrenerge Stimulation durch Isoprenalin und Forskolin/Rolipram .....	45
3.1.2.	Erhöhte Zell-Zell-Haftung in HL-1-Kardiomyozyten.....	46
3.1.3.	Erhöhte Zell-Zell-Haftung in kultivierten Herzschnitten .....	48
3.2.	Positive Adhäsotropie korreliert mit desmosomaler Reorganisation .....	49
3.2.1.	Verstärkte Kräfte und Translokation von Desmoglein-2-vermittelten Bindungen .....	49
3.2.2.	Zunahme von desmosomalen Proteinen an den Zell-Zell-Junktionen .....	54
3.3.	Positive Adhäsotropie ist abhängig von Plakoglobin.....	62
3.3.1.	Charakterisierung der herzspezifischen Plakoglobin-defizienten Mauslinie.....	62
3.3.2.	Plakoglobin-Abhängigkeit der positiven Adhäsotropie .....	67
3.3.3.	Plakoglobin-Abhängigkeit des positiven inotropen und chronotropen Effekts adrenerger Stimulation .....	71
3.4.	Positive Adhäsotropie wird durch Proteinkinase A-abhängige Phosphorylierung von Plakoglobin an Serin 665 vermittelt.....	74
3.4.1.	Proteinkinase A-Abhängigkeit der positiven Adhäsotropie.....	74
3.4.2.	Phosphorylierung von Plakoglobin an Serin 665 durch adrenerge Stimulation über die Proteinkinase A .....	77
3.4.3.	Positive Adhäsotropie durch Phosphorylierung von Plakoglobin an S665.....	81
4.	DISKUSSION.....	84
4.1.	Positive Adhäsotropie als neue Funktion des Sympathikus .....	84
4.1.1.	Wirkung der positiven Adhäsotropie auf Kardiomyozyten.....	84
4.1.2.	Verstärkte Zell-Zell-Haftung durch adrenerge Signalwege in verschiedenen Geweben.....	89
4.1.3.	Mögliche Bedeutung der positiven Adhäsotropie für die Herzfunktion .....	91
4.2.	Mögliche Bedeutung der positiven Adhäsotropie unter pathologischen Bedingungen ....	92
5.	ZUSAMMENFASSUNG .....	95
6.	LITERATURVERZEICHNIS .....	96
7.	ANHANG.....	108
7.1.	Abkürzungsverzeichnis .....	108
7.2.	Zusammensetzung der Lösungen und Chemikalien .....	112
7.3.	Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	120
7.4.	Tabellenverzeichnis .....	122

<b>7.5.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>122</b>
<b>7.6.</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>125</b>
<b>7.7.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>126</b>

## 1. Einleitung

### 1.1. Das Herz

Das Herz ist ein muskuläres Hohlorgan und funktioniert als zentrale Druck- und Saugpumpe, um Blut im Körper zu transportieren und zu verteilen. Dies ist essentiell für die Versorgung des Organismus mit Sauerstoff, Nährstoffen und Hormonen. Hierdurch werden außerdem weitere entscheidende Funktionen, wie die Regulation der Körpertemperatur, Immunabwehr und Blutstillung durch Transport von Abwehrzellen, Antikörpern, Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren sichergestellt (Waschke et al., 2015).

Das Herz liegt im unteren mittleren Mediastinum und besteht aus einer rechten und linken Herzhälfte mit je einem Vorhof (Atrium dextrum und sinistrum) und einer Kammer (Ventriculus dexter und sinister), die jeweils durch Segelklappen voneinander getrennt sind. Diese beiden Herzhälften sind in Serie geschaltet, sodass sauerstoffarmes Blut aus der oberen und unteren Körperhälfte über die Vena cava superior bzw. inferior in den rechten Vorhof und von dort über die Trikuspidalklappe in den rechten Ventrikel fließen kann, von wo aus es über den Truncus pulmonalis in den Lungenkreislauf zur Oxygenierung gepumpt wird. Das in der Lunge mit Sauerstoff angereicherte Blut gelangt über die Venae pulmonales in den linken Vorhof und wird durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel befördert. Die Kontraktion des Herzens presst dann das Blut über die Aorta in den Körperkreislauf zur Versorgung des Organismus (Standring, 2015; Waschke et al., 2015).

Die Wand des Herzens wird in Epikard, Myokard und Endokard unterteilt. Das Epikard als äußerste Schicht besteht aus Mesothel mit darunterliegendem Bindegewebe. Nach innen folgt die myokardiale Schicht, die von Herzmuskulatur gebildet wird, und schließlich das Endokard als innerste Schicht, das aus Endothel mit darunterliegendem Bindegewebe aufgebaut ist. Die Herzmuskulatur besteht aus quergestreiften, spezialisierten Muskelzellen, den Kardiomyozyten, die eine zylindrische Form mit einer Länge von bis zu 100  $\mu\text{m}$  und einem Durchmesser von ca. 15  $\mu\text{m}$  aufweisen. Die Kontraktilität der Kardiomyozyten wird über das aus ineinander verschränkten Aktin- und Myosinfilamenten

bestehende Sarkomersystem ermöglicht, das entlang der Längsachse der Zelle orientiert und an den jeweils schmalen Enden verankert ist. An diesen Endstücken kann sich eine Zelle mehrfach verzweigen und in kleinere Stufen aufteilen, um so Kontakt zu 5 bis 10 umgebenden Kardiomyozyten zu erhalten. An diesen Kontaktzonen befinden sich hochspezialisierte Proteinkomplexe, die als Glanzstreifen (engl.: „Intercalated disc“) bezeichnet werden und die die mechanische und elektrische Kopplung der Kardiomyozyten untereinander gewährleisten. Die Integrität der Glanzstreifen ist essentiell, damit die einzelnen Kardiomyozyten als funktionelles Synzytium fungieren können und so eine suffiziente und geordnete Kontraktion des Herzens ermöglicht wird (Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012).

## **1.2. Komponenten des Glanzstreifens**

Glanzstreifen sind aus mehreren Einzelkomponenten mit jeweils unterschiedlichen Funktionen aufgebaut. So zählen Desmosomen und Adhärensjunktionen zu den Adhäsionskontakten und dienen der mechanischen Stabilität. Dagegen sind Gap Junctions als Kommunikationskontakte sowohl für die elektrische Kopplung zur Weiterleitung von Erregungen als auch zur chemischen Kopplung durch Austausch kleiner Moleküle essentiell (Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012). Im Gegensatz zur früher proklamierten klaren räumlichen und funktionellen Trennung dieser Einzelkomponenten konnte mittlerweile in mehreren Studien gezeigt werden, dass der Glanzstreifen viel mehr als funktionelle und strukturelle Einheit gesehen werden muss. So konnten sowohl Interaktionen von Proteinen der drei Komponenten jeweils miteinander als auch die Abhängigkeit der Gap Junction-Funktion von einer suffizienten Zell-Zell-Haftung nachgewiesen werden (Delmar und McKenna, 2010).

### **1.2.1. Desmosomen**

Desmosomen, zusammengesetzt aus den griechischen Worten „desmos“ (Bindung) und „soma“ (Körper), wurden erstmals 1864 beschrieben (Delva et al., 2009). Sie sind am Intermediärfilament-Zytoskelett der Zelle verankert und verbinden benachbarte Zellen

miteinander, um eine widerstandsfähige Zell-Zell-Haftung und so die Integrität des Gewebes zu gewährleisten (Thomason et al., 2010). Demnach kommen sie vor allem in mechanisch beanspruchtem Gewebe wie dem Myokard, dem mehrschichtigen Plattenepithel der Haut oder der Mukosa, aber auch in einfachen Epithelien und auch nicht-epithelialen Geweben vor (Waschke und Spindler, 2014). Ultrastrukturell sind Desmosomen aus zwei Proteinplaques aufgebaut, die sich im Zytoplasma unterhalb der Plasmamembran der jeweils gegenüberliegenden Zellen befinden. In diese Plaques strahlen jeweils auf der zytoplasmatischen Seite die gewebespezifischen Intermediärfilamente zur Verankerung ein. Es kann morphologisch eine elektronendichtere äußere (ÄMP) von einer weniger dichten, in Richtung Intermediärfilamente gelegenen, inneren Membranplaque (IMP) unterschieden werden (Abb. 1). Der Interzellulärspalt zwischen den jeweiligen Plasmamembranen wird durch desmosomale Adhäsionsmoleküle überbrückt, die an einer elektronenmikroskopisch dichten Mittellinie (DM) miteinander interagieren. Intrazellulär sind diese Transmembranmoleküle an den Proteinen der äußeren Membranplaque verankert (Yin und Green, 2004; Delva et al., 2009).

Die desmosomalen transmembranären Adhäsionsmoleküle gehören zur Superfamilie der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Cadherine mit den beiden Gruppen der Desmogleine (DSGs; Isoformen 1 - 4) und Desmocolline (DSCs; Isoformen 1 - 3), die je nach Gewebetyp unterschiedlich exprimiert werden. So kommen DSG2 und DSC2 fast ubiquitär in allen mit Desmosomen ausgestatteten Geweben wie dem Myokard oder einfachen Epithelien vor. Die Isoformen 1 und 3 sowohl der DSGs als auch der DSCs sind hingegen nur in mehrschichtigen Plattenepithelien und DSG4 vor allem in Haarfollikeln zu finden (Kljuic et al., 2004; Dusek et al., 2007). Beide Cadheringruppen folgen dem Bauplan klassischer Cadherine mit vier Extrazellulärdomänen, die im Übergangsbereich der Domänen je drei  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen aufweisen, gefolgt von einer extrazellulären Ankerdomäne und einer Transmembrandomäne mit wiederum intrazellulärer Ankerdomäne. Bei allen DSGs und der längeren Spleißvariante DSC „a“ folgt ein intrazelluläres Cadherinsegment, welches wichtig für die Bindung an Plaqueproteine wie Plakoglobin (PG) zu sein scheint. Im Gegensatz zu klassischen Cadherinen und DSCs enthalten DSG-Moleküle einen ausgedehnten

intrazellulären Proteinanteil mit mehreren, sich wiederholenden Einheiten (engl.: „Repeating unit domains“; RUD). Die Funktion dieses Molekülabschnittes ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch scheint er für die Interaktion mit Plakophilinen (PKPs) (Dusek et al., 2007; Delva et al., 2009) und die Inhibition der DSG-Internalisierung mit Regulation der Zell-Zell-Haftung wichtig zu sein (Chen et al., 2012).

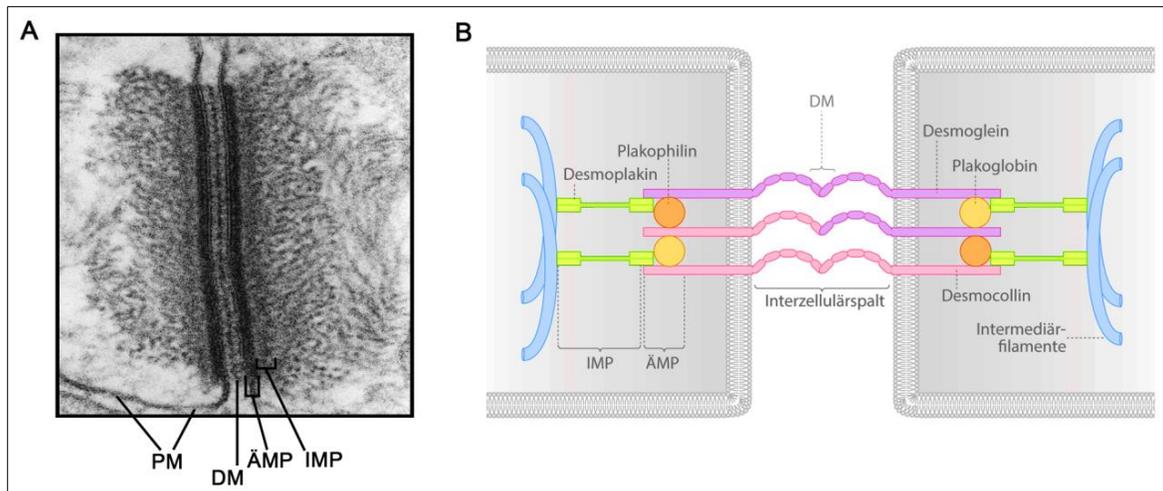


Abb. 1: Struktur der Desmosomen

Elektronenmikroskopische Aufnahme (A) und schematische Darstellung (B) eines Desmosoms. Die desmosomalen Cadherine (Desmogleine und Desmocolline) überbrücken den Interzellulärspalt zwischen den Plasmamembranen (PM) und interagieren mit ihren Extrazellulärdomänen an der elektronenmikroskopisch dichten Mittellinie (DM). Intrazellulär sind die Adhäsionsmoleküle in der dichteren äußeren Membranplaque (ÄMP) über die Plaquelproteine Plakoglobin und Plakophilin an Desmoplakin gekoppelt. In der inneren Membranplaque (IMP) strahlt das Intermediärfilamentsystem in das Desmosom ein und wird über Desmoplakin verankert. [Bilder modifiziert nach Dusek et al., 2007 (A) und Waschke und Spindler, 2014 (B).]

DSGs und DSCs vermitteln durch Bindungen ihrer jeweils gegenüberliegenden Extrazellulärdomänen die desmosomale Zell-Zell-Haftung über den Interzellulärspalt hinweg, wobei noch nicht abschließend geklärt werden konnte, ob dies hauptsächlich über hetero- oder homophile Bindungsmechanismen erfolgt (Harrison et al., 2016; Vielmuth et al., 2018). Neben der Zell-Zell-Haftung scheinen desmosomale Cadherine auch eine wichtige Rolle bei der Regulation physiologischer Prozesse wie der Zelldifferenzierung zu spielen (Broussard et al., 2015). Außerdem können sie außerhalb von Desmosomen, auch

„extradesmosomal“ genannt, vorkommen. Hier dienen sie vermutlich als eine Art Rezeptor der Signalübertragung zur Regulation der Zell-Zell-Haftung (Waschke und Spindler, 2014).

Über ihre intrazellulären Anteile sind die desmosomalen Cadherine an der desmosomalen Plaque, die sich aus den beiden Gruppen der Armadilloproteine und Plakine zusammensetzt, verankert. PG, auch „ $\gamma$ -Catenin“ genannt, ist neben Desmosomen auch in Adhärensjunktionen zu finden. Es ist aus 12 Armadillo (ARM)-Domänen sowie einer C- und N-terminalen Domäne aufgebaut und vermittelt in Desmosomen die Bindung des C-terminalen Endes der Adhäsionsmoleküle an Desmoplakin (DP) (Delva et al., 2009). Neben seiner Funktion zur Aufrechterhaltung der Zellkohäsion scheint PG eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung des Herzens zu spielen. Außerdem kann PG ähnlich wie  $\beta$ -Catenin ( $\beta$ CAT), auch als „Catenin- $\beta$ 1“ bezeichnet, ein Plaqueprotein der Adhärensjunktionen, in den Zellkern translozieren und dort als Co-Transkriptionsfaktor und Regulator verschiedener Signalwege fungieren (Garcia-Gras et al., 2006; Aktary et al., 2017).

Als weiteres Mitglied der Armadillo-Gruppe kommen PKPs in Desmosomen vor. Ähnlich wie für DSGs und DSCs beschrieben, werden die PKP-Isoformen 1 - 3 gewebespezifisch exprimiert. So ist PKP2, ähnlich wie DSG2 und DSC2, im Herzen, in einfachen Epithelien und Plattenepithelien zu finden, während PKP1 und PKP3 vor allem in mehrschichtigen Plattenepithelien und teilweise einfachen Epithelien exprimiert wird. Im Gegensatz zu PG bestehen PKPs aus 9 ARM-Domänen mit einem zusätzlichen Segment, das zu einer Knickbildung zwischen ARM-Domäne 5 und 6 führt. Funktionell wird angenommen, dass PKPs für die laterale Vernetzung und Organisation der desmosomalen Plaqueproteine, besonders von DP, wichtig sind (Hatzfeld, 2007).

DP gehört zur Proteingruppe der Plakine und gilt als charakteristisches Molekül der Desmosomen, was sich auch im Namen widerspiegelt. Durch alternatives Spleißen kann das Protein in verschiedenen Isoformen (Major-Isoform I und II und Minor-Isoform Ia) vorliegen. Es besteht aus einem N-terminalen Kopf, gefolgt von einem  $\alpha$ -helikal gedrehten Segment und drei Plakindomänen. Als essentielles Protein der desmosomalen Haftung

koppelt DP die desmosomalen Proteine an das gewebespezifische Intermediärfilamentsystem, wobei Desmin das vorkommende Intermediärfilament in Kardiomyozyten ist (Delva et al., 2009; Cabral et al., 2010).

Neben ihrer bekannten Funktion für die Stabilisierung der Zell-Zell-Haftung dienen desmosomale Moleküle außerdem als eine Art Plattform (engl.: „Signaling hub“) für unterschiedliche Signalmoleküle wie die Proteinkinase  $C\alpha$  (PKC $\alpha$ ), die Tyrosinkinase Src oder die Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38. Dies scheint wichtig für die Regulation der Zell-Zell-Haftung und Migration zu sein (Waschke und Spindler, 2014; Rotzer et al., 2015).

Für Desmosomen wurde zusätzlich ein für Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Kontakte bisher unbekanntes Phänomen, die sogenannte „Hyperadhäsion“, beschrieben (Garrod und Kimura, 2008). Hierbei wird angenommen, dass es zu einer qualitativen Änderung der interzellulären Haftung kommt, bei der die eigentlich  $Ca^{2+}$ -abhängigen desmosomalen Cadherine trotz  $Ca^{2+}$ -Entzug aneinander binden können. Diese  $Ca^{2+}$ -Insensitivität scheint wichtig für eine stabile Haftung in intaktem Gewebe zu sein. Während der Wundheilung findet hingegen ein Wechsel zur  $Ca^{2+}$ -Abhängigkeit der desmosomalen Cadherine statt (Garrod und Taberner, 2014). Die genaue Bedeutung und die zugrundeliegenden Mechanismen dieses Phänomens sind jedoch noch größtenteils unklar.

Die Relevanz und Funktion von Desmosomen in den unterschiedlichen Geweben wird besonders durch die zahlreichen Erkrankungen deutlich, bei denen Störungen von desmosomalen Proteinen ursächlich für die Pathogenese sind. So können Infektionen mit *Staphylokokkus aureus* durch eine Exfoliatin-vermittelte Spaltung von DSG1 zu Dermatitis exfoliativa neonatorum Ritter von Rittershain (engl.: „Staphylococcal scalded skin syndrome“) oder Impetigo contagiosa führen, welche beide durch eine großflächige Blasenbildung bis hin zur Ablösung der Epidermis charakterisiert sind (Waschke, 2008). Ähnliche Symptome sind auch bei der Autoimmunerkrankung Pemphigus zu finden. Hier kommt es je nach Subtyp durch die Bindung von Autoantikörpern an DSG1 und/oder DSG3 zur Blasenbildung in mehrschichtigen Plattenepithelien wie der Epidermis oder der Mundschleimhaut. Auch bei zahlreichen malignen Erkrankungen wurden Veränderungen

in der Expression von desmosomalen Proteinen gefunden, die mit einer erhöhten Tumoraggressivität und schlechteren Prognose in Verbindung zu stehen scheinen (Waschke, 2008; Celentano und Cirillo, 2017). Außerdem existieren eine Vielzahl von genetischen Erkrankungen, bei denen Mutationen in Genen von desmosomalen Proteinen vor allem das Herz und die Haut betreffen. So können Mutationen im DSG1- oder DP-Gen Keratosis palmoplantaris striata auslösen, die durch Verdickungen der Epidermis an Handflächen und Fußsohlen gekennzeichnet ist. Eine solche palmoplantare Keratose kann bei spezifischen Mutationen im DP-Gen auch in Kombination mit wolligem Haar und dilatativer Kardiomyopathie auftreten, was als „Carvajal-Krankheit“ bezeichnet wird. Auch eine Kombination einer palmoplantaren Keratose mit arrhythmogener Kardiomyopathie, ausgelöst durch bestimmte Mutationen im PG-Gen, wurde unter dem Namen „Naxos-Krankheit“ beschrieben. Arrhythmogene Kardiomyopathie wiederum kann durch Mutationen aller im Herzen vorkommenden desmosomalen Komponenten ausgelöst werden (Waschke, 2008; Broussard et al., 2015; Corrado et al., 2017).

### **1.2.2. Adhärensjunktionen**

Zusätzlich zu Desmosomen finden sich im Glanzstreifen auch Adhärensjunktionen, die hier als „Fascia adherens“ bezeichnet werden. Unterschiedliche Formen der Adhärensjunktionen sind in allen Geweben - von Epithel, Endothel, Myokard bis hin zu Nervengewebe - zu finden. Ähnlich wie Desmosomen bestehen sie aus einer Proteinplaque, an der Cadherine zur Vermittlung der Zell-Zell-Haftung befestigt sind. Im Gegensatz zu Desmosomen sind Adhärensjunktionen an das Aktinfilament-System, das im Herzen die Sarkomere aufbaut, gekoppelt (Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012). Klassische Cadherine, deren Vertreter N-Cadherin (NCAD), auch als „Cadherin-2“ bezeichnet, in Kardiomyozyten exprimiert wird, vermitteln durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Bindung ihrer Extrazellulärdomänen die Zell-Zell-Haftung und interagieren intrazellulär mit Vertretern der Armadilloproteine wie  $\beta$ -Catenin oder PG, Proteinen aus der Gruppe der  $\alpha$ -Cateninen und über weitere Aktin-bindende Proteine mit filamentärem Aktin (F-Aktin) (Meng und Takeichi, 2009; Vite und Radice, 2014; Cadwell et al., 2016).

### 1.2.3. Gap Junctions

Gap Junctions, auch „Nexus“ genannt, sind wichtig für die elektrische und chemische Kopplung von Zellen allgemein und speziell im Myokard. Sie bestehen jeweils aus zwei Connexonen, wobei ein Connexon aus jeweils sechs Connexinen besteht, die zirkulär angeordnet sind. Im Arbeitsmyokard wird vor allem Connexin-43 (CX43) exprimiert. Durch Zusammenlagerung von zwei Connexonen, die jeweils in der Plasmamembran von zwei benachbarten Zellen lokalisiert sind, entsteht ein Kanal, über den Ionen und kleine Moleküle bis zu einer Größe von 1 kDa zwischen den Zellen diffundieren können (Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012; Nielsen et al., 2012). Die Konformation der Gap Junctions kann dynamisch verändert werden, um die Weite und Permeabilität der Pore zu regulieren. So führen beispielsweise erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel oder eine Verringerung des pH-Wertes zu einer Verengung des Porendurchmessers und einer Verringerung der Leitfähigkeit zwischen den Zellen. Außerdem kann die Höhe des transmembranären Potentials die Leitfähigkeit der Gap Junctions regulieren (Nielsen et al., 2012). So werden elektrische Ströme, die im Herzen zur Induktion der Kontraktion benötigt werden über Gap Junctions weitergeleitet oder kleine Moleküle zur Aktivierung bestimmter Signalwege ausgetauscht (Kumar und Gilula, 1996; Stroemlund et al., 2015).

### 1.2.4. Area composita und Connexom

Der Glanzstreifen ist sowohl aus Desmosomen, Adhärensjunktionen als auch Gap Junctions aufgebaut. Aufgrund erster elektronenmikroskopischer Untersuchungen wurde angenommen, dass, ähnlich wie in polarisierten Epithelien, die drei Kontakttypen separat voneinander am Glanzstreifen vorliegen (Severs, 1985; Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012). In genaueren Analysen wurde jedoch 2006 mit Hilfe der Immunelektronenmikroskopie gezeigt, dass desmosomale Proteine wie DP, DSG2, PKP2 oder DSC2 auch an den morphologisch wie Adhärensjunktionen erscheinenden Zell-Zell-Kontakten zu finden sind. Es wurde daraus geschlossen, dass die zwei Typen der Haftkontakte im Herzen nicht separiert, sondern in den meisten Abschnitten gemischt als sogenannte „Area composita“ vorliegen (Abb. 2) (Borrmann et al., 2006; Franke et al.,

2006). Mittlerweile ist aus biochemischen Untersuchungen bekannt, dass Interaktionen und Abhängigkeiten zwischen den einzelnen Komponenten des Glanzstreifens bestehen. So interagiert PKP2 mit CX43 (Sato et al., 2011; Agullo-Pascual et al., 2013) und  $\alpha$ T-Catenin ( $\alpha$ TCAT), auch „Catenin- $\alpha$ 3“ genannt (Goossens et al., 2007), sowie DSC2 mit CX43 (Gehmlich et al., 2011). Auch eine Interaktion von DSG2 mit der Natriumkanal-Untereinheit  $\text{Na}_v1.5$  konnte nachgewiesen werden (Rizzo et al., 2012). Außerdem beeinflussen sich die einzelnen Komponenten gegenseitig in ihrer Funktion. So führte eine Reduktion oder Mutation von desmosomalen Proteinen wie DP, PKP2 oder DSG2 (Sato et al., 2009; Lyon et al., 2014; Kant et al., 2015) aber auch des Adhärensjunktion-Proteins N-Cadherin (Luo und Radice, 2003; Li et al., 2008) zu einer Einschränkung der elektrischen Kopplung mit Verlangsamung der Erregungsüberleitung und Störungen der Connexin-Expression.

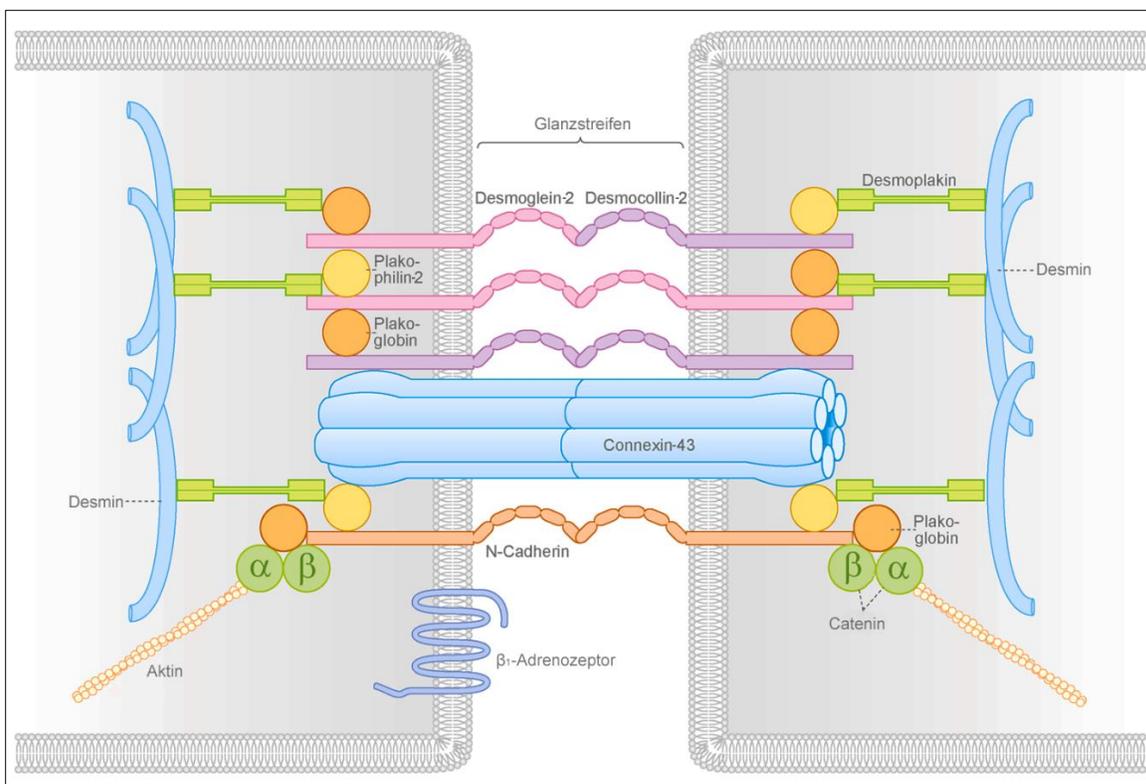


Abb. 2: Aufbau des Glanzstreifens

Schematische Darstellung der Struktur des Glanzstreifens. Die Proteine der Desmosomen und Adhärensjunktionen, die für die mechanische Stabilität verantwortlich sind, liegen vermischt mit Gap Junction-Proteinen als funktionelle Einheit vor. Zusätzlich ist der  $\beta_1$ -Adrenozeptor im Glanzstreifen zu finden. [Bild modifiziert nach Schlipp et al. 2014.]

Außerdem finden sich andere, für die Herzfunktion essentielle, nicht primär junktionale Proteine wie der  $\beta_1$ -Adrenozeptor an den kardialen Zell-Zell-Kontakten (Schlipp et al., 2014). Somit scheint der Glanzstreifen nicht nur eine Summe seiner Einzelkomponenten, sondern vielmehr eine funktionelle Einheit zu sein, deren Integrität und Funktionalität entscheidend für eine suffiziente Herzfunktion ist (Delmar und McKenna, 2010). Für diese Einheit wird auch der Begriff „Connexom“ verwendet (Agullo-Pascual et al., 2014; Delmar et al., 2017).

### **1.3. Arrhythmogene Kardiomyopathie**

Die arrhythmogene Kardiomyopathie ist eine autosomale Erbkrankheit, bei der in der Hälfte der Fälle Mutationen in Genen, die für desmosomale Proteine codieren, identifiziert werden können (Corrado et al., 2017).

Histopathologisch ist die Erkrankung durch einen fortschreitenden Verlust von Kardiomyozyten gekennzeichnet, die in Assoziation mit inflammatorischen Infiltraten durch Binde- und Fettgewebe ersetzt werden (Abb. 3). Da lange Zeit angenommen wurde, dass diese Veränderungen vor allem im rechten Ventrikel auftreten würden, wurde die Erkrankung initial als „arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie“ bezeichnet. Mittlerweile setzt sich die Bezeichnung „arrhythmogene Kardiomyopathie“ allerdings immer mehr durch, da auch Fälle mit biventrikulärer oder sogar linksventrikulärer Dominanz beschrieben wurden (Rizzo et al., 2012).

Bis ins Jugendalter verläuft die Erkrankung meist unauffällig mit keinen bis geringen strukturellen Veränderungen. Zwischen dem zwanzigsten und vierzigsten Lebensjahr wird die arrhythmogene Kardiomyopathie typischerweise mit Palpitationen, Arrhythmien, Synkopen, vor allem nach körperlicher Belastung, bis hin zum plötzlichen Herztod als Erstmanifestation klinisch apparent (Marcus et al., 2009; Protonotarios et al., 2016). Besonders körperliche Anstrengung mit Aktivierung des Sympathikus scheint die Arrhythmien auszulösen bzw. verschlimmern zu können und erhöht das Risiko für einen spontanen Herzstillstand. So ist die arrhythmogene Kardiomyopathie ein Hauptgrund für

plötzlichen Herztod bei jungen athletischen Menschen (Thiene et al., 1988; Denis et al., 2014).

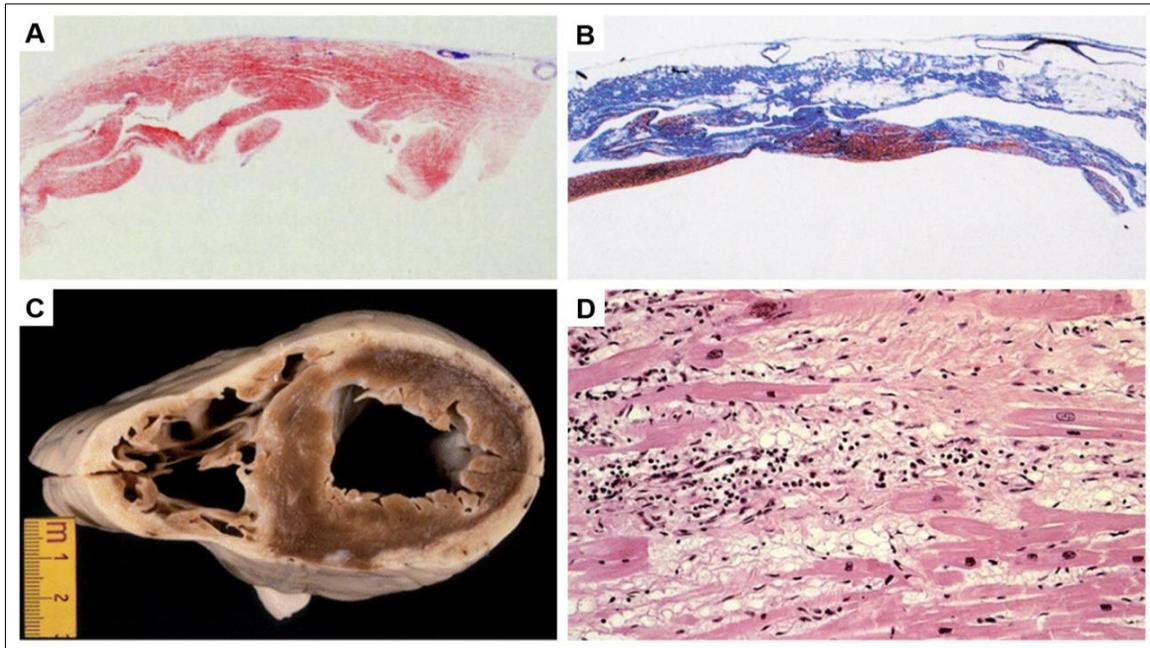


Abb. 3: Histopathologie der arrhythmogenen Kardiomyopathie

Im Vergleich zum Azan-gefärbten Schnitt eines gesunden Herzens (A) ist bei einem Patienten mit arrhythmogener Kardiomyopathie (B) der Verlust von Kardiomyozyten (rötlich gefärbt) und die Substitution durch fibrotisches Bindegewebe (blau gefärbt) sowie Fettzellen (erscheinen weiß) deutlich erkennbar. Makroskopisch ist ein fettgewebig-fibrotischer Umbau der Wände beider Ventrikel sichtbar (C). In der HE-Färbung ist die Nekrose der Kardiomyozyten mit polymorphen Entzündungsinfiltraten und frühen binde- und fettgewebigen Umbauten assoziiert (D). [Bilder modifiziert nach Corrado et al., 2017 (A, B) und Rizzo et al., 2012 (C, D).]

In Deutschland beträgt die Prävalenz der arrhythmogenen Kardiomyopathie 1 in 2.000 Personen, weltweit 1 in 5.000 Personen, wobei bei 50 % der Neudiagnosen eine positive Familienanamnese nachgewiesen werden kann. In ungefähr der Hälfte aller Fälle können Mutationen in Genen desmosomaler Proteine identifiziert werden. Am häufigsten ist PKP2 (10 – 45 % der Patienten), gefolgt von DP (10 – 15 %), DSG2 (7 – 10 %), DSC2 (2 %) und PG (1%) betroffen. Außerdem können auch Mutationen in mehreren desmosomalen Genen gleichzeitig vorkommen (Corrado et al., 2017).

Pathomechanistisch wird vermutet, dass es durch eine gestörte Funktion der desmosomalen Proteine zu einer verminderten Zell-Zell-Haftung mit Loslösung von

Kardiomyozyten aus dem Zellverband und anschließendem Zelltod mit fibrotischen Umbauten kommt. Dies scheint durch körperliche Anstrengung mit Erhöhung des ventrikulären Drucks und Wandbelastung noch verschlimmert zu werden (La Gerche et al., 2011). Möglicherweise kommt es durch die Myokardnarben dann sekundär zu Störungen in der Erregungsweiterleitung mit Herzrhythmusstörungen im Sinne einer Reentry-Tachykardie (Fontaine et al., 1984). Auf der anderen Seite konnten Arrhythmien und Veränderungen in der Morphologie und Funktion von Gap Junctions schon bereits vor strukturellen Veränderungen detektiert werden, sodass auch eine direkte Beeinträchtigung der elektrischen Kopplung und Erregungsweiterleitung durch die gestörte interzelluläre Haftung als Pathomechanismus denkbar ist (Kaplan et al., 2004; Rizzo et al., 2012; Cerrone et al., 2017). Zusätzlich scheint die Inhibition des kanonischen Wnt- $\beta$ -Catenin-Signalwegs durch nukleär transloziertes PG eine Rolle bei der fibrotisch-fettgewebigen Umwandlung des Gewebes zu spielen (Garcia-Gras et al., 2006).

Aufgrund eines Mangels an kausalen Therapien zielen die aktuellen therapeutischen Optionen auf eine Herauszögerung der Erkrankung mit Symptom- und Lebensqualitätsverbesserung ab. So stellen  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten ( $\beta$ -Blocker) und die Restriktion sportlicher Aktivitäten zur Vorbeugung von Arrhythmien die Standardtherapie bei betroffenen Patienten dar. Als Antiarrhythmikum kommt zusätzlich Amiodaron zum Einsatz. Palliativ können Katheterablationen mit Ausschaltung arrhythmischer Bereiche erwogen werden. Die Implantation eines Defibrillators kann bei Auftreten von ventrikulären Tachykardien oder Kammerflimmern lebensrettend sein. Als Ultima Ratio bei nicht-behandelbaren Arrhythmien stellt die Herztransplantation die einzige kausale Therapie dar (Corrado et al., 2017).

#### **1.4. Regulation der Herzfunktion durch das sympathische Nervensystem**

Das sympathische Nervensystem, auch „Sympathikus“ genannt, bildet zusammen mit dem parasympathischen Nervensystem („Parasympathikus“) und dem enteralen Nervensystem den viszeromotorischen Teil des vegetativen Nervensystems. Sympathikus und Parasympathikus sind in ihrer Wirkung in vielen Situationen Gegenspieler, um die

Körperfunktionen den entsprechenden Anforderungen anpassen zu können. So führt eine Aktivierung des Sympathikus zur Erhöhung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei regulärer physischer Anstrengung oder auch in Notfallsituationen. Durch adrenale Freisetzung der Botenstoffe Noradrenalin und Adrenalin ins Blut und durch direkte noradrenerge Synapsen der postganglionären sympathischen Neurone mit den Erfolgsorganen wird der Gefäßtonus und Blutdruck erhöht, die Bronchien erweitert, die Schweißproduktion angeregt, die Pupillen erweitert und die Herzaktivität gesteigert. In Ruhephasen ist der Parasympathikus hingegen vermehrt aktiv. (Waschke et al., 2015).

Bei der Anpassung der körperlichen Leistung an eine erhöhte Anstrengung ist die Regulation der Herzfunktion ein essentieller Faktor. Durch Bindung der sympathischen Transmitter Noradrenalin oder Adrenalin an den  $\beta$ -Adrenozeptor wird dieser aktiviert. Im Herzen wird, neben  $\beta_2$  und  $\beta_3$ , zum größten Teil der  $\beta_1$ -Adrenozeptor exprimiert, der an das stimulierende  $G_s$ -Protein gekoppelt ist. Dieses wird nach Aktivierung des  $\beta_1$ -Adrenozeptors in das Zytoplasma freigesetzt und führt zur Aktivierung des Enzyms Adenylylcyclase, das die Umwandlung von Adenosintriphosphat (ATP) zu cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysiert. Als sekundärer Botenstoff (engl.: „Second messenger“) ist cAMP dann für die Signaltransduktion der adrenergen Stimulation in die Zelle verantwortlich (Rockman et al., 2002; Triposkiadis et al., 2009).

So aktiviert cAMP die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), indem je zwei cAMP-Moleküle an die regulatorischen Untereinheiten (Typ I und II mit den Subtypen  $\alpha$  und  $\beta$ ) der heterotetramersch aufgebauten Kinase binden und so zur Dissoziation der regulatorischen Untereinheiten von den beiden katalytischen Untereinheiten (Subtypen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ; PKA $\alpha$ , PKA $\beta$  und PKA $\gamma$ ) führen (Murray, 2008). Diese katalytischen Untereinheiten vermitteln die Phosphorylierung einer Vielzahl von Zielproteinen, die wiederum die positive Chronotropie (Steigerung der Herzfrequenz), Inotropie (Steigerung der Kontraktilität), Lusitropie (erhöhte Relaxation), Dromotropie (verbesserte Erregungsweiterleitung im atrioventrikulären Knoten) und Bathmotropie (herabgesetzte Erregungsschwelle) als die bekannten kardialen Funktionen des Sympathikus induzieren

(Schumann, 1983; Triposkiadis et al., 2009). So führt die Phosphorylierung unter anderem von (1) L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und des Ryanodinrezeptors zu einem Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ , von (2) Phospholamban zu einer erhöhten Wiederaufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in das sarkoplasmatische Retikulum, von (3) Troponin I und des Myosin-bindenden Proteins C zur Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität und Relaxationsfähigkeit der Myosinfilamente und von (4) Phospholemman zur Stimulation der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase und zur verbesserten Repolarisation und Relaxation der Zelle (Triposkiadis et al., 2009; Lymperopoulos et al., 2013). Außerdem konnte gezeigt werden, dass es durch Erhöhung der cAMP-Spiegel zu einer vermehrten Expression von Gap Junction-Proteinen mit einer Zunahme der Überleitungsgeschwindigkeit der elektrischen Erregung kommt (Darrow et al., 1996; Somekawa et al., 2005). Diese Effekte der adrenergen Stimulation führen zusammen durch eine Erhöhung Kontraktionskraft und Herzfrequenz zu einer Steigerung der Herzleistung.

Auch therapeutisch spielt die Regulation der adrenergen Signalwege im Herzen eine wichtige Rolle, um die Herzfunktion entsprechend an die pathologische Situation mit z.B. geschwächtem Herzgewebe anzupassen. So sind, wie bereits oben erwähnt,  $\beta$ -Blocker die Standardtherapie bei arrhythmogener Kardiomyopathie. Außerdem sind sie die Erstlinientherapie unter anderem bei koronarer Herzerkrankung inklusive akutem Koronarsyndrom, supraventrikulären Herzrhythmusstörungen, Bluthochdruck und akuter sowie chronischer Herzinsuffizienz (Lopez-Sendon et al., 2004; Mancia et al., 2013; Ponikowski et al., 2016). Umgekehrt spielt die Aktivierung des Sympathikus durch Adrenalin oder Sympathomimetika in der Notfallmedizin eine wichtige Rolle bei der Reanimation und zur Behandlung von unterschiedlichen Schockzuständen (De Backer, 2011; Singletary et al., 2015; Soar et al., 2015). Dies verdeutlicht die vielschichtige Bedeutung der Regulation der Herzfunktion durch adrenerge Stimulation unter physiologischen sowie pathologischen Bedingungen.

### **1.5. Fragestellung**

Die elektrische und mechanische Kopplung von Kardiomyozyten ist für die strukturelle und funktionelle Integrität des Herzens unverzichtbar. Dies wird in den Glanzstreifen durch eine funktionelle Einheit aus Desmosomen, Adhärensjunktionen und Gap Junctions gewährleistet (Patel und Green, 2014). Mutationen in desmosomalen Genen führen zu arrhythmogener Kardiomyopathie, was die Relevanz der Desmosomen für eine suffiziente Herzfunktion verdeutlicht (Corrado et al., 2017).

Der Sympathikus ist ein essentieller Regulator der Herzfunktion und spielt sowohl physiologisch als auch pathologisch eine zentrale Rolle (Triposkiadis et al., 2009). Durch eine erhöhte Kontraktilität, die durch adrenerge Stimulation induziert wird, werden auch die Zell-Zell-Kontakte vermehrt mechanisch belastet. Eine Regulation der Zell-Zell-Haftung im Herzen durch sympathische Aktivierung war jedoch vor Beginn dieser Studie unbekannt. Daher wird hier untersucht, ob die interzellulären Kontakte von Kardiomyozyten durch adrenerge Stimulation beeinflusst werden können und so eine Regulation der Glanzstreifen durch den Sympathikus mit Anpassung an die erhöhte Belastung stattfindet.

## **2. Material und Methoden**

Falls nicht gesondert im Text genannt, sind die Hersteller der entsprechenden Chemikalien im Anhang unter 7.2. in Tab. 8 angegeben. Die Hersteller der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sind im Anhang unter 7.3. in Tab. 9 und Tab. 10 aufgelistet.

### **2.1. Modelle**

#### **2.1.1. HL-1-Kardiomyozyten-Kultur**

Die Kardiomyozyten-Zelllinie HL-1 wurde aus einer virus-induzierten, rechts-atrialen murinen Tumorzelllinie isoliert (Claycomb et al., 1998). Diese adhärenzte Kardiomyozyten-Zelllinie weist einen differenzierten kardialen Phänotyp auf, proliferiert, ist gut kultivierbar, exprimiert, soweit bekannt, Kardiomyozyten-typische Proteine und hat die Fähigkeit, spontan Erregungen zu generieren und zu kontrahieren (White et al., 2004). Die verwendeten HL-1-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Claycomb (Louisiana State University, Health Sciences Center, New Orleans, USA) übersandt und nach Angaben von Prof. Claycomb in HL-1-Medium (Tab. 6) unter sterilen Bedingungen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95% Raumluft und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Das Medium wurde täglich gewechselt und die Zellen nach Erreichen von 100 % Konfluenz zwei Mal pro Woche geteilt. Hierfür wurden die Zellen einmalig mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) (Tab. 6) 37 °C gewaschen und in Trypsin/ Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Tab. 6) für 5 - 10 min bei 37 °C bis zum vollständigen Ablösen der Zellen vom Gefäßboden inkubiert. Nach Zugabe von HL-1-Waschmedium (Tab. 6) zum Abstoppen der Trypsin-Enzymreaktion und nach Resuspension der Zellen wurde die Zelllösung in ein Zentrifugationsgefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 500 G über 3 min und Absaugen des Überstandes wurde der Rückstand in HL-1-Medium resuspendiert und die Zellkonzentration mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Aussaat erfolgte zur weiteren Kultivierung der Zellen auf T75-Flaschen, zur Durchführung von Experimenten je nach Versuchsaufbau in Zellkulturplatten mit 24 oder 6 Vertiefungen mit oder ohne Deckgläschen oder in T75-Flaschen. Die Oberflächen aller Kulturgefäße wurden zur besseren Adhäsion der Zellen mit Fibronectin/

Gelatine-Lösung (Tab. 6) für 1 h bei Raumtemperatur beschichtet, die vor Zugabe der Zelllösung abgesaugt wurde. Bei weiterer Kultivierung der Zellen wurde 100 µmol/l Noradrenalin (10 mmol/l Noradrenalin-Lösung, siehe Tab. 6, 1:100) zum HL-1-Medium zugefügt. Nach Aussaat der HL-1-Zellen für Experimente wurde eine Inkubation in HL-1-Medium ohne Noradrenalin durchgeführt, um eine basale adrenerge Aktivierung zu vermeiden. Außerdem wurde zusätzlich 1,8 mmol/l  $\text{Ca}^{2+}$  (100 mmol/l  $\text{CaCl}_2$ -Lösung in PBS, 1:55,55) hinzugefügt, um eine suffiziente Bindung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Cadherine zu gewährleisten. Falls nicht anders beschrieben, erfolgte die Inkubation der für Experimente ausgesäten Zellen über 7 Tage.

### 2.1.2. Herzspezifische Plakoglobin-Knockout-Mauslinie

Da eine generelle PG-Defizienz embryonal letal ist (Bierkamp et al., 1996), wurde mit Hilfe des Cre/loxP-Systems (Kuhn und Torres, 2002) eine herzspezifische Knockout-Mauslinie für PG (PG-KO) generiert. *Jup<sup>tm1.1Glr</sup>/J*-Mäuse (Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA), deren Exon 1 des Gens für PG (*Jup*) homozygot von loxP-Sequenzen flankiert (eng.: „flanked by loxP“; flox) war, wurden mit B6.FVB-Tg(*Myh6-Cre*) 2182Mds/J-Mäusen (Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA), die heterozygot die Rekombinase Cre (Genbezeichnung: *Cre*) in Abhängigkeit vom Gen der schweren Kette des Myosin- $\alpha$  (*Myh6*) exprimieren, gekreuzt, um Tiere mit heterozygoter PG-Defizienz (Genotyp: *Jup<sup>flox/+</sup>, Cre* positiv) zu erhalten. Durch Kreuzung dieser Tiere mit *Jup<sup>tm1.1Glr</sup>/J*-Mäusen wurden homozygote PG-KO-Tiere (Genotyp: *Jup<sup>flox/flox</sup>, Cre* positiv) generiert. Der Genotyp jeder Maus wurde in der institutsinternen Genotypisierungseinheit mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion im Alter von 10 Tagen für *Jup* und *Cre* bestimmt. Als Kontrolle zu den PG-KO-Mäusen wurden phänotypische Wildtyp (WT)-Geschwistertiere (*Cre* negativ) desselben Wurfes verwendet. Die Haltung und Tötung der Mäuse erfolgte in Übereinstimmung mit den Leitlinien zur wissenschaftlichen Tiernutzung der Europäischen Kommission und lokalen universitären Regularien.

### 2.1.3. Murine Herzschnittkultur

Um die Wirkung verschiedener Mediatoren auf Gewebe aus demselben Herzen untersuchen zu können, wurden murine Herzschnittkulturen analog zu einem für humane Herzschnitte publizierten Protokoll (Brandenburger et al., 2012) hergestellt. Je nach Experiment wurden 10 - 12 Wochen alte, genetisch unveränderte BALB/cJ-Mäuse (Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) oder 14 Tage alte PG-KO-Mäuse mit WT-Geschwistertier verwendet. Die Haltung und Tötung der Mäuse erfolgte in Übereinstimmung mit den Leitlinien zur wissenschaftlichen Tiernutzung der Europäischen Kommission und lokalen universitären Regularien. Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet, das Herz präpariert, in 4 °C kalten, oxygenierten, kardioplegen Schneidepuffer (Tab. 6) transferiert und darin die Vorhöfe entfernt. Anschließend wurde das Herz in 4 % (w/v) bei niedriger Temperatur schmelzender, in Schneidepuffer gelöster Agarose bei 37 °C eingebettet und bis zum Aushärten der Agarose auf Eis gelagert. Der Schneidvorgang erfolgte mit Hilfe eines Leica VT1200S Vibratoms in eiskaltem Schneidepuffer mit 10 mmol/l D-Glukose bei einer Klängenamplitude von 1 mm und einer Vorschubgeschwindigkeit von 0,07 mm/s. Zur anschließenden Durchführung einer Immunfluoreszenzdarstellung oder Western Blot-Analyse wurden 300 µm dicke Schnitte auf Membranen (0,4 µm Porengröße) in sterilen Zellkulturplatten-Einsätzen transferiert und an der Luft-Medium-Grenze in Herzschnitt-Medium (Tab. 6) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Raumluft und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % inkubiert und, wie jeweils angegeben, behandelt. Nach einem Waschschrift in PBS (Tab. 6) wurden die Schnitte für Immunfluoreszenzdarstellung in Kryo-Einfriermedium in flüssigem Stickstoff schockgefroren und, wie unter 2.2.4. beschrieben, weiterverarbeitet. Für Western Blot-Analysen wurden die Schnitte mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten, in SDS-Lysepuffer (Tab. 6) lysiert und, wie unter 2.2.6. und 2.2.7. dargelegt, weiterverarbeitet. Zur Durchführung von *ex vivo*-Dissoziationsversuchen wurden von den Ventrikeln 200 µm dicke Schnitte angefertigt und, wie unter 2.2.13.2. beschrieben, weiterbehandelt.

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Zelltransfektion mit Plasmiden

Um ein spezifisches Protein zu exprimieren, wurde die entsprechende Desoxyribonukleinsäure (DNA) als Plasmid mittels Lipofektion in die Zelle eingebracht. Hierbei wurden die gewünschten Plasmide in Vesikel verpackt, die dann mit der Plasmamembran verschmelzen konnten und so die DNA in die Zelle transferiert werden konnte (Kaestner et al., 2015). Dazu wurden HL-1-Zellen in die entsprechenden Zellkulturgefäße ausgesät und nach Anwachsen der Zellen bei 60 – 70 % Konfluenz mit DNA-Transfektionsansatz (Pro ml Medium: 50 µl OptiMEM, 6 µl FuGENE HD und 2 µg Plasmid-DNA [siehe Tab. 1]) nach Herstellerangaben behandelt und für 24 h inkubiert. Das entsprechende Experiment wurde 48 - 72 h nach Transfektion ausgeführt. Die erfolgreiche Transfektion wurde für alle Experimente entweder durch das Fluoreszenzsignal des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) der Fusionsproteine oder durch Western Blot-Analysen (2.2.7.) verifiziert.

Tab. 1: Verwendete Plasmide

Name	Quelle	Spezies	Ausgangsplasmid	Markierung
DSG2-GFP	Katja Gehmlich, British Heart Foundation Centre of Research Excellence, University of Oxford, UK	Mensch	pEGFP-N1	GFP, C-terminal
PG-GFP-WT	Mariya Radeva, Anatomische Anstalt, Ludwig-Maximilians-		pDest-EGFP-N1	GFP, C-terminal
PG-GFP-S665A*	Universität, München			
PG-GST-S665A*				
PG-GST-WT	Ritva Tikkanen, Biochemisches Institut, Justus-Liebig-Universität, Gießen		pGEX-4T-1	Glutathion-S-Transferase (GST), C-terminal

\*Serin (S), Alanin (A).

Alle Plasmide wurden Endotoxin-frei aufgereinigt und mittels DNA-Sequenzierung validiert.

Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz für Dissoziationsversuche wurden HL-1-Zellen mit Hilfe von Elektroporation (4D-Nucleofector) nach Herstellerangaben transfiziert. Konfluente HL-1-Zellen wurden einmal mit PBS (Tab. 6) gewaschen und bis zum Ablösen der Zellen mit Trypsin/EDTA (Tab. 6) bei 37 °C behandelt. Zum Abstoppen der Enzymreaktion wurde HL-1-Waschmedium (Tab. 6) zugegeben, die Zellen resuspendiert und die Zellanzahl pro ml mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Je  $3,8 \times 10^7$  Zellen wurden in ein Zentrifugationsgefäß überführt und bei 500 G für 3 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde der Rückstand in 100 µl Amaxa SF-Lösung mit 10 µg Plasmid-DNA resuspendiert und mit dem gerätespezifischen Puls EN150 elektroporiert. Hierbei werden durch kurze Änderungen des elektrischen Potentials die physikalischen Eigenschaften der Plasmamembran so verändert, dass Poren entstehen, durch die extrazelluläres Material wie die zugegebene DNA in die Zelle bis in den Zellkern gelangen kann (Kaestner et al., 2015). Die Aussaat erfolgte anschließend in HL-1-Medium ohne Noradrenalin und  $\text{Ca}^{2+}$ . Nach 24 h Inkubation wurde das Medium auf HL-1-Medium ohne Noradrenalin mit 1,8 mmol/l  $\text{Ca}^{2+}$  (100 mmol/l  $\text{CaCl}_2$ -Lösung in PBS, 1:55,55) gewechselt. Das entsprechende Experiment wurde 72 h nach Transfektion ausgeführt. Die erfolgreiche Proteinexpression wurde für alle Experimente durch Western Blot-Analysen (2.2.7.) verifiziert.

### **2.2.2. siRNA-vermittelte Proteinreduktion**

Zur spezifischen Reduktion der Spiegel bestimmter Proteine wurden HL-1-Kardiomyozyten mit entsprechender kleiner eingreifender Ribonukleinsäure (engl.: „Small interfering ribonucleic acid“; siRNA) transfiziert. Hierfür wurden die Zellen in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen ausgesät und bei 60 – 70 % Konfluenz mit siRNA-Transfektionsansatz (Pro ml Medium: 50 µl OptiMEM, 1 µl siRNA [Konzentration 20 µmol/l] und 3 µl RNAiMAX) (Tab. 2) nach Herstellerangaben behandelt und 24 h inkubiert. Das entsprechende Experiment wurde 72 h nach Transfektion ausgeführt. Die erfolgreiche Proteinreduktion wurde für alle Experimente durch Western Blot-Analysen (2.2.7.) verifiziert.

Tab. 2: Verwendete Reagenzien für die Transfektion mit siRNA

Reagenzien	Hersteller	Funktion
„ONTARGET plus SMARTpool“ siRNA L-040316-01-0005, <i>Jup</i> , Maus (siPG)	Dharmacon, Thermo Fisher Scientific, Lafayette, USA	Reduktion des PG-Spiegels
„ONTARGET plus SMARTpool“ siRNA L-047080-00-0005 und L- 042579-00-0005, <i>Pkaca</i> * und <i>Pkacb</i> †, Maus (siPKA)		Reduktion der PKA-Aktivität
„ONTARGET plus non-targeting control pool“ siRNA Kontrolle D- 001810-10-05 (siNT)		siRNA-Kontrolle
OptiMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Transfektionsmedium
RNAiMAX	Life Technologies, Carlsbad, USA	Transfektionsreagenz

\* Gen der PKAC $\alpha$ . † Gen der PKAC $\beta$ .

Zur Identifikation von siRNA-enthaltenden HL-1-Kardiomyozyten während Experimenten mit lebenden Zellen wurde die verwendete siRNA vor Transfektion mittels Silencer-siRNA-Labeling-Kit (Tab. 7), das nach Herstellerangaben verwendet wurde, mit einem Fluorophor markiert.

### 2.2.3. Expression und Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase-fusionierten Proteinen

Zur Herstellung von GST-Fusionsproteinen wurden die entsprechenden Plasmide basierend auf dem pGEX-4T-1-Plasmid (Tab. 1), in dem die korrespondierenden DNA-Sequenzen für PG-WT oder PG-S665A unter Regulation eines Lactose-Operons mit Ampicillin-Resistenz vorlagen (Kurrle et al., 2013; Schinner et al., 2017), in kompetente *Escherichia coli* des Typs Rosetta DE3 (Millipore, Tullagreen, Irland) eingebracht und durch Induktion des Lactose-Operons die bakterielle Expression der entsprechenden Proteine eingeleitet (Harper und Speicher, 2011). Hierfür wurden 200  $\mu$ l der Bakterien mit 200 ng des jeweiligen Plasmids (Tab. 1) versetzt und 1 h auf Eis inkubiert. Dann erfolgte die Transformation mittels

Hitzeschock bei 42 °C für 1,5 min mit anschließender aerober Inkubation in 1 ml lysogener Brühe (LB)-Medium (Tab. 6) bei 37 °C für 1 h. Danach wurden die Bakterien bei 4.500 G für 3 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Anschließend wurden die transformierten Bakterien auf LB-Agarplatten (Tab. 6), die vorher mit Ampicillin (0,1 mg/ml in dest. Wasser) behandelt wurden, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert, sodass nur Bakterien mit dem eingebrachten, Ampicillin-Resistenz-tragenden Plasmid überlebten. Einzelne Kolonien wurden anschließend in je 10 ml LB-Medium mit 0,1 mg/ml Ampicillin überführt und 24 h schüttelnd bei 37 °C kultiviert. Diese Kulturen wurden nochmals in 200 ml LB-Medium mit 0,1 mg/ml Ampicillin 1:20 verdünnt und 13 h schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 300 µmol/l Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) gelöst in dest. Wasser wurde durch Bindung des IPTGs an das Lactose-Operon die Expression der PG-GST-Proteine induziert, die über 24 h bei 22 °C fortgeführt wurde. Anschließend wurden die Bakterien bei 4.000 G für 20 min bei 4 °C zentrifugiert, das Sediment in Bakterien-Lysepuffer (Tab. 6) bei 4 °C lysiert und anschließend zehnmal sonifiziert. Nach Zentrifugation der Lysate bei 14.000 G für 30 min bei 4 °C wurde der Überstand mit Glutathion-gekoppelten magnetischen Mikroperlen (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) für 2 h bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Da Glutathion das Substrat der GST ist, wurden so die im Lysat enthaltenen GST-Proteine an die Mikroperlen gebunden. Durch zwanzigmaliges Waschen in PBS (Tab. 6) mit 0,05 % (v/v) Tween 20 und jeweiliger Separierung der magnetischen Mikroperlen vom Waschpuffer mittels Magneten wurden die GST-Proteine von Lysatbestandteilen und ungebundenen Proteinen getrennt. Die nun gereinigten Proteine wurde durch Inkubation mit Elutionspuffer (Tab. 6), der reduziertes Glutathion im Überschuss enthielt, für 1 h bei 4 °C von den Mikroperlen abgelöst. Das noch enthaltene Glutathion wurde durch Dialyse gegen 50 mmol/l Tris-Pufferlösung (pH 8,0) über 48 h bei 4 °C entfernt. Die Bestimmung der enthaltenen Proteinmenge erfolgte mittels der BCA-Methode wie unter 2.2.6. beschrieben. Die Expression der aufgereinigten PG-GST-Fusionsproteine wurde jeweils mittels Western Blot-Analyse (2.2.7.) bestätigt.

#### 2.2.4. Immunfluoreszenzdarstellung

Zur spezifischen Darstellung der Verteilung von Proteinen in HL-1-Kardiomyozyten sowie in murinem Herzgewebe wurde das Verfahren der Immunfluoreszenzdarstellung angewendet. Hierbei werden Primärantikörper, die Epitope eines spezifischen Proteins erkennen und daran binden, auf die Probe gegeben. Der kristallisierbare Fragment (engl.: „crystallisable fragment“, Fc)-Anteil dieser Antikörper wird wiederum von einem speziesspezifischen Sekundärantikörper, an den ein Fluorophor gekoppelt wurde, erkannt. Durch Anregung mittels Lichts definierter Wellenlänge werden diese Fluorophore in einen höheren Energiezustand versetzt und emittieren beim Zurückspringen in den ursprünglichen Energiezustand Licht mit Fluorophor-spezifischen, energetisch niedrigeren Wellenlängen als das Anregungsspektrum. So emittiert Indocarbocyanin (Cy3) oranges (Emissionsmaximum bei 570nm), Indodicarbocyanin (Cy5) infrarotes (Emissionsmaximum bei 670 nm) und Carbocyanin (Cy2) bzw. ALEXA Fluor 488 grünes (Emissionsmaximum bei 510 nm bzw. 519 nm) Licht (Ernst et al., 1989; Kandela et al., 2007).

HL-1-Zellen wurden in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen auf Deckgläschen ( $\varnothing$  12 mm) ausgesät und bis zu 100 % Konfluenz kultiviert. Nach Inkubation mit den jeweiligen Mediatoren über die jeweils angegebene Zeit, wurden die Zellen mit 37 °C warmen PBS (Tab. 6) gewaschen und mit 2 % Formaldehydlösung (Tab. 6) für 10 min fixiert. Im Falle einer gewünschten Membrandarstellung wurde 20 min vor Fixation zusätzlich 160  $\mu$ mol/l Sulfo-N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Biotin zum Medium hinzugegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Zellpermeabilisierung mit 0,1 % (v/v) Triton-X-100 in PBS für 5 min. Es erfolgte wieder ein dreimaliger PBS-Waschschritt mit anschließender Überführung der Deckgläschen auf Objektträger. Kryo-eingebettetes Herzgewebe, wie unter 2.1.3. und 2.2.15. beschrieben, wurde mittels Kryotom in 10  $\mu$ m dünne Schnitte geschnitten, auf Objektträger aufgebracht und bei 37 °C für 10 min getrocknet. Nach je dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Fixation des Gewebes in 2 % Formaldehydlösung (Tab. 6) für 10 min und die Permeabilisierung mit 1 % (v/v) Triton-X-100 in PBS für 1 h. Um unspezifische Antikörperbindungsstellen abzusättigen, erfolgte

anschließend die Behandlung der HL-1-Zellen und des Herzgewebes mit einer Mischung aus bovinem Serumalbumin (BSA) und normalem Ziegen Serum (engl.: „Normal goat serum“; NGS) (Tab. 6) für 1 h bei Raumtemperatur. Nach Absaugen des BSA/NGS wurden die Proben mit den jeweiligen Primärantikörpern in der entsprechenden Verdünnung (Tab. 3) in PBS über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden ungebundene Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS für je 5 min entfernt und es erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Sekundärantikörpern (Tab. 4) bzw. Phalloidin-ALEXA Fluor 488 zur Anfärbung von F-Aktin für 1 h bei Raumtemperatur. Streptavidin-ALEXA Fluor 488 wurde zur Visualisierung der Biotin-Membranmarkierung benutzt und ebenfalls 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden die Proben mit N-Propylgallat (NPG)-Lösung (Tab. 6), die das Ausbleichen der Probe verhindert (Giloh und Sedat, 1982), eingedeckt. Das Material wurde lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Die Begutachtung und Aufnahme der Proben erfolgte an einem, mit einem 63 x NA 1,4 Ölobjectiv ausgestatteten, Leica SP5 Konfokalmikroskop mit der Software LAS AF 3.3 (Leica, Wetzlar). Alle Aufnahmen eines unabhängigen Versuches wurden in allen Konditionen mit denselben Einstellungen aufgenommen. Zur Auflösungsverbesserung wurden für bestimmte Versuche z-Stapel, also Reihenaufnahmen in z-Richtung an derselben xy-Position, mit einem Abstand der Bilder von je 0,13 µm aufgenommen und diese mit der Software Huygens Essentials 15.05 (Scientific Volume Imaging, Hilversum, Niederlande) dekonvolviert.

Zur Auswertung der Aufnahmen wurden pro unabhängigem Versuch je Kondition Bilder von mindestens drei unterschiedlichen Stellen aufgenommen. Zur Analyse der DSG2-Einzelsignallänge und der Signallänge von DSG2 im Verhältnis zu N-Cadherin wurde die Länge aller DSG2-Signale einer Zelle, die aufgrund der Überlagerung mit dem N-Cadherin-Signal als an den Zellgrenzen lokalisiert angenommen wurden, mittels der Software ImageJ v1.49 (National Institute of Health, Bethesda, USA) vermessen (Abb. 4). Nach Abmessung des N-Cadherin-Signals, das durchgehend an der kompletten Zell-Zell-Kontaktzone zu

finden war und so der Länge der gesamten Zellgrenze entsprach, wurde die entsprechenden Berechnungen, wie in Abb. 4 dargestellt, durchgeführt. In Abb. 23 wurde statt N-Cadherin eine Membranfärbung mittels Biotin zur Bestimmung der Länge der Zellgrenze verwendet.

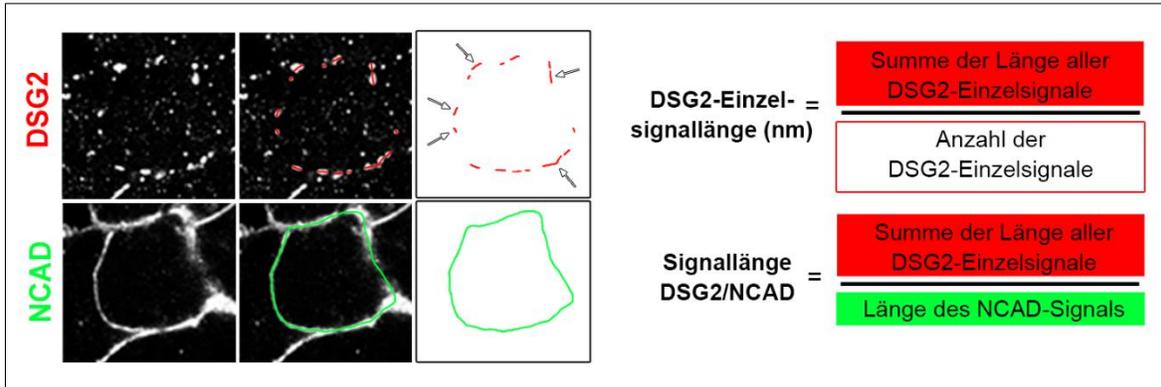


Abb. 4: Schematische Darstellung der Analyse von Immunfluoreszenzdarstellungen in HL-1-Kardiomyozyten

Zur Objektivierung der Veränderung der Verteilung von DSG2 und N-Cadherin in HL-1-Zellen wurden die Einzellängen der DSG2-Signale an den Zellgrenzen gemessen und ins Verhältnis zur Länge der gesamten Zellgrenze, die durch die N-Cadherin-Färbung markiert wurde, gesetzt. Die schwarz umrandeten Pfeile markieren beispielhaft DSG2-Einzelsignale. Die Berechnungen wurden jeweils für die Zell-Zell-Kontaktzone einer ganzen Zelle durchgeführt. [Bild modifiziert nach Schinner et al. 2017.]

Zur Analyse der Signalintensität im Bereich der Glanzstreifen in Gewebeproben wurde mittels Freihand-Zeichenwerkzeug der Software ImageJ v1.49 (National Institute of Health, Bethesda, USA) die Fläche der Glanzstreifen in einem Kanal eng umfahren und dasselbe Areal jeweils in allen gleichzeitig aufgenommenen Farbkanälen gemessen. Die Werte für DSG2 wurden als Quotient der N-Cadherin-Intensität an den Glanzstreifen angegeben. Bei der Auswertung der Immunfluoreszenzdarstellung von PG-KO-Herzen wurde die mittlere Intensität der Signale an Glanzstreifen auf die Werte des jeweiligen WT-Geschwistertieres bezogen.

### 2.2.5. Azan-Färbung

Um den Fibrosierungsgrad in PG-KO- im Vergleich zu WT-Herzen zu untersuchen, wurde eine Azan-Färbung, abgeleitet von den beiden Farbstoffen Azokarmin („Az-“) und

Anilinblau-Orange („-an“), nach Heidenhein durchgeführt. Bei dieser Färbung werden Zellkerne rot, Muskelfasern rotorange und Kollagenfasern blau angefärbt, wodurch sie besonders zur Differenzierung von Binde- und Muskelgewebe geeignet ist.

Zur Durchführung der Färbungen wurden die entsprechenden Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, die Herzen präpariert und umgehend in 2% Formaldehydlösung (Tab. 6) fixiert. Nach Einbettung der Proben in Paraffin mit Hilfe des Einbettautomaten Leica ASP 200S nach Standardprotokoll wurden die Proben in 7 µm dicke Schnitte geschnitten. Zur Färbung der Schnitte erfolgte eine zweimalige Behandlung mit Xylol für je 15 min und anschließend eine Inkubation in absteigender Ethanolreihe mit 100 %, 96 %, 90 % und 70 % (jeweils 100 % Ethanol entsprechend mit dest. Wasser [v/v] verdünnt) für je 5 min. Nach einem Waschschrift in dest. Wasser wurde das Gewebe mit Azokarmin-Lösung (Tab. 6) für 15 min bei 50 °C gefärbt. Nach Spülen in dest. Wasser erfolgte die Differenzierung mittels Anilinalkohol (Tab. 6) für 10 min, gefolgt von der Terminierung der Differenzierung durch die Inkubation in Essigalkohol (Tab. 6) für 5 min. Nach jeweils zwischengeschalteten Waschschriften mit dest. Wasser wurden die Proben erst mit 5 % (w/v) Molybdän-Phosphorsäurehydrat in dest. Wasser für 30 min gebeizt und in Anilinblau-Orange-Lösung (Tab. 6) 5 min gefärbt. Anschließend folgte die Differenzierung der Färbung in 96 % (v/v) Ethanol und danach die abschließende Behandlung mit 100 % Ethanol und zwei Mal Xylol für je 5 min. Die Einbettung erfolgte in DePeX nach Herstellerangaben. Die Schnitte wurden anschließend an einem Leica DMI8-Mikroskop, das mit einem 10 x NA 0,3 Objektiv ausgestattet war, begutachtet und mit Hilfe der Software LAS X 2.0.1 (Leica, Wetzlar) aufgenommen. Für die Analyse des Fibroseanteils und der Hypertrophie der Kardiomyozyten in PG-KO-, verglichen zu WT-Mäusen, wurden je Herz drei Schnitte auf Höhe der Ventrikel randomisiert ausgewählt, aufgenommen und verblindet mit Hilfe der Software ImageJ v1.49 (National Institute of Health, Bethesda, USA) ausgewertet.

### **2.2.6. Proteinquantifizierung**

Um die Proteinkonzentration in Western Blot-Lysaten und die Konzentration aufgereinigter GST-Fusionsproteine zu bestimmen, wurde die Bicinchoninsäure (BCA)-

Proteinquantifizierungsmethode angewendet. Hierfür wurde das Pierce-BCA-Protein-Assay-Kit (Tab. 7) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Bei dieser Methode erfolgt ein kolorimetrischer Proteinnachweis mit Ermittlung der Proteinkonzentration durch die Biuret-Reaktion, bei der im alkalischen Milieu durch Proteine  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduziert wird. In einem zweiten Reaktionsschritt bilden diese Ionen mit der BCA einen violett-gefärbten Komplex, dessen Konzentration mittels Photometer bei 562 nm bestimmt werden kann und linear zur Proteinkonzentration der jeweiligen Probe ist. Zur Bestimmung der absoluten Proteinkonzentration wurde eine separate Standardreihe von 2.000 - 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BSA im jeweiligen Puffer parallel inkubiert.

### **2.2.7. Elektrophorese und Western Blot-Analyse**

Zur semiquantitativen Bestimmung der exprimierten Menge bestimmter Proteine wurde ein kombiniertes Verfahren mit Proteinauftrennung mittels Natriumdodecylsulfat (engl.: „Sodium dodecyl sulfate“)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli (Laemmli, 1970) mit anschließendem Western Blot-Transfer und immunologischer Proteindetektion durchgeführt. Hierzu wurden entsprechend ausgesäte HL-1-Zellen bzw. Herzgewebe mit PBS (Tab. 6) gewaschen und in 4 °C kaltem SDS-Lysepuffer (Tab. 6) mit Proteaseinhibitormischung (Tab. 6) lysiert, gesammelt und sonifiziert. Das enthaltene anionische Detergens SDS führt hierbei durch Anlagerung an die Proteinstruktur zur Auflösung der Quartär-, Tertiär- und teilweise Sekundärstruktur und zur Maskierung unterschiedlicher Ladungen, sodass die Proteine einheitlich negativ geladen vorliegen. Dies ist entscheidend, um später durch Anlegen einer elektrischen Spannung eine Auftrennung der Proteine nach reiner Molekülmasse unabhängig von Ladung und räumlicher Struktur zu erreichen. Die in den einzelnen Lysaten enthaltene Proteinkonzentration wurde, wie unter 2.2.6. beschrieben, mittels BCA-Methode bestimmt. Die Lysate wurden 1:3 mit 3-fachem Lämmli-Puffer (Tab. 6) mit 50 mmol/l Dithiothreitol (DTT) zur Reduktion von Disulfidbrücken versetzt und bei 95 °C für 5 min zur zusätzliche Aufhebung der Quartärstruktur denaturiert. Zur Herstellung von Polyacrylamidgelen wurden die nötigen Komponenten für 7,5 % oder 10 % Polyacrylamid-Trenngele (Tab. 6) gemischt und in den 1

mm breiten Zwischenraum zweier Glasplatten (Bio-Rad, München) gegossen bis ca. 70 % des Zwischenraumes ausgefüllt waren und mit Ammoniumperoxodisulfat (APS) als Initiator und Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator zur Polymerisation gebracht. Anschließend wurde der restliche Spalt mit Sammelgel (Tab. 6) aufgefüllt, ein Kamm mit 10 Zinken für die späteren Taschen eingebracht und die Polymerisation mit APS und TEMED eingeleitet. Die auspolymerisierten Gele wurden in die Halterung einer vertikalen Elektrophoresekammer eingespannt, die Kämmen entfernt und die Kammer mit Elektrophorese-Puffer (Tab. 6) aufgefüllt. Anschließend wurden je gleiche Proteinmengen in die Taschen des Sammelgels gefüllt und mittels einer angelegten Spannung von 80 - 120 V Richtung Anode der Molekülgröße nach aufgetrennt. Bei dieser Methode werden größere Moleküle stärker und damit im Gel oben zurückgehalten, während kleinere Moleküle schneller migrieren und somit im Gel weiter unten zu finden sind. Zur Größenidentifikation wurde bei jedem Gel in mindestens eine Tasche ein Marker mit vorgefärbten Proteinen bekannter Größe (engl.: „Prestained protein ladder“; PPL) aufgetragen. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine bei 350 mA über 1,5 h in Transfer-Puffer (Tab. 6) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die freien Bindungsstellen der Membran wurden im Anschluss mit 5 % (w/v) Magermilch in Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween 20 (TBS-Tween) (Tab. 6) für 1 h auf einem Schüttler abgesättigt. Danach erfolgte die Primärantikörperinkubation in 5 % (w/v) Magermilch in TBS-Tween mit dem entsprechenden Verdünnungsverhältnis (Tab. 3) bei 4 °C auf einem Schüttler über Nacht. Nicht-gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen in TBS-Tween für 5 min auf einem Schüttler entfernt. Ein für die Spezies des Erstantikörpers spezifischer Peroxidase (POX)-gekoppelter Sekundärantikörper (Tab. 4) wurde in TBS-Tween verdünnt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen in TBS-Tween erfolgte die Proteindetektion mittels verstärkter Chemilumineszenz (engl.: „Enhanced chemiluminescence“; ECL [Whitehead et al., 1979]). Dazu wurde die Membran für 1 min in 1:1 gemischter ECL-Lösung I und II (Tab. 6) geschwenkt. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte POX katalysiert dabei die Oxidation von Luminol (aus ECL-Lösung I) durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (aus ECL-Lösung II), was zur Emission

von Licht führt. Dieses Signal wurde durch digitale Chemilumineszenzdetektion aufgenommen und anschließend mittels der Software ImageJ v1.49 (National Institute of Health, Bethesda, USA) analysiert.

#### **2.2.8. Triton-X-100-vermittelte Proteinfractionierung**

Triton-X-100 als neutrales, schwach denaturierendes Detergens, das Membranproteine in ihrer nativen Konformation herauslösen kann, wurde benutzt, um zytoskelettal-gebundene von nicht-zytoskelettal-gebundenen Proteinen zu separieren. HL-1-Zellen wurden auf Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen ausgesät und nach Erreichen von 100 % Konfluenz mit den entsprechenden Mediatoren inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS (Tab. 6) wurden die Zellen für 15 min mit Triton-Puffer (Tab. 6), angereichert mit den Proteaseinhibitoren Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Tab. 6), auf Eis inkubiert. Zur Trennung der Triton-X-100-löslichen und nicht-zytoskelettal-gebundenen von der Triton-X-100-unlöslichen und zytoskelettal-gebundenen Fraktion wurde das aufgenommene Zelllysate bei 14.500 G für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Zentrifugationsüberstand wurde anschließend in ein separates Gefäß überführt, das zurückgebliebene Zellsediment in SDS-Lysepuffer mit Proteaseinhibitormischung (Tab. 6) resuspendiert. Beide Fraktionen wurden sonifiziert und eine Proteinmengenbestimmung mittels der BCA-Methode (2.2.6.) mit den entsprechenden Puffern durchgeführt. Die Elektrophorese und Western Blot-Analyse der einzelnen Proteine erfolgte wie unter 2.2.7. beschrieben.

#### **2.2.9. Analyse von Phosphoproteinen mittels Phos-Tag**

Zur Analyse des Phosphorylierungsstatus verschiedener Proteine wurde das SDS-PAGE-Elektrophoreseverfahren und die Western Blot-Proteinanalyse mit der Phos-Tag-Technologie (Kinoshita et al., 2006) kombiniert. Das Phos-Tag-Reagenz wurde in einer Konzentration von 30 mmol/l zusammen mit 60 mmol/l  $\text{MnCl}_2$  zu einem regulären Trenngel, wie unter 2.2.7. und Tab. 6 beschrieben, zugegeben. Das Sammelgel wurde regulär nach Rezept (Tab. 6) gegossen. Jeweils zwei  $\text{Mn}^{2+}$  bilden mit einem Phos-Tag-

Molekül einen positiv geladenen Komplex und verlangsamten so in der Elektrophorese die Laufgeschwindigkeit von phosphorylierten Proteinen mit negativ geladenen Phosphatresten im Vergleich zu geringer- oder nicht-phosphorylierten Molekülen. Der Grad der Phosphorylierung von Proteinen ist dann als Höhenunterschied der Banden später auf der Membran detektierbar.

Nach der jeweiligen Behandlung wurden HL-1 Zellen mit 4 °C kaltem TBS (Tab. 6) gewaschen und in 1-fachem Lämmli-Puffer (Tab. 6), dem die Proteaseinhibitoren Leupeptin, Pepstatin, Aprotinin, PMSF, eine Phosphataseinhibitormischung (Tab. 6) und 50 mmol/l DTT zugesetzt wurden, lysiert. Die Elektrophorese, der Proteintransfer sowie die Proteindetektion erfolgten wie unter 2.2.7. beschrieben. Zur Entfernung der  $Mn^{2+}$ -Ionen wurde vor dem Proteintransfer ein zweifacher Waschschrift in Transfer-Puffer mit 10 mmol/l EDTA sowie ein zusätzlicher Waschschrift in reinem Transfer-Puffer für je 10 min durchgeführt. Die Proteine wurden auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran, die vorher mit Methanol aktiviert wurde, übertragen.

### **2.2.10. Immunpräzipitation**

Durch Antikörper-vermittelte Immunpräzipitation können Proteine spezifisch aus einem Zellysate aufgereinigt und die Interaktionspartner dieser Moleküle untersucht werden. Dazu wurden HL-1-Zellen in T75-Flaschen bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert, mit eiskaltem PBS (Tab. 6) gewaschen und in IP-Puffer (Tab. 6), substituiert mit Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin, PMSF und Phosphataseinhibitormischung (Tab. 6), für 30 min auf Eis inkubiert, anschließend abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Zellysate wurde durch je zehnmaliges Aufziehen mit einer 20 und 27 Gauge großen Nadel homogenisiert. Jeweils gleiche Lysatmengen wurden mit den entsprechenden Antikörpern gegen die aufzureinigenden Proteine (PG oder DSG2) oder einer Immunglobulin G (IgG)-Fraktion derselben Spezies (Kaninchen für DSG2, Maus für PG) als Kontrolle über Nacht inkubiert, sodass Antikörper-Protein-Komplexe entstehen konnten. Anschließend wurden die Lysate mit in IP-Puffer vorgewaschenen, magnetischen und mit Protein-G-beschichteten Mikroperlen (Dynabeads, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) für 2 h

bei 4 °C rotierend inkubiert, um die entsprechenden Antikörper-Protein-Komplexe über den Fc-Teil des Antikörpers an das Protein G zu koppeln. Nicht an Antikörper gebundene Proteine wurden anschließend durch je zweimaliges Waschen der Dynabeads in Waschpuffer I, dreimaliges Waschen in Waschpuffer II und zweimaliges Waschen in Waschpuffer III (Tab. 6) bei jeweils 4 °C entfernt. Hierbei wurden die Dynabeads nach Resuspension im jeweiligen Waschpuffer mittels eines Magneten an der Seite des Reaktionsgefäßes gesammelt, um ein Absaugen des benutzten Puffers zu ermöglichen. Zur Detektion von Proteininteraktionen wurden die Mikroperlen mit den gebundenen Antikörper-Protein-Komplexen in 3-fachem Lämmli-Puffer (Tab. 6) für 10 min auf 95 °C erhitzt und die so frei gewordenen immunpräzipitierten Proteine mittels Western Blot-Analyse, wie unter 2.2.7. beschrieben, detektiert. Zur Durchführung von massenspektrometrischen Untersuchungen des aufgereinigten Proteins erfolgte statt der Zugabe des Lämmli-Puffers ein zweimaliger Waschschrift in TBS (Tab. 6), um noch vorhandene Detergenzien zu entfernen. Die Proben wurden anschließend im Zentrallabor für Proteinanalytik der LMU (Leitung: Prof. Axel Imhof) von Dr. Andreas Schmidt weiter aufbereitet und massenspektrometrisch untersucht (Schinner et al., 2017).

#### **2.2.11. Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest**

Um die intrazellulären Spiegel des sekundären Botenstoffes cAMP zu messen, wurde ein Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest mit einem Versuchsansatz der Firma Sigma-Aldrich (Tab. 7) nach Herstellerangaben durchgeführt. HL-1-Zellen wurden auf Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen ausgesät und nach Erreichen von 100 % Konfluenz für den jeweils angegebenen Zeitraum mit den entsprechenden Mediatoren inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS (Tab. 6) gewaschen und in 0,1 mol/l HCl in dest. Wasser für 10 min lysiert. Nach Überführung des Lysats in ein Reaktionsgefäß erfolgte die Auftrennung in Überstand mit herausgelöstem cAMP und Sediment mit Zellresten durch Zentrifugation bei 600 G für 10 min. Der Überstand wurde dann für den Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstest verwendet. Hierbei wurden die Proben auf eine Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen, auf deren Boden ein polyklonaler Antikörper gegen cAMP immobilisiert

wurde, zusammen mit cAMP, an das Alkalische Phosphatase gekoppelt wurde, aufgetragen und inkubiert. Während dieser Zeit konkurrieren das cAMP, das in der Probe enthalten ist, und das Enzym-gekoppelte cAMP kompetitiv um die Bindungsstellen des immobilisierten Antikörpers. Nach einem Waschschrift, um ungebundene cAMP-Moleküle zu entfernen, wurde p-Nitrophenylphosphat als Substrat der Alkalischen Phosphatase hinzugegeben. Je nach gebundener Menge von Enzym-gekoppeltem cAMP verfärbt sich die Lösung in unterschiedlicher Intensität gelb. Die Intensität der Färbung verhält sich invers zur cAMP-Konzentration der Probe. Bei einer Wellenlänge von 405 nm konnte die Farbtintensität photometrisch gemessen und die absolute cAMP-Konzentration durch Vergleich mit einer mitgemessenen Standard-Konzentrationsreihe bestimmt werden.

#### **2.2.12. *In vitro*-Kinase-Versuch**

Zur Untersuchung der Phosphorylierbarkeit aufgereinigter PG-GST-Fusionsproteine durch unterschiedliche Kinasen wurde jeweils 20 µg des Proteins mit 2.500 Einheiten der rekombinant hergestellten murinen katalytischen PKA-Untereinheit PKAC $\alpha$  oder 100 ng rekombinanter humaner PKC $\alpha$  mit 40 µmol/l Tetradecanoylphorbol-acetat als PKC-Aktivator in NE-Puffer mit 4 mmol/l ATP sowie Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin und Phosphataseinhibitormischung (Tab. 6) in einem Gesamtvolumen von je 30 µl für 1 h bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion der Enzyme wurde durch Zugabe von 3-fachem Lämmli-Puffer (1:3, Tab. 6) und Aufkochen der Proben bei 95 °C für 5 min terminiert. Die Analyse der stattgefundenen Phosphorylierungen erfolgte mittels Phos-Tag wie unter 2.2.9. beschrieben.

#### **2.2.13. Dissoziationsversuche**

##### **2.2.13.1. HL-1-Kardiomyozyten**

Um die interzelluläre Haftung von Kardiomyozyten experimentell zu bestimmen, wurde ein aus Keratinozyten bekannter Dispase-basierter Dissoziationsversuch adaptiert (Ishii et al., 2005). Hierfür wurden konfluente HL-1-Zellrasen in einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen mit den entsprechenden Mediatoren behandelt, einmal mit PBS (Tab. 6)

gewaschen und mit je 200  $\mu\text{l}$  Dissoziationspuffer (Tab. 6), der eine Mischung aus Kollagenase I, II und Dispase II enthält, bei 37 °C inkubiert, bis sich die Zellrasen nach ca. 40 min intakt in einem Stück vom Boden des Zellkulturgefäßes ablösen. Anschließend wurde die Enzymmischung vorsichtig, ohne Beschädigung der Zellrasen, abgesaugt und durch 350  $\mu\text{l}$  Hanks gepufferte Salzlösung (engl.: „Hank’s balanced salt solution; HBSS; Tab. 6) 37 °C ausgetauscht. Dann erfolgte die Applikation von definiertem mechanischem Stress durch Rotation der Zellrasen auf einem Kreisschüttler (SSM5) mit einem Bewegungsradius von 1,5 mm bei 1.250 rpm für 5 min. Nach Fixation der Zellrasen durch Zugabe von 350  $\mu\text{l}$  2% Formaldehydlösung (Tab. 6) wurde die Anzahl der Fragmente mit einem Binokularmikroskop (MZ75) bei 12,5-facher Vergrößerung und schwarzem Hintergrund bestimmt. Jede Vertiefung wurde drei Mal ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Die Anzahl der Fragmente dient hierbei als indirektes Maß des Zell-Zell-Haftungsverlustes.

Für Hyperadhäsionsversuche wurde der Dissoziationsversuch folgendermaßen modifiziert (Garrod, 2013): Die Zellrasen wurden vor Zugabe der Mediatoren mittels Dissoziationspuffer (Tab. 6), wie oben beschrieben, abgelöst. Anschließend erfolgte die Inkubation der schwimmenden Zellrasen in HL-1-Medium (Tab. 6) mit zusätzlich 1,8 mmol/l  $\text{Ca}^{2+}$  (100 mmol/l  $\text{CaCl}_2$ -Lösung in PBS, 1:55,55) inklusive der entsprechenden Mediatoren für 30 min bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ , 95 % Raumluft und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %. Anschließend wurde das Medium gegen HL-1-Medium ohne zusätzliches  $\text{Ca}^{2+}$  und mit 5 mmol/l des  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA) ausgetauscht, die entsprechenden Mediatoren erneut zugegeben und für 90 min bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ , 95 % Raumluft und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % inkubiert. Nach Austausch des Mediums gegen 350  $\mu\text{l}$  HBSS pro Vertiefung erfolgte die definierte mechanische Belastung und Analyse wie oben beschrieben.

#### **2.2.13.2. Murine Herzschnittkultur**

Zur funktionellen Untersuchung der Zell-Zell-Haftung in Herzgewebe wurde ein Dissoziationsversuch für transversale murine Herzschnitte entwickelt und etabliert (Schinner et al., 2017). 200  $\mu\text{m}$  dicke Herzschnitte wurden, wie unter 2.1.3. beschrieben,

hergestellt und einmalig in PBS (Tab. 6) gewaschen. Anschließend erfolgte mittels kleiner Metallhaken der atraumatische Transfer der Schnitte in eine Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen, die pro Vertiefung 500 µl Herzschnitt-Medium (Tab. 6) inklusive der entsprechenden Mediatoren enthielt. Um eine Variabilität der Ergebnisse durch unterschiedliche Schnittgrößen und -positionen im Ventrikel zu minimieren, wurden jeweils direkt aufeinanderfolgende Schnitte mit Kontroll- und zu vergleichender Behandlung inkubiert. Die nach Applikation von mechanischem Stress resultierende Anzahl von Einzelkardiomyozyten wurde immer auf die korrespondierende Kontrolle bezogen. Die Anzahl der herausgelösten Kardiomyozyten schwankte hierbei unter Kontrollbedingungen zwischen aufeinander folgenden Schnitten um ca. 1 % (Schinner et al., 2017). Nach Inkubation der Schnitte bei 37 °C für 1 h wurden sie nach einmaligem Waschen in PBS in je 200 µl Dissoziationspuffer (Tab. 6) überführt und für 25 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde je 150 µl HBSS (Tab. 6) bis zu einem Gesamtvolumen von 350 µl zugegeben und mittels Pipettieren mit einer elektrischen Pipette definierter mechanischer Stress appliziert. Nach Absetzen der aus den Schnitten herausgelösten Einzelkardiomyozyten erfolgte die Zugabe von 0,5 mg/ml Thiazolylblau (engl.: „Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide“; MTT) zur Violettfärbung vitaler Zellen. Schließlich wurden je Vertiefung fünf in Kreuzform angeordnete Gesichtsfelder mit einem Mikroskop mit Phasenkontrast (Axio Vert.A1) untersucht und jeweils alle lebenden, violett angefärbten Kardiomyozyten gezählt. Die Anzahl der herausgelösten einzelnen Kardiomyozyten ist hierbei ein indirektes Maß des Zell-Zell-Haftungsverlustes. Zur Validierung der Intaktheit der Zellen und Dissoziation an den Glanzstreifen wurden Herzschnitte, wie oben beschrieben, unter Kontrollbedingungen inkubiert, mechanisch belastet und nach der Dissoziation auf Laminin-beschichteten Deckgläschen ausgesät. Nach Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Raumluft und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % für 2 h wurden die Zellen zur Immunfluoreszenzdarstellung von F-Aktin, N-Cadherin und DSG2 in 2 % Formaldehydlösung (Tab. 6) fixiert und, wie unter 2.2.4. beschrieben, weiter behandelt.

## 2.2.14. Rasterkraftmikroskopie

### 2.2.14.1. Versuchsaufbau

Zur Untersuchung der Zelltopographie mit simultaner Messung der Bindungseigenschaften und Lokalisation von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche wurde Rasterkraftmikroskopie (engl.: „Atomic force microscopy“; AFM) verwendet (Hinterdorfer und Dufrene, 2006; Chtcheglova et al., 2007; Vielmuth et al., 2015). Hierzu wurde ein auf einem optischen Fluoreszenzmikroskop (Axio Observer D1) installiertes Nanowizard III Rasterkraftmikroskop verwendet. Dieses war mit einem 10 x NA 0,25 Luft- und einem 63 x NA 1,4 Öbobjektiv (beide Carl Zeiss, Jena) ausgestattet. Um Topographiebilder zu erstellen und Kraftmessungen durchzuführen, wurde die Software SPMControl v4 (JPK Instruments, Berlin) benutzt.

Zur Durchführung der AFM-Messungen wurde ein Siliziumnitrit-Messspitzenhalter mit flexiblen Bügeln, an denen jeweils pyramidal geformte Spitzen befestigt waren (MLCT-Spitzenträger), wie unter 2.2.14.2. beschrieben, mit Adhäsionsmolekülen funktionalisiert und in die Halterung des Rasterkraftmikroskops eingespannt. Für jede Messung erfolgte die Kalibrierung der jeweiligen Messspitze (Spitze „D“ der MLCT-Spitzenträger, nominale Federkonstante 0,03 N/m) zur Bestimmung der spezifischen Federkonstante nach der „Thermal Noise“-Methode auf einem unbeschichteten Siliziumnitrit-Glimmer in der Flüssigkeit, in der die jeweilige Messung ausgeführt werden sollte. Nach erfolgter Kalibrierung kann mit Hilfe des Hookschen Gesetzes ( $\text{Kraft} = \text{Federkonstante} \times \text{Auslenkung}$ ) aus der Auslenkung des Bügels die einwirkende Kraft bestimmt werden (Slattery et al., 2013). Die Auslenkung des Federbügels wurde hierbei mittels eines am Bügel reflektierten Laserstrahls bestimmt. Zur Erstellung von Kraft-Abstandskurven wurde je Messpunkt die Spitze des AFM-Spitzenträgers mit einer definierten Geschwindigkeit der entsprechenden Oberfläche angenähert. Kam die Spitze nun in Kontakt mit der Oberfläche (sogenannter „Kontaktpunkt“, engl.: „Contact point“), wurde der flexible Bügel dadurch nach oben abgebogen und noch weiter der Oberfläche angenähert, bis eine Auslenkung mit einer festgelegten Kraft (engl.: „Setpoint“) erreicht wurde. Dort wurde die Spitze für eine

bestimmte Zeit (engl.: „Extend delay“) belassen und dann die Retraktion des Bügels mit einer definierten Geschwindigkeit (engl.: „Pulling speed“ bzw. „Retraction speed“) eingeleitet. Kam es während des Kontakts mit der Oberfläche zu einer Bindung der Oberflächenmoleküle mit den Spitzen-gekoppelten Molekülen, wurde hierdurch die Spitze zurückgehalten, was zu einer Verbiegung des Bügels nach unten führte. In der Kraft-Abstandskurve ist dies durch eine negative Abweichung des Graphen von der Grundlinie erkennbar (siehe Abb. 8 für eine Beispielkurve). Wird die Zugkraft größer als die Bindungskraft der Moleküle, springt der flexible Bügel zurück in seine neutrale Position, was in der Kurve als vertikaler Sprung zu erkennen ist und wird bis zu einer vorher festgelegten Höhe (engl.: „Z-length“) retrahiert. Diese Ablenkungen des Federbügels werden als Bindungsereignisse bezeichnet, wobei der Grad der Ablenkung und die Höhe des „Sprungs“ mit der Kraft der Molekülbindung korreliert. So kann für jedes Bindungsereignis die Kraft, die nötig ist, um die entsprechende Bindung zur Dissoziation zu bringen (engl.: „Unbinding force“), bestimmt werden. Da dies der Bindungskraft der Moleküle entspricht, wird diese Kraft in der vorliegenden Studie als „Bindungskraft“ bezeichnet (Hinterdorfer und Dufrene, 2006). Nach Durchführung eines solchen Messzyklus wurde die Spitze auf einem vorher festgelegten Raster um einen Messpunkt weiterbewegt und der Zyklus erneut gestartet. Jedem Messpunkt wurde so die Information einer Kraft-Abstandskurve zugeordnet. Aus der Höhe des Kontaktpunktes konnten relative Höhenunterschiede der Oberfläche bestimmt und als Topographiebild angezeigt werden. Die Auswertung der einzelnen Kraft-Abstandskurven mit Bearbeitung und Erstellung der Topographiebilder und Markierung der Bindungsereignisse erfolgte mittels der Software SPM Data Processing v4.2 (JPK Instruments, Berlin).

#### **2.2.14.2. Funktionalisierung der Messspitzen**

Rekombinantes, eukaryotisch in ovariellen Hamsterzellen (engl.: „Chinese hamster ovary cells“; CHO) produziertes dimerisiertes DSG2-Fc wurde von der institutsinternen biophysikalischen Einheit unter Leitung von Dr. Franziska Vielmuth nach einem etablierten Protokoll (Schlegel et al., 2010) hergestellt und für AFM-Messungen allgemein zur

Verfügung gestellt. Dimerisiertes N-Cadherin-Fc wurde käuflich von R&D Systems (Abingdon, UK) erworben und in HBSS (Tab. 6) gelöst. Flexible Messspitzenträger, Typ MLCT, und Glimmer aus Siliziumnitrit wurden mit Chloroform gereinigt und zur Übertragung von Aminogruppen über Nacht in 5,64 mol/l Ethanolamin-Hydrochlorid (ein primäres Amin) gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO) inkubiert (Ebner et al., 2007). Nach dreimaligem Waschen mit DMSO für je 3 min und anschließend drei Waschschritten in 100 % Ethanol wurden die Träger und Glimmer mit Stickstoff vorsichtig getrocknet. Es folgte die Beschichtung mit einem Polyethylenglykol-Abstandshalter (Acetal-PEG-NHS). Dieser wurde in Chloroform und Triethylamin (Verhältnis 20:1) gelöst und für 2 h auf die vorbereiteten Spitzenträger und Glimmer gegeben. Während dieser Zeit reagierte die NHS-Gruppe des PEG-Abstandshalters mit der Aminogruppe des Spitze-gebundenen Ethanolamins, wodurch eine stabile Amidbindung des Acetal-PEGs mit der Spitze entstand. Anschließend wurde die Acetal-Gruppe des PEGs mittels 1 % (w/v) Zitronensäure-Monohydrat in dest. Wasser für 10 min zu einer Aldehyd-Gruppe konvertiert und dadurch aktiviert. Die Spitzen wurden danach einmal in dest. Wasser und zweimal in Chloroform gewaschen und mit Stickstoff vorsichtig getrocknet. Nun erfolgte die Inkubation der Messspitzen mit dem jeweils gewünschten Fc-Protein (Konzentration 0,1 mg/ml in HBSS) zusammen mit Natriumcyanoborhydrid-Lösung (Tab. 6) als Reduktionsmittel für 1 h. Während dieser Zeit bindet der Protein-Fc-Teil an die Aldehyd-Gruppe des PEG-Abstandshalters. Durch Zugabe von Ethanolamin-Lösung (Tab. 6) wurde diese Reaktion abgestoppt und die Glimmer und Spitzenträger anschließend zweimalig in HBSS gewaschen und bei 4 °C in HBSS bis zu 7 Tage gelagert.

#### **2.2.14.3. Kraftmessungen auf lebenden Zellen**

HL-1-Kardiomyozyten wurden auf Glasdeckgläschen ( $\varnothing$  24 mm) ausgesät und je nach Versuchsaufbau mit DNA oder siRNA, wie unter 2.2.1. und 2.2.2. beschrieben, transfiziert. Vor den jeweiligen AFM-Messungen wurden die Zellen drei Mal kräftig mit HL-1-Medium (Tab. 6) gewaschen, um abgestorbene Zellen und sonstigen Detritus zu entfernen. Anschließend wurde das Deckgläschen in den AFM-Halter (JPK Instruments, Berlin)

eingespannt und die Messungen bei 37 °C in HL-1-Medium mit zusätzlich 1,8 mmol/l  $\text{Ca}^{2+}$  (100 mmol/l  $\text{CaCl}_2$ -Lösung in PBS, 1:55,55) ohne Noradrenalin über einen Zeitraum von 4 h durchgeführt. Zuerst wurde eine Stelle mit konfluenten Zellen ohne Zelldetritus aufgesucht. Bei Experimenten mit GFP-Fusionsproteinen oder Cy3-gekoppelter siRNA wurden entsprechende Stellen mit suffizienter Signalstärke mittels Epifluoreszenz bestimmt. Zur orientierenden Darstellung der Zellen wurden dann Durchlicht- bzw. Fluoreszenzaufnahmen mit dem 63 x Objektiv erstellt. Nach der optischen Kalibrierung, um die Position der Messspitze im Verhältnis zur Probe bestimmen zu können, wurde im quantitativen Aufnahmemodus (engl.: „Quantitative imaging“) eine Übersichtstypographieaufnahme mit folgenden Einstellungen aufgenommen: 128 x 128 Messpunkte; 40  $\mu\text{m}$  x 40  $\mu\text{m}$ ; Setpoint: 0,2 nN; Pulling speed: 50  $\mu\text{m}/\text{s}$ , Z-length: 1,5  $\mu\text{m}$ . Für Kraftmessungen wurde im aufgenommenen Bereich je ein Areal mit 5  $\mu\text{m}$  x 1,25  $\mu\text{m}$  ausgewählt, das die Zellkontaktzone zweier benachbarter Zellen überspannte. Im Kraftmessungsmodus (engl.: „Force mapping“) wurden Messungen zur Bestimmung der Bindungseigenschaften der Spitzen-gekoppelten Adhäsionsmoleküle in diesen Bereichen mit folgenden Parametern durchgeführt: 64 x 16 Messpunkte; Setpoint: 0,2 nN; Extend speed: 5  $\mu\text{m}/\text{s}$ ; Extend delay: 0,1 s. Bei allen Experimenten wurde vor (Kontrollbedingungen) und nach Zugabe der entsprechenden Mediatoren oder Antikörper dieselbe Zell-Zell-Kontaktzone gemessen. Die Messungen mit Mediatoren erfolgten jeweils in einem Zeitraum 30 min – 2 h nach entsprechender Zugabe. Ein monoklonaler, DSG2-spezifischer Antikörper (anti-DSG2-mRb; Spezies: Kaninchen [Rb], Tab. 3) wurde jeweils frisch über Nacht gegen 2 l PBS (Tab. 6) dialysiert und nach den entsprechenden Kontrollmessungen 1 h auf den Zellen inkubiert bevor die Messungen fortgeführt wurden. Diese erfolgten somit im Zeitraum von 1 h – 2,5 h nach Zugabe erfolgten.

#### **2.2.14.4. Zellfreie Kraftmessungen**

Zur direkten Untersuchung von homophilen DSG2-vermittelten Interaktionen wurden, wie unter 2.2.14.2. beschrieben, Glimmer und AFM-Messspitzen mit dimeren DSG2-Fc-Molekülen beschichtet. Die zellfreien Messungen erfolgten auf einem funktionalisierten

Glimmer in HBSS, das 1,8 mmol/l  $\text{Ca}^{2+}$  enthält. Hierfür wurde die Spitze wie beschrieben kalibriert und im Kraftspektroskopie-Modus (engl.: „Force spectroscopy“) Kraftmessungen in einem 20  $\mu\text{m}$  x 20  $\mu\text{m}$  großen Areal mit folgenden Messparametern durchgeführt: Setpoint: 0,2 nN; Extend speed: 10  $\mu\text{m}/\text{s}$ ; Extend delay: 0,1 s. Bei allen Experimenten wurde vor (Kontrollbedingungen) und nach Zugabe von anti-DSG2-mRb (Tab. 3) dieselbe Stelle gemessen. Der anti-DSG2-mRb wurde, wie auf Zellen, nach den entsprechenden Kontrollmessungen 1 h inkubiert bevor die Messungen fortgeführt wurden, sodass die Messungen im Zeitraum 1 h – 2 h nach Zugabe erfolgten.

### **2.2.15. Herzperfusion nach Langendorff**

Zur Untersuchung des Einflusses von adrenerger Stimulation auf funktionelle Parameter, wie Schlagfrequenz und Pulsdruck, sowie auf die Verteilung von Glanzstreifenproteinen in intakten Herzen wurden Herzperfusionsen nach Langendorff durchgeführt (Langendorff, 1895; Bell et al., 2011). Je nach Experiment wurden 10 - 12 Wochen alte, genetisch unveränderte BALB/cJ-Mäuse oder PG-KO-Mäuse mit zugehörigem WT-Geschwistertier verwendet. Die entsprechenden Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet, das Herz nach einer lateralen Thorakotomie auf Höhe der Aorta ascendens abgetrennt und in eiskalten Langendorff-Präparationspuffer (Tab. 6) gelegt. Mit Hilfe eines Binokularmikroskops (MZ75) wurde die Aorta in weniger als 5 min kanüliert und befestigt. Danach erfolgte die Perfusion mit Carbogen (Gasgemisch aus 95 %  $\text{O}_2$ , 5 %  $\text{CO}_2$ )-begastem, 37 °C-warmen Langendorff-Perfusionspuffer (Tab. 6) in der Langendorff-Apparatur bei konstant 60 mmH<sub>2</sub>O Gegendruck. Der Druckabnehmer wurde parallel zur kanülierten Aorta geschaltet und vor jedem Experiment mit 1.000 mmH<sub>2</sub>O auf mmHg kalibriert. Die Aufnahme der Messung erfolgte mit der Software LabChart7 (ADInstruments, Spechbach). Kurz nach Beginn der Perfusion begannen die Herzen spontan und rhythmisch zu kontrahieren. Zwei Messnadeln wurden zur Aufnahme eines Zwei-Punkt-Elektrokardiogramms (EKG) in die Ventrikel eingebracht. Die Grundlinie der Herzfrequenz und des Pulsdruckes wurde über 10 min aufgenommen. Vor Zugabe des Mediators wurde die Durchflussrate des Herzens pro Minute bestimmt und eine Spritzenpumpe mit

entsprechend berechneter Flussrate angeschlossen. Die Behandlung erfolgte über die jeweils angegebene Zeit. Anschließend wurden die Herzen in Kryo-Einbettmedium eingelegt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbereitung für Immunfluoreszenzdarstellungen erfolgte wie unter 2.2.4. beschrieben. Exklusionskriterien von Herzen bei der Langendorff-Präparation waren: (1) Präparationszeit von über 5 min, (2) ausgeprägte Arrhythmien unter basalen Bedingungen oder (3) Abbruch der spontanen Kontraktionen während der Messung. Die Auswertung der Herzfrequenz und der Pulsdruckamplitude erfolgte mittels der Software LabChart7 (ADInstruments, Spechbach), wobei die Werte aus den aufgenommenen EKG- und Druckwellenkurven pro Herz extrahiert wurden.

### **2.3. Antikörper und Testreagenzien**

Antikörper wurden bei der Immunfluoreszenzdarstellung (IF), zur Immundetektion von Proteinen bei der Western Blot-Analyse (WB), der Isolation von Proteinen mittels Immunpräzipitation (IP) und zur Inhibition von Bindungsereignissen bei AFM-Messungen verwendet. Hierzu wurden Primärantikörper (Tab. 3), die die Epitope des zu untersuchenden Zielproteins spezifisch erkennen, verwendet. Für die Immunfluoreszenzdarstellung und Western Blot-Analyse wurden anschließend Sekundärantikörper hinzugegeben (Tab. 4), die den Fc-Teil des Primärantikörpers speziesspezifisch erkennen und an ein Fluorophor bzw. an POX gekoppelt waren. Phalloidin, ein spezifisch F-Aktin-bindendes Toxin des Knollenblätterpilzes, wurde gekoppelt an das Fluorophor ALEXA-Fluor 488 zur Darstellung von F-Aktin bei der Immunfluoreszenzdarstellung benutzt (Verdünnung 1:100 in PBS). Streptavidin, ein bakterielles Protein, das mit hoher Affinität an das Vitamin Biotin bindet, wurde gekoppelt an ALEXA Fluor 488 in der Immunfluoreszenzdarstellung zur Sichtbarmachung der vorher Biotin-markierten Zellmembran verwendet (Verdünnung 1:100 in PBS).

Tab. 3: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Hersteller	Typ/Spezies	Verdünnungsverhältnis	
			IF	WB
anti-CX43	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	polyklonal, Kaninchen	1:100	1:1.000
anti-Desmin	Abcam, Cambridge, UK	monoklonal, Kaninchen	1:100	1:1.000
anti-DP	Progen, Heidelberg	monoklonal, Maus	1:100	n. verw.
anti-DP	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA	polyklonal, Kaninchen	1:100	1:500
anti-DSC2/3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	monoklonal, Maus	1:50	n. verw.
anti-DSG1/2	Progen, Heidelberg	monoklonal, Maus	n. verw.	1:200
anti-DSG2	Progen, Heidelberg	polyklonal, Kaninchen	1:100	n. verw.
anti-GFP	Abcam, Cambridge, UK	monoklonal, Maus	n. verw.	1:1.000
anti-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	Aviva Systems Biology, San Diego, USA	monoklonal, Maus	n. verw.	1:1.000
anti-N-Cadherin	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	monoklonal, Maus	1:100	1:1.000
anti-PG	Progen, Heidelberg	monoklonal, Maus	1:100	1:1.000
anti-PKAC $\alpha$ + PKAC $\beta$	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	polyklonal, Kaninchen	n. verw.	1:500
anti-PKP2	Progen, Heidelberg	monoklonal, Maus	1:20	1:200
anti- $\alpha$ T-Catenin	Proteintech Group, Inc. Chicago, USA	polyklonal, Kaninchen	1:100	1:1.000
anti- $\beta$ -Catenin	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	monoklonal, Maus	1:100	1:1.000

			IP	AFM
anti-DSG2-mRb	Abcam, Cambridge, UK	monoklonal, Kaninchen	1:240	1:50
anti-PG	Progen, Heidelberg	monoklonal, Maus	1:5	n. verw.
Kontroll-IgG-Fraktion	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA	polyklonal, Kaninchen	1:240	n. verw.

Tab. 4: Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Kopplung	Anwendung	Verdünnungsverhältnis
Ziege-anti-Maus-Fc (engl.: „Goat anti-mouse“; gam)	Dianova, Hamburg	POX	WB	1:10.000
Ziege-anti-Kaninchen-Fc (engl.: „Goat anti-rabbit“; garb)				
gam		Cy3 bzw. Cy5	IF	1:600
garb		Cy2		

HL-1-Kardiomyozyten, kultivierte murine Herzschnitte bzw. extrakorporal perfundierte Mausherzen wurden mit den jeweils angegebenen Mediatoren über den entsprechenden Zeitraum inkubiert. Diese wurden wie folgt gelöst und eingesetzt:

Tab. 5: Verwendete Testreagenzien

Name	Hersteller	Lösungsmittel	Funktion	Eingesetzte Konzentration
2-,3-Butandionmonoxim (BDM)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	HBSS	Inhibitor der Myosin-II-ATPase	10 mmol/l
6-Bnz-cAMP	Biolog, Hayward, USA	Dest. Wasser	Aktivator der PKA	100 µmol/l
Blebbistatin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	DMSO	Inhibitor der Myosin-II-ATPase	10 µmol/l
EGTA		PBS	Ca <sup>2+</sup> -Chelator	5 bzw. 10 mmol/l

Forskolin (F)*		DMSO	Aktivator der Adenylylcyase	5 $\mu\text{mol/l}$
H89		Dest. Wasser	Inhibitor der PKA	20 $\mu\text{mol/l}$
Isoprenalin (Iso)			$\beta$ -Adrenozeptor-Agonist	2 $\mu\text{mol/l}$
O-Me-cAMP	Biolog, Hayward, USA		Aktivator von EPAC <sup>+</sup>	100 $\mu\text{mol/l}$
Rolipram (R)*	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	DMSO	Inhibitor der Phosphodiesterase IV	10 $\mu\text{mol/l}$

\*Forskolin und Rolipram wurden für die Versuche jeweils in Kombination verwendet (F/R).

<sup>+</sup>Austauschprotein, direkt aktiviert von cAMP (engl.: „Exchange Protein directly activated by cAMP“).

#### 2.4. Statistik und Datenauswertung

Die Auswertung von Western Blot-Banden erfolgte durch Grauwertanalyse mittels der Software ImageJ v1.49 (National Institute of Health, Bethesda, USA). Nach Messung der jeweiligen Bandenintensität und Abzug des Proteinspur-spezifischen Hintergrundes wurden die Werte auf die Werte der jeweiligen Ladekontrolle, das Mikrotubuli-Protein  $\alpha$ -Tubulin, bezogen. Die Aufnahme, Bearbeitung und Auswertung der Immunfluoreszenzdarstellung erfolgte wie unter 2.2.4. beschrieben.

Die Bearbeitung und Zusammenstellung aller Abbildungen wurde mit Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems, San Jose, USA) durchgeführt. Alle Daten wurden in Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA) zusammengestellt und analysiert. Die dargestellten Balkendiagramme wurden mit OriginPro 9.1 (Originlab, Northampton, USA) erstellt und repräsentieren den jeweiligen Mittelwert mit Standardfehler (engl.: „Standard error of the mean“; SEM) als Fehlerbalken. Zur Feststellung von statistisch signifikanten Unterschieden wurde die Software Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, USA) benutzt. Bei zwei unabhängigen Gruppen wurde der zweiseitige, ungepaarte Studentsche t-Test und bei mehr als zwei zu vergleichenden Gruppen die einfaktorielle Varianzanalyse (engl.: „Analysis

of variance“; ANOVA) mit anschließender Bonferroni-Korrektur angewendet. Statistische Signifikanz wurde ab Werten von  $P < 0,05$  angenommen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Positive Adhäsotropie: Adrenerge Stimulation stärkt die kardiale Zell-Zell-Haftung

##### 3.1.1. Adrenerge Stimulation durch Isoprenalin und Forskolin/Rolipram

Um Kardiomyozyten in den jeweils verwendeten Modellen adrenerg zu stimulieren, wurde eine Behandlung mit Isoprenalin (Iso), einem  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonist, durchgeführt. Durch Bindung an den  $\beta$ -Adrenozeptor kommt es hierbei über das  $G_s$ -Protein zu einer Aktivierung der Adenylylcyclase, die dann cAMP, den sekundären Botenstoff des adrenergen Signalwegs, bildet. Zusätzlich wurde im Vergleich Forskolin (F) appliziert, das zellpermeabel ist und zu einer direkten Aktivierung der Adenylylcyclase mit Erhöhung der cAMP-Konzentration führt (Scholz, 1989). Dieser Effekt wird durch die Kombination mit Rolipram (R), einem Inhibitor des cAMP-abbauenden Enzyms Phosphodiesterase IV (Griswold et al., 1993), weiter verstärkt.

Zu Beginn dieser Studie wurde überprüft, ob eine Behandlung mit Iso oder F/R wie beschrieben zu einer Aktivierung des adrenergen Signalwegs mit Erhöhung des sekundären Botenstoffes cAMP in der verwendeten murinen Kardiomyozyten-Zelllinie HL-1 führt. So wurden HL-1-Kardiomyozyten für 10 min und 1 h mit 2  $\mu\text{mol/l}$  Iso und 1 h mit 5  $\mu\text{mol/l}$  bzw. 10  $\mu\text{mol/l}$  F/R behandelt und anschließend ein enzymgekoppelter Immunadsorptionstest zur Messung der intrazellulären cAMP-Spiegel durchgeführt. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Anstieg der intrazellulären cAMP-Spiegel von  $7,6 \pm 0,9$  pmol/ml unter Kontrollbedingungen auf  $14,3 \pm 0,9$  pmol/ml nach 10 min Iso-Behandlung, der nach einer Inkubationszeit von 1 h wieder auf  $10,7 \pm 1,5$  pmol/ml abgefallen war. F/R zeigte nach 1 h eine deutliche cAMP-Erhöhung auf  $49,6 \pm 5,4$  pmol/ml (Abb. 5). In von Dr. Angela Schlipp durchgeführten Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET)-Experimenten mittels EPAC1-cAMPs-Sensor in HL-1-Zellen war nach Iso- bzw. F/R-Zugabe ein schneller, bereits nach je 30 s signifikanter Anstieg der cAMP-Spiegel detektierbar (Schinner et al., 2017). Zusammen bestätigen diese Daten die schnell einsetzende Aktivierung des adrenergen Signalwegs mit cAMP-Spiegelerhöhung nach Behandlung von Kardiomyozyten mit Iso oder F/R. Da durch

diese Versuche nur die cAMP-Spiegel der gesamten Zellen und nicht der einzelnen Zellkompartimente bestimmt werden können, ist eine lokalisierte Erhöhung der cAMP-Konzentration nicht auszuschließen. Dies könnte eine Erklärung für die nicht mehr signifikant erhöhten cAMP-Gesamtspiegel nach Inkubation mit Iso über 1 h darstellen.

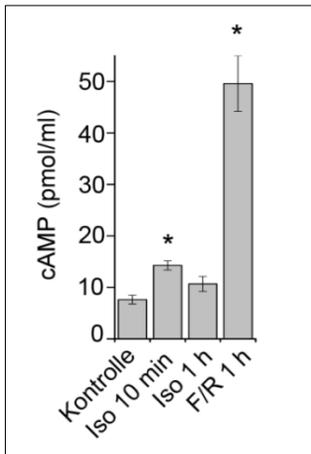


Abb. 5: cAMP-Spiegelerhöhung durch Behandlung von HL-1-Kardiomyozyten mit Iso und F/R  
cAMP-spezifische enzymgekoppelte Immunadsorptionstests bestätigen die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration in HL-1-Kardiomyozyten nach Behandlung mit 2  $\mu\text{mol/l}$  Iso für 10 min oder 1 h und 5  $\mu\text{mol/l}$  bzw. 10  $\mu\text{mol/l}$  F/R für 1 h. [\*P < 0,05 im Vergleich zu Kontrolle. n = 6 für Kontrolle, Iso 1 h; n = 4 Iso 10 min; n = 3 F/R 1 h. Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

### 3.1.2. Erhöhte Zell-Zell-Haftung in HL-1-Kardiomyozyten

Um festzustellen, ob adrenerge Stimulation die kardiale Zellkohäsion beeinflusst, wurde der bei Keratinozyten gut etablierte Dispase-basierte Dissoziationsversuch modifiziert und für Kardiomyozyten angepasst (Schlipp et al., 2014). Nach Inkubation von HL-1-Zellen mit Iso oder F/R für jeweils 1 h wurde der Zellrasen enzymatisch von der Extrazellulärmatrix abgelöst und einem definierten mechanischen Stress ausgesetzt. Die Anzahl der resultierenden Zellrasen-Fragmente wird hierbei als indirektes Maß für die Zell-Zell-Haftung angenommen. So zerfielen die Kontroll-Zellrasen in  $12,5 \pm 1,0$  Fragmente, während die Iso- oder F/R-behandelten Zellverbände nur in  $4,4 \pm 0,8$  bzw.  $5,8 \pm 0,8$  Fragmente zerfielen, was eine stärkere interzelluläre Haftung von Kardiomyozyten nach adrenerger Stimulation *in vitro* anzeigt (Abb. 6A).

Um festzustellen, ob adrenerge Signalwegsaktivierung neben der Stärkung der gesamten Zellkohäsion auch die Qualität der Bindung beeinflusst und ein Stadium der  $\text{Ca}^{2+}$ -Unabhängigkeit der Cadherinbindungen, die sogenannte „Hyperadhäsion“ (Garrod und Taberero, 2014), erreicht wird, wurden Dissoziationsversuch-basierte

Hyperadhäsionsstudien in HL-1-Zellen durchgeführt. Dafür wurde nach enzymatischem Ablösen der Zellrasen vom Boden des Zellkulturgefäßes zuerst die Inkubation der Mediatoren für 30 min in Medium mit zusätzlichen 1,8 mmol/l  $\text{Ca}^{2+}$  durchgeführt, woraufhin das Medium gewechselt wurde und eine Inkubation der Mediatoren in Medium mit reduziertem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt und zusätzlich 5 mmol/l Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA) als  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator für 1,5 h erfolgte. Hierbei war nach entsprechender Behandlung mit Iso und F/R ein deutlicher Abfall der Fragmentanzahl bei Iso auf  $60,2 \pm 16,6$  und noch deutlicher bei F/R auf  $19,5 \pm 7,9$  gegenüber Kontrollbedingungen mit  $243,4 \pm 53,0$  Fragmenten detektierbar (Abb. 6B). Diese Ergebnisse zeigen, dass durch Aktivierung des adrenergen Signalwegs die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Kardiomyozytenhaftung reduziert und somit ein hyperadhäsiver Zustand induziert wird.

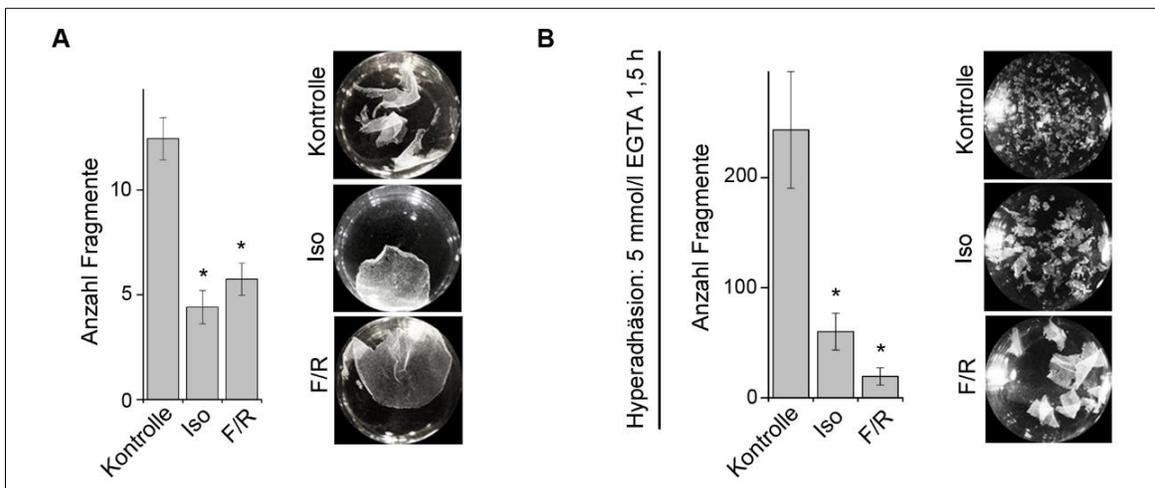


Abb. 6: Zunahme der interzellulären Haftung und Reduktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit nach adrenerger Stimulation *in vitro*

(A) Zunahme der interzellulären Haftung im Dissoziationsversuch mit HL-1-Zellen nach Behandlung mit Iso oder F/R für 1 h, wobei die Anzahl der Fragmente als inverses Maß der Zell-Zell-Haftung angenommen wird. (B) Der Hyperadhäsionsdissoziationsversuch zeigt eine deutliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Insensitivität der Zellkohäsion nach Vorinkubation von HL-1-Kardiomyozyten mit Iso oder F/R für 30 min. Die Aufnahmen auf der rechten Seite der Diagramme zeigen jeweils repräsentative Zellrasen nach appliziertem mechanischem Stress. [\*P < 0,05 im Vergleich zu Kontrolle. A: n = 15 für Kontrolle; n = 8 Iso; n = 12 F/R. B: n = 8 für Kontrolle; n = 5 Iso; n = 8 F/R. Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

### 3.1.3. Erhöhte Zell-Zell-Haftung in kultivierten Herzschnitten

Um diese *in vitro*-Ergebnisse in Herzgewebe überprüfen zu können, wurde der Dissoziationsversuch auf transversale murine Herzschnitte angepasst. Hierfür wurden frisch präparierte Mausherzen in Agarose eingebettet und mittels Vibratoms in 200 µm dicke, transversale Schnitte geschnitten. Durch definierten mechanischen Stress konnten einzelne Kardiomyozyten aus dem jeweiligen Schnitt herausgelöst werden. Die Anzahl der herausgelösten Zellen wird, ähnlich wie bei den beschriebenen *in vitro*-Experimenten, als indirektes Maß für die Zell-Zell-Haftung angenommen. Die herausgelösten Kardiomyozyten waren vital, was mittels MTT-Färbung bestätigt wurde, hatten die Fähigkeit sich zu kontrahieren und zeigten ein intaktes Sarkomersystem mit regelrechter Lokalisation der Adhäsionsmoleküle DSG2 und N-Cadherin an den Glanzstreifen (Abb. 7A).

Durch Behandlung mit Iso oder F/R wurde die Anzahl der herausgelösten Kardiomyozyten signifikant auf  $61,2 \pm 9,9$  % bzw.  $36,8 \pm 7,0$  % der Kontrolle reduziert (Abb. 7B). Zur Validierung des Versuchsaufbaus wurden Schnitte 1 h mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator EGTA (10 mmol/l) behandelt, um die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Cadherinbindungen zu verhindern (Nagar et al., 1996). Hierbei stieg die Anzahl der herausgelösten Kardiomyozyten drastisch auf über das 6-Fache der Kontrolle an (Abb. 7C). Diese Ergebnisse bestätigen die Zunahme der Zell-Zell-Haftung durch adrenerge Stimulation *in vitro* als auch *ex vivo*. Gemeinsam mit den vorher gezeigten Resultaten demonstrieren diese Daten, dass die Zunahme der interzellulären Haftung eine zusätzliche Funktion des Sympathikus am Herzen ist, welche ab nun als „positive Adhäsiotropie“ bezeichnet werden wird.

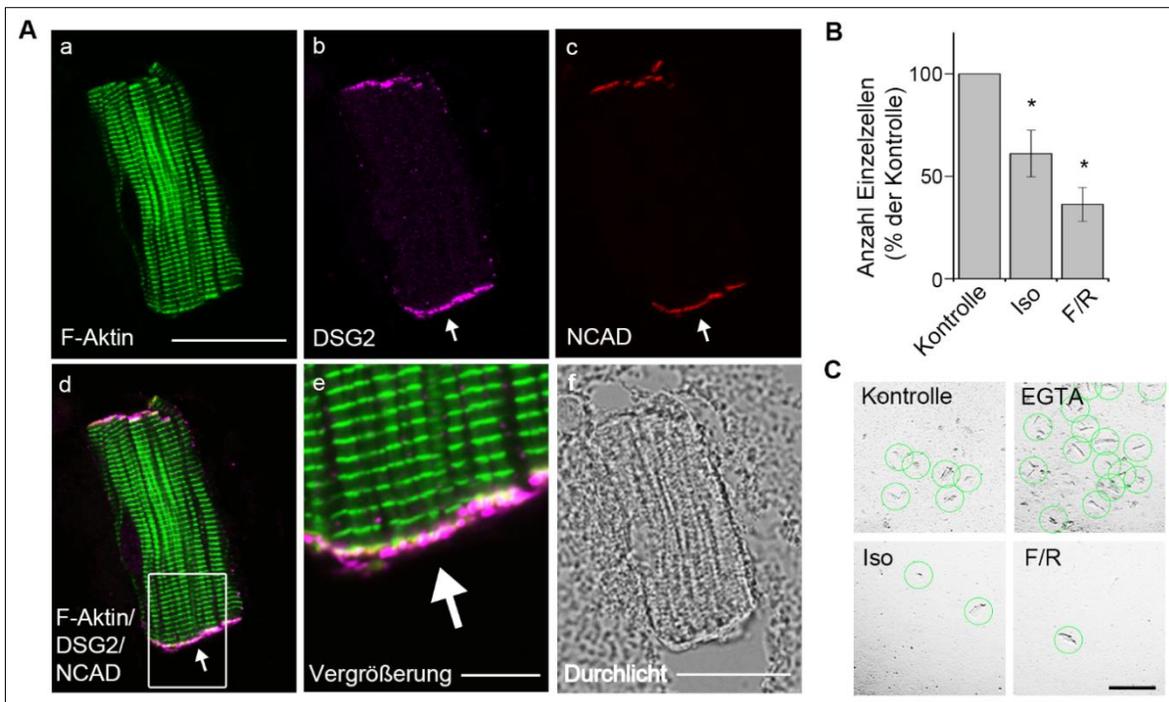


Abb. 7: Zunahme der interzellulären Haftung nach adrenerger Stimulation *ex vivo*

(A) Die im *ex vivo*-Dissoziationsversuch herausgelösten Kardiomyozyten sind regelrecht geformt und weisen ein intaktes Sarkomersystem, erkennbar an der F-Aktin-Verteilung (grün), auf. Die Adhäsionsmoleküle DSG2 (magenta) und N-Cadherin (rot) sind regelgerecht an den Glanzstreifen (markiert durch einen Pfeil) lokalisiert. Der weiße Kasten in (d) markiert den in (e) vergrößerten Bereich. (f) zeigt das korrespondierende Durchlichtbild der Zelle nach Fixation. (B) Adrenerge Stimulation mit Iso oder F/R für 1 h reduziert die Anzahl der aus einem 200  $\mu\text{m}$  dicken Transversalschnitt herausgelösten Kardiomyozyten im Vergleich zu Kontrolle und erhöht somit die interzelluläre Haftung *ex vivo*. (C) zeigt repräsentative Durchlichtbilder mit herausgelösten, intakten Kardiomyozyten (je einzeln markiert durch einen grünen Kreis), wie sie bei der Auswertung des Versuches zu erkennen waren. [\*P < 0,05 im Vergleich zu Kontrolle. A: Maßstab (a - d, f) = 25  $\mu\text{m}$ ; Maßstab (e) = 5  $\mu\text{m}$ . B: n = 8 für Kontrolle; n = 7 Iso; n = 6 F/R. C: Maßstab = 250  $\mu\text{m}$ . Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

### 3.2. Positive Adhäsotropie korreliert mit desmosomaler Reorganisation

#### 3.2.1. Verstärkte Kräfte und Translokation von Desmoglein-2-vermittelten Bindungen

AFM ist eine Methode, die die Kombination von Topographiemessungen mit funktionellen Kraftmessungen auf verschiedenen Oberflächen, auch auf lebenden Zellen, ermöglicht (Chitcheglova et al., 2007; Vielmuth et al., 2015). Hierfür wurden flexible Metallbügel eingesetzt, deren Spitzen mit rekombinanten Adhäsionsproteinen beschichtet wurden (Abb. 8A). Für AFM-Messungen wird der Bügel der Oberfläche angenähert bis ein direkter

Kontakt der Spitze mit der Oberfläche entsteht, was durch die Ablenkung eines Laserstrahls detektiert und wodurch die Höhe des jeweiligen Messpunktes bestimmt werden kann (Abb. 8B „I“). Daraufhin wird nach einer kurzen Interaktionszeit von 0,1 s der Bügel inklusive Spitze langsam wieder von der Oberfläche entfernt. Kommt es während der Kontaktzeit mit der Oberfläche zu einer Bindung zwischen den Oberflächenmolekülen und den an der Spitze befestigten Adhäsionsproteinen, führt dies zum kurzzeitigen Zurückhalten der Spitze (Abb. 8B „II“). Durch weitere Retraktion des Bügels wird schließlich die Kraft der Oberflächenmolekül-Adhäsionsprotein-Bindung überwunden und der Bügel kann in seine neutrale Position zurückspringen (Abb. 8B „III“). Aufgetragen als Kraft-Abstands-Graph, wie in Abb. 8B dargestellt, kann ein solches Bindungsereignis zwischen Spitze und Oberfläche als negative Abweichung von der Grundlinie, gefolgt von einem „Zurückspringen“ detektiert werden. Die Amplitude des Sprungs kann hierbei gemessen werden und entspricht der Kraft, die nötig ist, um die Oberflächenmolekül-Adhäsionsprotein-Bindung zu überwinden (engl.: „Unbinding force“) (Hinterdorfer und Dufrene, 2006). Da dies der Bindungskraft zwischen den Molekülen entspricht, wird im Folgenden die Bezeichnung „Bindungskraft“ verwendet.

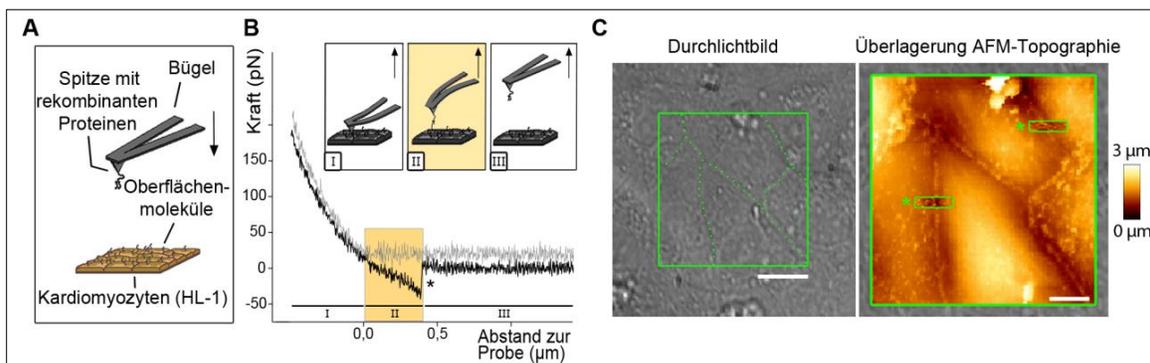


Abb. 8: Versuchsaufbau der AFM-Messungen auf lebenden HL-1-Kardiomyozyten

(A) Messanordnung der AFM-Experimente, durchgeführt mit einem flexiblen Bügel und Proteinbeschichteter Spitze auf der Oberfläche lebender HL-1-Kardiomyozyten. (B) Repräsentative Kraft-Abstands-Kurve mit (schwarz) und ohne (grau) Bindungsereignis (markiert mit \*). Die Piktogramme zeigen die zu den einzelnen Phasen der Bügelretraktion (I - III) gehörenden Bügelposition und Verbiegung. (C) Repräsentatives Durchlichtbild (links) mit korrespondierendem, im grün markierten Bereich aufgenommenes, AFM-Topographiebild (rechts). Die gestrichelten Linien markieren den Verlauf der Zellgrenzen. Kraftmessungen wurden in einem  $5 \mu\text{m} \times 1,25 \mu\text{m}$  großen Areal an der Zellgrenze durchgeführt (rechts, grüne Kästen mit \*). [C: Maßstab =  $10 \mu\text{m}$ . Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

Um die Mechanismen der beobachteten Zunahme der Zellkohäsion nach cAMP-Spiegelerhöhung genauer zu untersuchen, wurden in AFM-Experimenten auf lebenden HL-1-Kardiomyozyten die Verteilungsmuster und Kräfte von Adhäsionsmolekül-vermittelten Bindungen vor und nach Erhöhung der cAMP-Konzentration untersucht. Hierbei wurden die Messspitzen entweder mit DSG2 als Vertreter der desmosomalen oder mit N-Cadherin als Vertreter der klassischen Cadherine beschichtet. Zur Durchführung der Messungen wurde zuerst, wie in Abb. 8C gezeigt, ein Durchlichtbild aufgenommen und ein Übersichts-Topographiebild erstellt. Hierauf wurde für die Kraftmessungen dann ein jeweils  $5 \mu\text{m} \times 1,25 \mu\text{m}$  und  $64 \times 16$  Messpunkte großes Areal ausgewählt, das die Zell-Zell-Kontaktzone, oder auch „Zellgrenze“, zweier benachbarter Kardiomyozyten enthielt. Diese Zellgrenzen waren jeweils als wallartige Erhöhungen im Topographiebild erkennbar.

Unter Kontrollbedingungen zeigte sich bei Verwendung DSG2-funktionalisierter Messspitzen eine gleichmäßige Verteilung von DSG2-vermittelten Bindungsereignissen mit einer ähnlichen Bindungsfrequenz direkt auf der Zellgrenze verglichen mit der Zelloberfläche jenseits dieser Grenzen. Bei Messungen im Zeitraum von 30 min – 2 h nach Zugabe von Iso oder F/R kam es zu einer deutlichen Umverteilung mit Zunahme der Anzahl der Bindungsereignisse im Bereich der Zellgrenze und gleichzeitiger Abnahme der Anzahl an der anliegenden Zelloberfläche (Abb. 9A). Um diese Beobachtung zu objektivieren, wurde der Verteilungsquotient bestimmt. Hierbei wurde die Frequenz von Bindungsereignissen in einem 10 Messpunkte-breiten Bereich, der die Zellgrenze umfasste, im Vergleich zur Bindungsfrequenz der restlichen Zelloberfläche bestimmt. Für den Verteilungsquotienten wurde dann die Bindungsfrequenz an der Zellgrenze durch die an der Oberfläche dividiert. So konnte die Zunahme der DSG2-vermittelten Bindungsereignisse an der Zellgrenze mit einem Anstieg des Verteilungsquotienten von  $0,92 \pm 0,05$  unter Kontrollbedingungen auf  $1,37 \pm 0,10$  nach Iso und  $1,70 \pm 0,19$  nach F/R-Inkubation bestätigt werden (Abb. 9B). Die Gesamtzahl der Bindungsereignisse unterschied sich hierbei mit  $256,7 \pm 15,5$  für Kontrolle,  $231,8 \pm 22,0$  für Iso und  $238,5 \pm 21,4$  für F/R nicht signifikant (Abb. 9C). Bei der Untersuchung der mittleren Bindungskräfte der einzelnen Bindungsereignisse konnte sowohl für Iso als auch F/R ein Anstieg der Kräfte

DSG2-vermittelte Bindungsereignisse um ca. 10 % gegenüber der jeweiligen Kontrolle ermittelt werden. So stiegen durch Iso-Behandlung die Kräfte von  $30,79 \pm 0,32$  pN auf  $33,79 \pm 0,40$  pN und nach F/R-Behandlung von  $23,03 \pm 0,19$  pN auf  $27,09 \pm 0,27$  pN (Abb. 9D). Diese Daten zeigen an, dass es durch adrenerge Stimulation zu einer Umverteilung der DSG2-vermittelten Bindungsereignisse in Richtung Zellgrenze mit Zunahme der Bindungskräfte kommt.

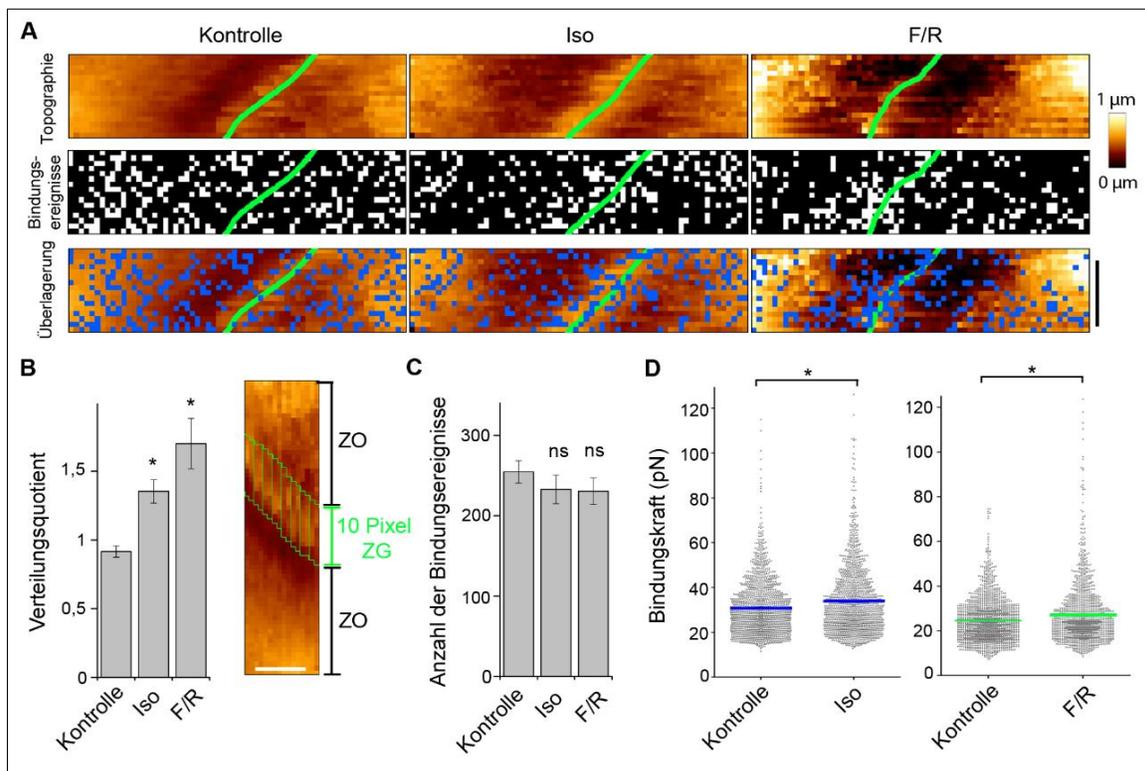


Abb. 9: Adrenerge Signalwegsaktivierung führt zu einer Reorganisation und Erhöhung der Bindungskraft von DSG2-vermittelten Bindungsereignissen auf lebenden Kardiomyozyten (A) Die repräsentativen AFM-Topographiebilder mit korrespondierenden DSG2-vermittelten Bindungsereignissen zeigen eine Reorganisation der Bindungen mit Zunahme der Anzahl an den Zellgrenzen (markiert durch eine grüne Linie) und Abnahme an der restlichen Zelloberfläche nach Iso- oder F/R-Inkubation für 30 min – 2 h. Jeder weiße bzw. blaue Pixel in der Überlagerung markiert einen Messpunkt mit Bindungsereignis. (B) Zur Objektivierung wurde der Verteilungsquotient, wie rechts dargestellt, als Quotient aus der Bindefrequenz in einem 10 Pixel breiten Bereich an der Zellgrenze (ZG) dividiert durch die Bindefrequenz an der restlichen Zelloberfläche (ZO) berechnet. (C) Die gesamte Anzahl der Bindungsereignisse pro Messbereich änderte sich nicht signifikant. (D) Im korrespondierenden Streudiagramm zeigt sich eine Zunahme der mittleren DSG2-Bindungskraft nach Iso- oder F/R-Inkubation. Jeder graue Punkt markiert die Bindungskraft eines Bindungsereignisses. Der blaue bzw. grüne Balken markiert den Mittelwert  $\pm$  SEM. [\*P < 0,05; (ns)P  $\geq$  0,05 im Vergleich zu Kontrolle. A - C: Maßstab = 1 µm, n = 6. D: n > 1.500 Bindungsereignisse aus 6 Messungen. Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

Um zu zeigen, dass die Spitzen-gebundenen DSG2-Moleküle spezifisch mit DSG2-Molekülen auf der Zelloberfläche interagieren, wurden AFM-Kraftmessungen auf HL-1-Zellen vor und nach Zugabe des monoklonalen, gegen die Extrazellulärdomäne 1 gerichteten, DSG2-spezifischen Antikörpers anti-DSG2-mRb durchgeführt. Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion der Bindungsfrequenz von  $0,23 \pm 0,01$  auf  $0,13 \pm 0,02$  nach Inkubation mit anti-DSG2-mRb (Abb. 10A). Führt man Messungen mit einer DSG2-funktionalisierten Spitze zellfrei auf einem DSG2-funktionalisierten Glimmer durch, zeigte sich ein ähnliches Verhältnis der Reduktion der Bindungsfrequenz auf  $60,6 \pm 9,7$  % der Kontrolle (Abb. 10B). Dies deutet an, dass das an die Spitze gekoppelte DSG2 größtenteils homophil mit DSG2 auf der Zelloberfläche interagiert. Zusammen mit den oben gezeigten Daten führt dies zu der Annahme, dass es durch adrenerge Stimulation zu einer Verschiebung von DSG2-Molekülen von der Zelloberfläche an die Zellgrenze sowie zu einer Zunahme der Bindungskräfte kommt.

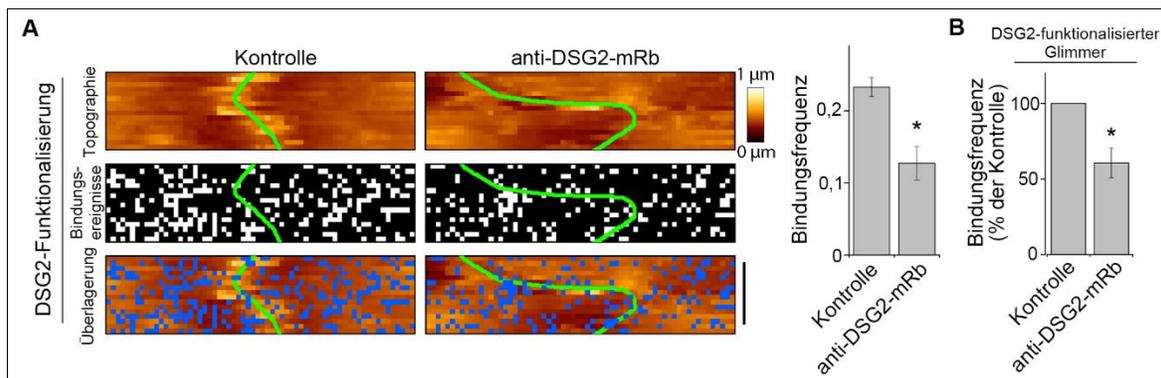


Abb. 10: DSG2-vermittelte Bindungsereignisse auf Zellen sind spezifisch  
 (A) Repräsentative AFM-Topographiebilder mit korrespondierender Bindungsereignisverteilung (links) und Bindungsfrequenzauswertung (rechts) zeigen eine signifikante Reduktion der DSG2-vermittelten Bindungen auf HL-1-Zellen durch den monoklonalen, gegen die Extrazellulärdomäne 1 gerichteten DSG2-Antikörper anti-DSG2-mRb. Die Zellgrenze ist jeweils durch eine grüne Linie markiert. Jeder weiße bzw. blaue Pixel markiert einen Messpunkt mit Bindungsereignis. (B) Derselbe Antikörper führt zellfrei, auf einem DSG2-beschichteten Glimmer, zu einer Reduktion der DSG2-vermittelten Bindungsereignisse im vergleichbaren Ausmaß. [\* $P < 0,05$  im Vergleich zu Kontrolle. A: Maßstab = 1  $\mu\text{m}$ ,  $n = 5$ . B:  $n = 3$ . Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

Koppelte man im Gegensatz dazu das Adhärensjunktion-Protein N-Cadherin statt DSG2 an die Messspitzen, konnten keine Veränderung der Verteilung der N-Cadherin-vermittelten Bindungsereignisse nach F/R-Behandlung festgestellt werden. Ebenso war der

Verteilungsquotient nicht deutlich verändert (Kontrolle  $1,00 \pm 0,12$ ; F/R  $1,18 \pm 0,13$ ) (Abb. 11).

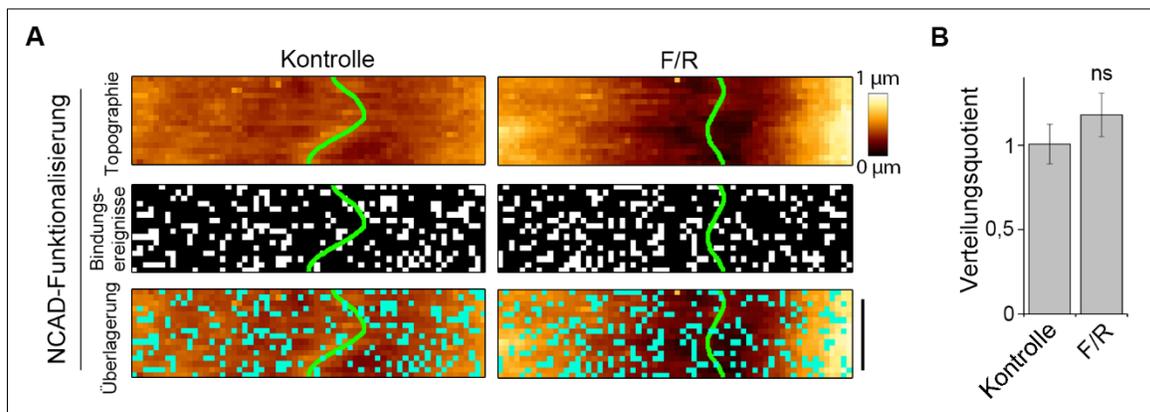


Abb. 11: Erhöhung des cAMP-Spiegels führt zu keiner Reorganisation von N-Cadherin-vermittelten Bindungsereignissen auf lebenden Kardiomyozyten

Repräsentative AFM-Topographiebilder mit korrespondierender Bindungsereignisverteilung (A) und Auswertung des Verteilungsquotienten (B) zeigen keine Veränderung der Verteilung von N-Cadherin-vermittelten Bindungsereignissen vor und nach F/R Inkubation für 30 min – 2 h. Die Zellgrenze wird jeweils durch eine grüne Linie markiert. Jeder weiße bzw. türkise Pixel in der Überlagerung markiert einen Messpunkt mit Bindungsereignis. [(ns)  $P \geq 0,05$  im Vergleich zu Kontrolle. Maßstab = 1  $\mu\text{m}$ ,  $n = 6$ . Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

### 3.2.2. Zunahme von desmosomalen Proteinen an den Zell-Zell-Junktionen

Zur weiteren Bestätigung der in den AFM-Messungen gezeigten Reorganisation von DSG2-Molekülen wurden Doppel-Immunfluoreszenzdarstellungen für DSG2 und N-Cadherin in HL-1-Zellen durchgeführt. Unter Kontrollbedingungen war hier die DSG2-Färbung unregelmäßig punktförmig an den Zellgrenzen verteilt. Interessanterweise zeigte sich, passend zu den Ergebnissen der AFM-Messungen, nach Iso- oder F/R-Inkubation für 1h eine deutliche Zunahme und Verlängerung der DSG2-Signale an den Zellgrenzen, während keine drastischen Veränderungen der N-Cadherin-Färbung, die stets linear an der kompletten Zellgrenze lokalisiert war, festzustellen waren (Abb. 12A).

Diese Beobachtungen wurden durch eine quantitative Analyse der Doppel-Immunfluoreszenzdarstellungen, wie in 2.2.4. beschrieben, bestätigt. So war eine Zunahme der DSG2-Färbung an den Zellgrenzen als Quotient zur Länge der N-Cadherin-Färbung von

0,18 ± 0,01 auf 0,31 ± 0,02 mit Iso- bzw. 0,31 ± 0,01 mit F/R-Behandlung messbar (Abb. 12B). Auch wurden die einzelnen DSG2-Signale länger, das heißt, von eher punktförmigen zu linienförmigen Signalen, mit Verlängerung von 388,1 ± 13,7 nm auf 487,8 ± 17,0 nm bzw. 620,7 ± 32,3 nm nach Inkubation mit Iso bzw. F/R (Abb. 12C). Die Länge des N-Cadherin-Signals pro Zelle änderte sich hingegen nicht signifikant (Kontrolle 56,3 ± 1,3 µm; Iso 59,3 ± 1,3 µm; F/R 56,7 ± 1,4 µm) (Abb. 12D).

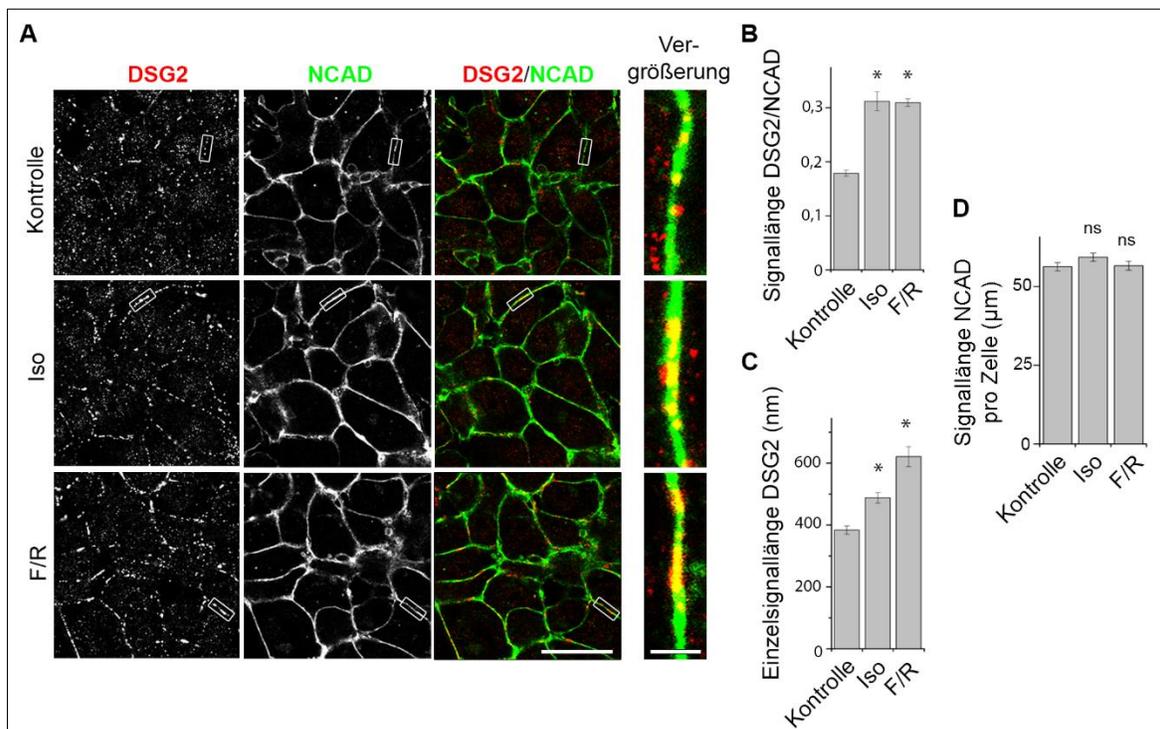


Abb. 12: Adrenerge Stimulation führt zu einer Zunahme und Verlängerung von DSG2-Immunfluoreszenzsignalen an den Zellgrenzen *in vitro*

(A) Repräsentative Aufnahmen der Doppel-Immunfluoreszenzdarstellung zeigen eine Zunahme und Verlängerung der DSG2-Signale an den Zellgrenzen nach Iso- oder F/R-Inkubation für 1 h, während bei der N-Cadherin-Färbung keine Unterschiede festzustellen sind. Die weißen Kästen markieren jeweils das Areal der Vergrößerung rechts. (B – D) präsentieren die korrespondierenden Auswertungen zu (A) mit Analyse der gesamten Länge der DSG2- (B) und N-Cadherin-Färbung (D) an der Zellgrenze pro Zelle, sowie die Länge der einzelnen DSG2-Signale (C). [\*P < 0,05; (ns) P ≥ 0,05 im Vergleich zu Kontrolle. A: Maßstab = 20 µm, Maßstab Vergrößerung = 2 µm, n = 3. B - D: n = 90 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten. Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

Um antikörperspezifische Effekte ausschließen zu können, wurden HL-1-Kardiomyozyten mit DNA codierend für grün fluoreszierendes DSG2-GFP transfiziert und analog zu den vorherigen Experimenten behandelt. Zur Untersuchung der Molekülverteilung auch auf der

Zelloberfläche wurden jeweils z-Stapel, also Reihenaufnahmen an derselben xy-Position mit einem definierten Abstand der Aufnahmen in z-Richtung, über die komplette Höhe der Zellen hinweg aufgenommen und zur Verbesserung der Auflösung anschließend dekonvolviert. Nach adrenerger Stimulation durch Iso oder F/R für 1 h zeigte sich auf Höhe der Zell-Zell-Kontakte eine Umverteilung der DSG2-GFP-Moleküle mit Zunahme und Verlängerung der Einzelsignale passend zu den Ergebnissen der Doppel-Immunfluoreszenzdarstellungen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der AFM-Experimente konnte nach Projektion der einzelnen Aufnahmen auf eine Ebene mit Farbcodierung der jeweiligen Höhe eine Zunahme der DSG2-Moleküle an den Zell-Zell-Kontaktzonen mit Abnahme der Signale auf den jeweils nahegelegenen Zelloberflächen nach adrenerger Stimulation festgestellt werden (Abb. 13).

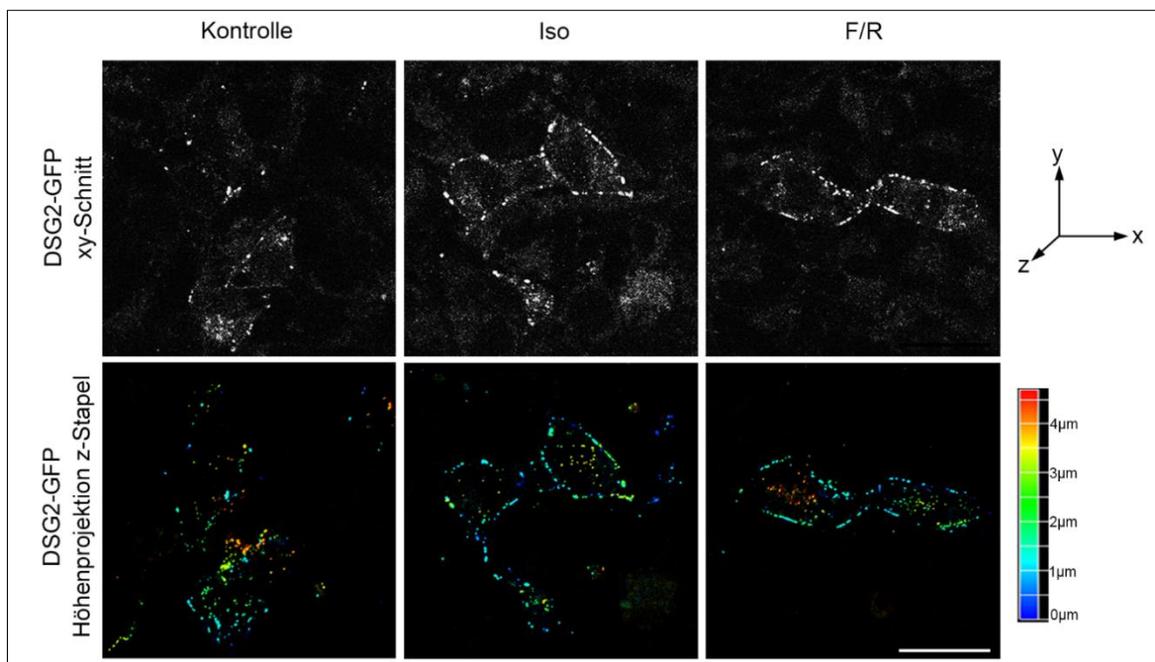


Abb. 13: Reorganisation von in HL-1-Zellen exprimierten DSG2-GFP-Molekülen durch adrenerge Stimulation

Sowohl in repräsentativen xy-Schnitten als auch in korrespondierenden, höhenprojizierten und farbkodierten z-Stapeln von DSG2-GFP exprimierenden HL-1-Zellen ist eine Zunahme von DSG2-GFP-Molekülen an der Zellgrenze nach Behandlung mit Iso oder F/R für 1 h erkennbar. Der Abstand der xy-Schnitte beträgt jeweils  $0,13 \mu\text{m}$  in z-Richtung. Zur höheren Auflösung wurde eine Dekonvolution der Stapel durchgeführt. Das Piktogramm zeigt die Orientierung der Bilder anhand der Raumachsen an. [Maßstab =  $20 \mu\text{m}$ ,  $n = 3$ . Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

Auch ultrastrukturell zeigte sich in von Dr. Eva Hartlieb durchgeführten transmissionselektronenmikroskopischen Experimenten eine Verlängerung der Zellkontakte nach Erhöhung der cAMP-Spiegel in HL-1-Kardiomyozyten (Schinner et al., 2017).

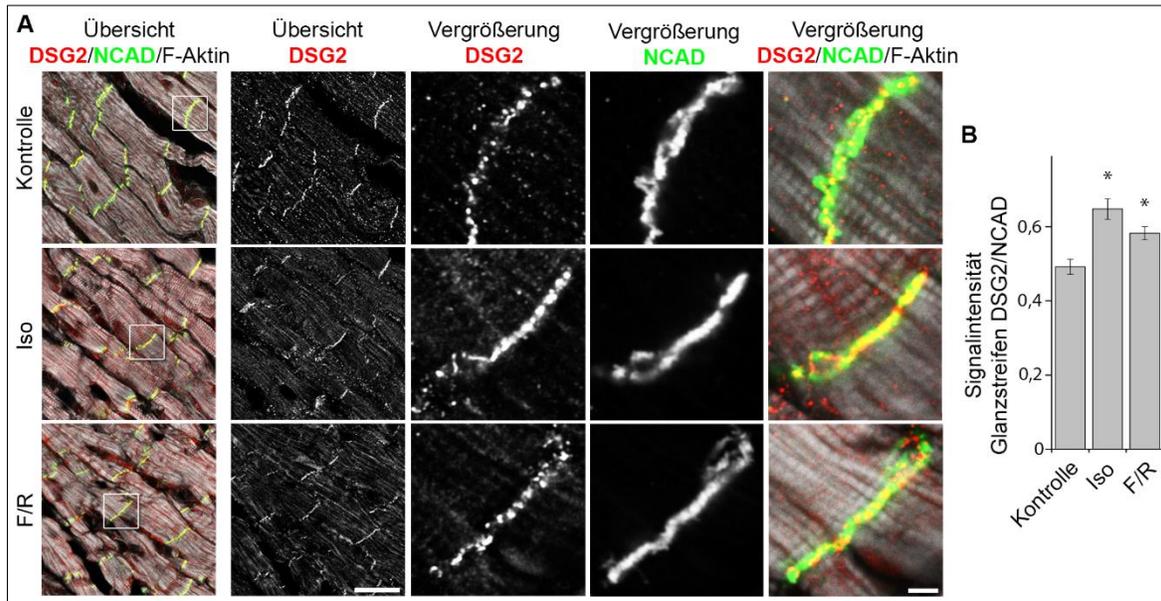


Abb. 14: Adrenerge Stimulation führt zu einer Zunahme und Verdichtung von DSG2-Immunfluoreszenzsignalen an den Glanzstreifen in murinen Herzschnitten *ex vivo*

(A) Die Inkubation mit Iso oder F/R für 1 h führt in kultivierten murinen Herzschnitten zu einer Verstärkung und Verdichtung der DSG2-Immunfluoreszenzsignale an den Glanzstreifen, gezeigt anhand von repräsentativen Übersichtsaufnahmen und Vergrößerung einzelner Glanzstreifen (weißer Kasten). Weiß: F-Aktin; Rot: DSG2; Grün: N-Cadherin. (B) Auswertung der Befunde in (A) mit Darstellung der Signalintensität von DSG2 in Bezug auf die Intensität der N-Cadherin-Färbung pro Glanzstreifen. [\*P < 0,05 im Vergleich zu Kontrolle. A: Maßstab Übersicht = 25  $\mu$ m, Maßstab Vergrößerung = 2,5  $\mu$ m,  $n = 3$ . B:  $n > 95$  Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten. B: Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

Die Zunahme der DSG2-Immunfluoreszenzsignale an den Zell-Zell-Kontakten konnte zusätzlich in kultivierten murinen Herzschnitten nach adrenerger Stimulation nachvollzogen werden. Die Behandlung mit Iso oder F/R für 1 h führte zu einer Verdichtung und Intensitätszunahme der DSG2-Signale an den Glanzstreifen (Abb. 14A). Im Gegensatz zur konstanten Intensität des an den Glanzstreifen nahezu linear formierten N-Cadherin-Signals war ein signifikanter Anstieg des Quotienten der Intensität des DSG2-Signals

bezogen auf das N-Cadherin-Signal an den Glanzstreifen nach Iso auf  $0,648 \pm 0,028$  und F/R auf  $0,583 \pm 0,018$  im Vergleich zur Kontrolle mit  $0,492 \pm 0,020$  messbar (Abb. 14B).

Zur Überprüfung, ob die Zunahme der DSG2-Moleküle an den Glanzstreifen nach Aktivierung des Sympathikus auch in einem intakten, physiologisch belasteten Herz vorhanden ist, wurden Mauserherzen isoliert und an einen externen Pufferkreislauf nach Langendorff (Langendorff, 1895; Bell et al., 2011) angeschlossen. Die Herzen wurden dann über 1h mit Iso im Vergleich zu reinem Puffer perfundiert und anschließend mittels Immunfluoreszenzdarstellung analysiert. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der murinen Schnittkultur zeigte sich auch im ganzen Herzen unter physiologischer Belastung eine Verstärkung der DSG2-Signale an den Glanzstreifen nach adrenerger Stimulation (Abb. 15).

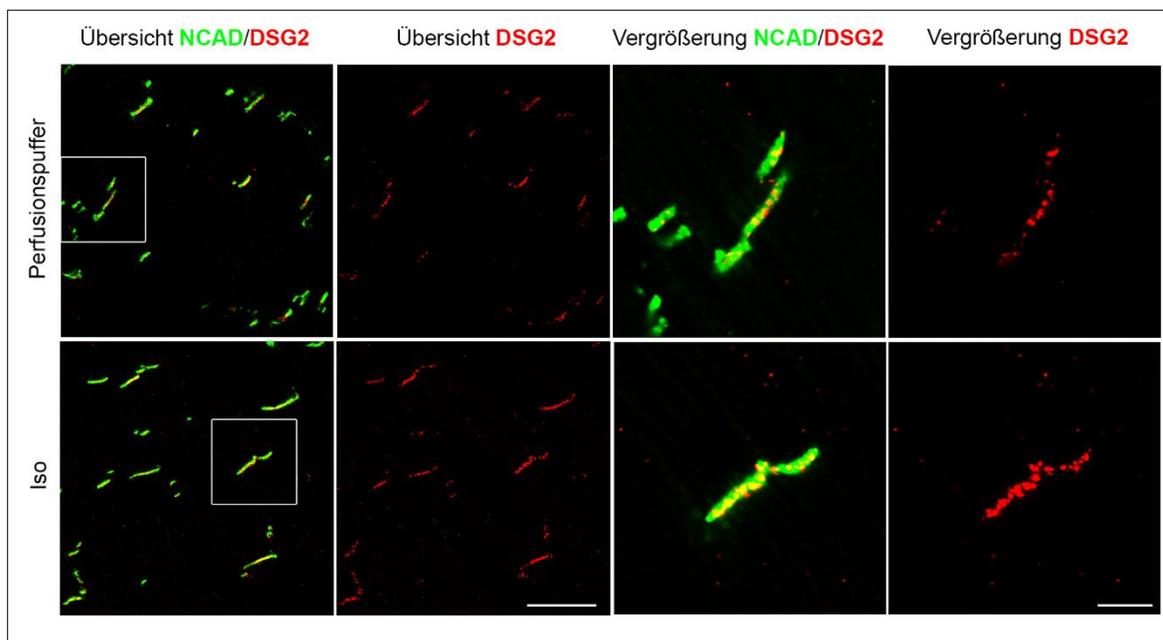


Abb. 15: Adrenerge Stimulation führt zu einer Zunahme von DSG2-Immunfluoreszenzsignalen an den Glanzstreifen in perfundierten murinen Herzen *ex vivo*

Repräsentative Aufnahmen von Doppel-Immunfluoreszenzdarstellungen für DSG2 und N-Cadherin zeigen, im Vergleich zur Perfusion mit Puffer über den gleichen Zeitraum ohne Mediatorenzugabe, eine Verdichtung und Intensitätszunahme der DSG2-Signale in Mauserherzen, die für 1 h mit Iso perfundiert wurden. Die weißen Kästen in der Übersichtsaufnahme markieren die jeweils vergrößert dargestellten Glanzstreifen. [Maßstab Übersicht = 20  $\mu\text{m}$ , Maßstab Vergrößerung = 5  $\mu\text{m}$ ,  $n = 3$ . Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

Die Gesamtheit dieser morphologischen Studien zeigt, dass es bei der positiven Adhäsotropie, korrelierend mit der Zunahme der Zell-Zell-Haftung, *in vitro* als auch *ex vivo* zu einer Reorganisation der Haftkontakte mit Zunahme von DSG2-Molekülen an den Zell-Zell-Junktionen kommt.

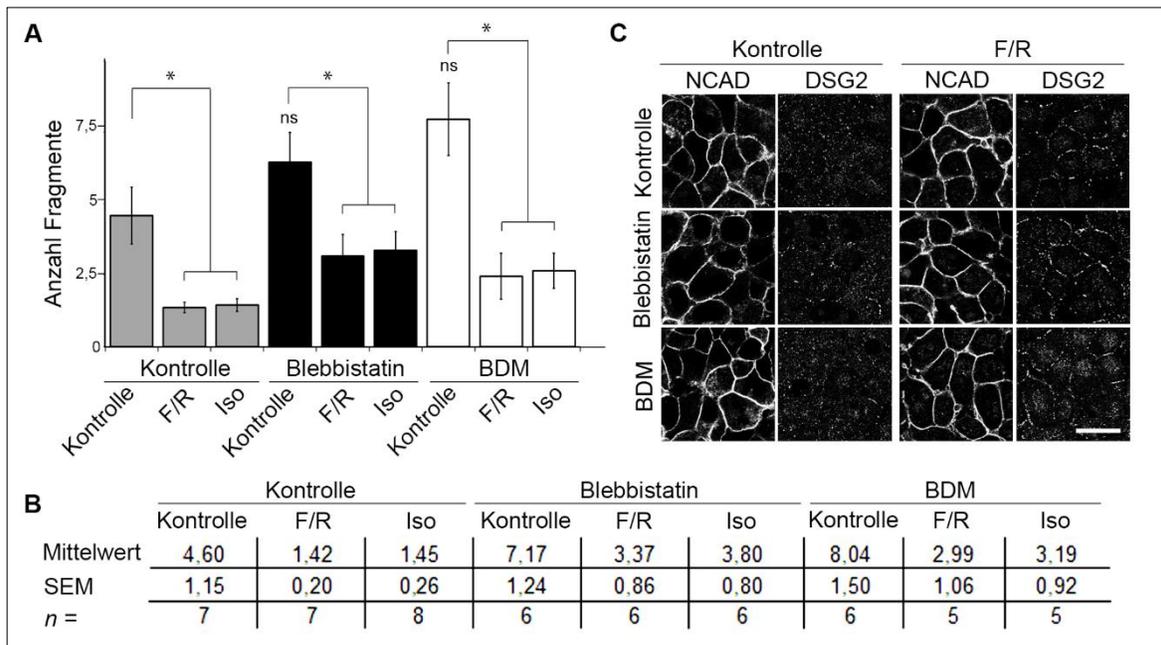


Abb. 16: Hemmung der Kontraktilität beeinflusst die positive Adhäsotropie nicht

Im Dissoziationsversuch (A, B) und in der Immunfluoreszenzdarstellung (C) sind nach Hemmung der Kontraktion via 15-minütiger Vorinkubation mit Blebbistatin oder BDM in HL-1-Zellen keine Veränderungen der positiv adhäsotropen Effekte mit Zunahme der interzellulären Haftung und DSG2-Reorganisation detektierbar. [A: Für *n*-Zahlen siehe Tabelle (B). C: Maßstab = 20  $\mu$ m, *n* = 3.]

Da adrenerge Stimulation bekannterweise im Herzen zu einer Zunahme der Kontraktionsfrequenz und -kraft führt (Triposkiadis et al., 2009), wurde im folgenden Schritt untersucht, ob die Erhöhung der Zellkohäsion von der Zunahme der Kontraktilität abhängig ist. Um dies zu testen, wurde die Kontraktion von HL-1-Zellen mittels der Myosin-II-ATPase-Inhibitoren 2,3-Butandion-monoxim (BDM) (Ostap, 2002) oder Blebbistatin (Farman et al., 2008) durch 15-minütige Inkubation verhindert, bevor die adrenerge Aktivierung mit Iso oder F/R für 1 h erfolgte. Durch Dissoziationsversuche und Immunfluoreszenzdarstellung wurde untersucht, ob durch diese Vorbehandlung eine Hemmung des positiv adhäsotropen Effektes feststellbar war. Jedoch war sowohl nach

Behandlung mit BDM als auch Blebbistatin weiterhin eine deutliche Reduktion der interzellulären Haftung mit Iso oder F/R, vergleichbar zu Werten ohne Vorinkubation, detektierbar (Abb. 16A, für Einzelwerte siehe Abb. 16B). Auch morphologisch konnte keine Beeinflussung der Verstärkung der DSG2-Signale an den Zell-Zell-Junktionen festgestellt werden (Abb. 16C). Diese Daten führten zu der Hypothese, dass der Effekt der positiven Adhäsotropie nicht sekundär über eine Erhöhung der mechanischen Belastung vermittelt wird.

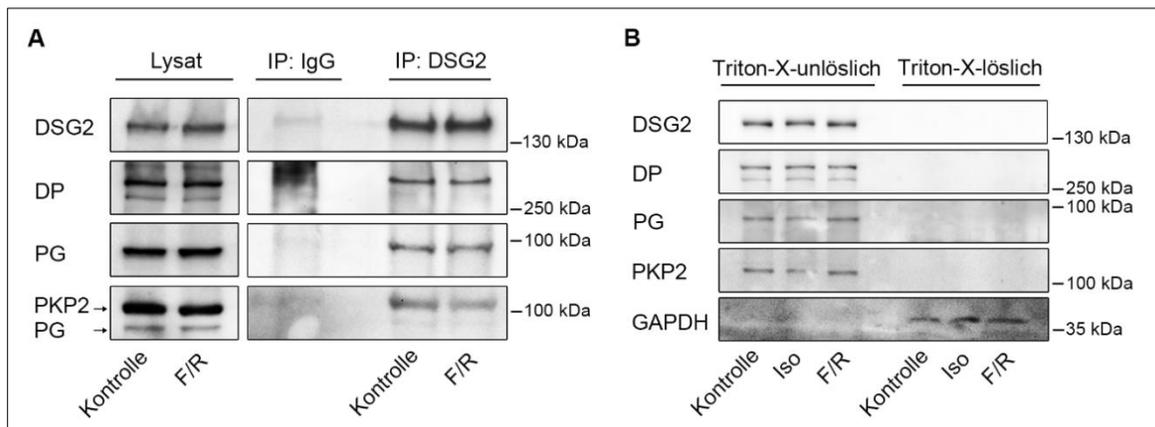


Abb. 17: Adrenerge Stimulation hat keinen Effekt auf die Expression und Zytoskelettverankerung desmosomaler Proteine

(A) Die repräsentative Immunpräzipitation (IP) in HL-1-Zelllysaten zeigt keine Veränderung der entsprechenden Proteinmengen von DSG2, DP, PG und PKP2 sowohl im gesamten Lysat als auch der co-immunpräzipitierten Proteine nach DSG2-IP mit oder ohne F/R-Behandlung für 1 h. Die IP mit einer IgG-Fraktion aus Kaninchenserum (IgG) diente als Negativkontrolle für die antikörpervermittelte DSG2-IP, um unspezifische Antikörperbindungen auszuschließen. (B) Mittels Triton-X-100-vermittelter Proteinauftrennung in zytoskelettal-gebundene, unlösliche und nicht-gebundene, lösliche Proteine waren keine Unterschiede der Proteinverteilung von DP, DSG2, PKP2 und PG nach Behandlung mit Iso oder F/R für 1 h feststellbar. GAPDH als zytosolisches Protein diente als Lade- und Separationskontrolle für die Triton-X-100-lösliche Fraktion. [A:  $n = 4$ . B:  $n = 3$ . Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

Um die zugrundeliegenden Mechanismen der positiven Adhäsotropie aufzuklären, wurde als nächster Schritt eine Western Blot-Analyse zur Detektion der gesamten Proteinexpression verschiedener desmosomaler Proteine und zusätzlich eine Immunpräzipitation von DSG2 mit Untersuchung der Interaktionspartner abhängig von einer Inkubation mit F/R für 1h durchgeführt. Zudem ist eine Umverteilung oder Änderung der Interaktionspartner und zytoskelettalen Verankerung desmosomaler Proteine als

möglicher Mechanismus zur Regulation der Zellkohäsion aus Keratinozytenversuchen bekannt (Dehner et al., 2014; Rotzer et al., 2014). Daher wurde die zytoskelettale Verankerung verschiedener desmosomaler Moleküle abhängig von adrenerger Stimulation mittels Triton-X-100-vermittelter Proteinfractionierung untersucht, bei der an das Zytoskelett gebundene, unlösliche und nicht an das Zytoskelett gebundene, also lösliche Proteine, separiert werden. Allerdings konnten sowohl in der gesamten Proteinexpression als auch nach Aufreinigung von DSG2 und seinen Interaktionspartner aus HL-1-Zelllysaten mittels Immunpräzipitation keine Unterschiede in der Menge der an DSG2-gebundenen Proteine DP, PG und PKP2 mit und ohne cAMP-Spiegelerhöhung festgestellt werden (Abb. 17A). Auch konnten mittels Triton-X-100-Proteinfractionierung keine Veränderungen bei DP, DSG2, PKP2 und PG in Bezug auf die Verankerung am Zytoskelett detektiert werden (Abb. 17B). Diese Ergebnisse deuten zusammen an, dass bei der positiven Adhäsotropie keine Veränderung der Zusammensetzung und Verankerung der desmosomalen Komplexe auftritt.

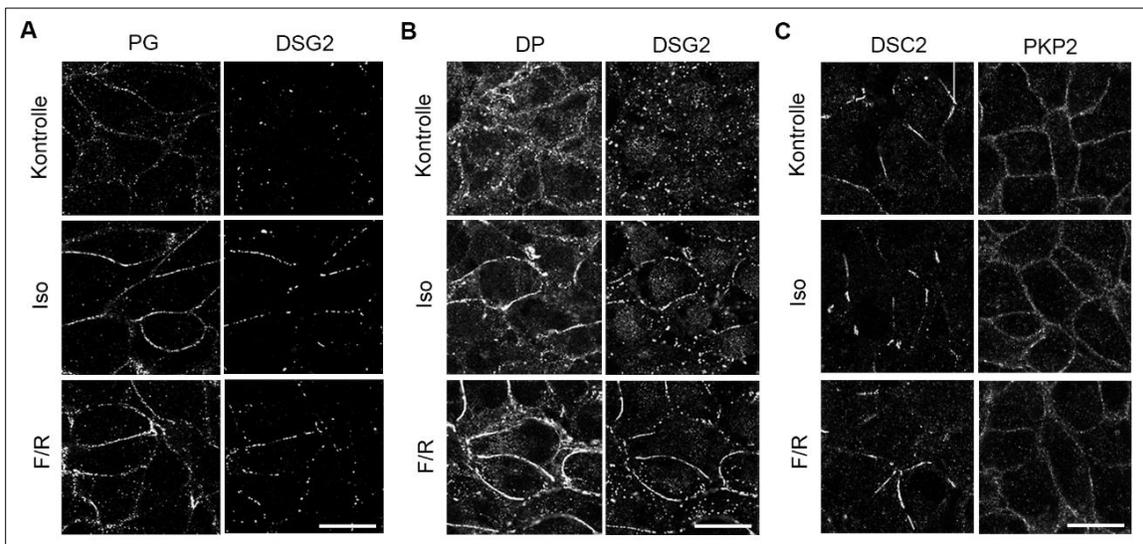


Abb. 18: Zunahme von PG- und DP-Fluoreszenzsignalen an den Zell-Zell-Junktionen parallel zu DSG2 durch adrenerge Stimulation

(A, B) In repräsentativen Aufnahmen der Doppel-Immunfluoreszenzdarstellung ist eine Intensivierung und Verlängerung der PG- und DP-Signale parallel zur Zunahme der DSG2-Färbung an der Zellgrenze nach Behandlung mit Iso oder F/R für jeweils 1 h erkennbar. Zur besseren Auflösung wurden für (A) z-Stapel mit einem Bildabstand von 0,13  $\mu\text{m}$  aufgenommen und anschließend dekonvolutiert. (C) Für DSC2 und PKP2 kann keine morphologischen Veränderungen nach gleicher Behandlung detektiert werden. [Maßstab = 15  $\mu\text{m}$ .  $n = 3$ . Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

Daher folgte als nächstes eine genauere morphologische Untersuchung der Lokalisationen der desmosomalen Plaqueproteine PG, DP und PKP2. Hier konnte gezeigt werden, dass neben der Zunahme und Verlängerung von DSG2-Signalen nach Iso- oder F/R-Inkubation eine Zunahme der PG- und DP-Signalen an den Zell-Zell-Kontakten auftrat (Abb. 18A, B). Für DSC2 und PKP2 hingegen waren keine Veränderungen feststellbar (Abb. 18C).

In Kombination mit den vorher gezeigten Daten, dass keine Veränderung der Interaktion von DSG2 mit PG bzw. DP auftritt, deuten diese Ergebnisse an, dass DSG2, gebunden an PG und DP, an die Zellgrenze verlagert wird, um möglicherweise die Zell-Zell-Haftung als Antwort auf den adrenergen Aktivierungszustand zu stabilisieren.

### **3.3. Positive Adhäsiotropie ist abhängig von Plakoglobin**

#### **3.3.1. Charakterisierung der herzspezifischen Plakoglobin-defizienten Mauslinie**

Das Plaqueprotein PG koppelt die Intrazellulärdomäne der desmosomalen Cadherine an DP und ist so ein essentieller Baustein der Desmosomen (Delva et al., 2009). Mutationen in diesem Protein können zu arrhythmogene Kardiomyopathie führen (Corrado et al., 2017). Bei dieser Krankheit kann es aber auch bei Mutationen in anderen desmosomalen Proteinen zu einer Dysregulation von PG kommen (Asimaki et al., 2009; Kant et al., 2016). Da PG laut den gezeigten Ergebnissen auch eine mögliche Rolle bei der positiven Adhäsiotropie spielen könnte, wurde als nächster Schritt eine herzspezifische Defizienz für PG (PG-KO) in der Maus, ähnlich zu zwei anderen bereits veröffentlichten PG-KO-Modellen (Li et al., 2011a; Li et al., 2011b), etabliert.

Phänotypisch zeigten die Herzen der PG-KO-Mäuse die typischen Charakteristika der arrhythmogenen Kardiomyopathie mit zunehmendem Verlust von Kardiomyozyten und fibrotisch-narbigen Umbauten (Corrado et al., 2017) (Abb. 19A). Auch war eine Dilatation der Ventrikel mit deutlicher Hypertrophie der Kardiomyozyten bei adulten Mäusen nachweisbar. Diese Veränderungen prägten sich mit zunehmendem Alter vermehrt aus. So zeigten 2 Wochen alte PG-KO-Mäuse mit einem Anteil von  $6,4 \pm 1,0$  % Bindegewebe im Ventrikel im Vergleich zu WT-Geschwistertieren mit  $5,2 \pm 1,1$  % noch keine Fibrose. Die

Herzen adulter PG-KO-Mäuse mit einem Alter von 11 Wochen wiesen hingegen große fibrotische Areale auf. In der Azan-Färbung waren  $29,3 \pm 1,8$  % des gesamten Ventrikelgewebes im Vergleich zu  $2,8 \pm 0,8$  % bei WT-Mäusen bindegewebig verändert (Abb. 19B).

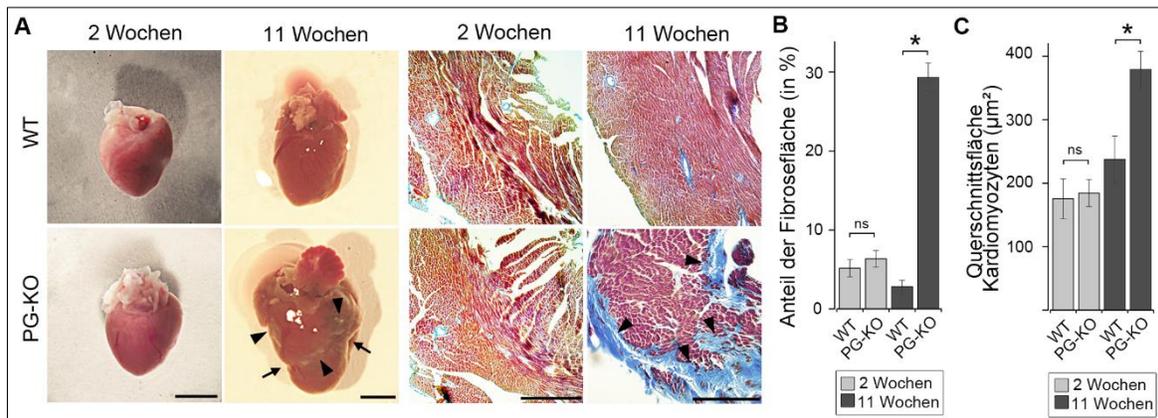


Abb. 19: Die Herzen von PG-KO-Mäuse zeigen die Charakteristika der arrhythmogenen Kardiomyopathie

(A) Repräsentative Aufnahmen von PG-KO- und korrespondierenden WT-Herzen zeigen eine makroskopisch sichtbare Dilatation und Fibrose bei einem 11 Wochen alten PG-KO-Herz, wohingegen das 2 Wochen alte PG-KO-Herz noch keine sichtbaren Veränderungen im Vergleich zum WT-Herz zeigt. Pfeile deuten auf dysmorphe Bereiche, Pfeilspitzen auf sichtbare Fibrosen. Auf der rechten Seite zeigen Azan-Färbungen derselben Herzen den Verlust von Kardiomyozyten (rot gefärbt) mit Ersatz durch fibrotisches Gewebe (Pfeilspitzen, blau gefärbt) in 11 Wochen alten PG-KO-Myokard, während keine vermehrte Fibrose in 2 Wochen altem Gewebe feststellbar ist. (B) Analyse des Bindegewebsanteils in 2 und 11 Wochen alten PG-KO- im Vergleich zu WT-Herzen wie in (A) gezeigt. (C) Objektivierung der kardialen Hypertrophie in 11 Wochen alten PG-KO-Mäusen als Querschnittsfläche der Kardiomyozyten. [ $*P < 0,05$ , (ns) $P \geq 0,05$  im Vergleich zu WT. A: Maßstab Makroskopie = 2,5 mm, Maßstab Histologie = 300  $\mu\text{m}$ ,  $n =$  je 3 Mäuse. B:  $n =$  je 3 Mäuse mit je 3 Schnitten. C:  $n =$  je 3 Mäuse mit je 100 Kardiomyozyten. Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

Ähnlich verhielt es sich mit dem Grad der Kardiomyozyten-Hypertrophie, wobei die Querschnittsfläche der einzelnen Kardiomyozyten im Alter von 2 Wochen mit  $175,5 \pm 31,3$   $\mu\text{m}^2$  bei WT und  $184,6 \pm 21,4$   $\mu\text{m}^2$  bei PG-KO noch vergleichbar waren. Im Alter von 11 Wochen war eine deutliche Größenzunahme der PG-KO-Kardiomyozyten mit einem Querschnitt von  $379,3 \pm 28,7$   $\mu\text{m}^2$  im Vergleich zu  $237,4 \pm 36,9$   $\mu\text{m}^2$  bei WT-Tieren, erkennbar (Abb. 19C).

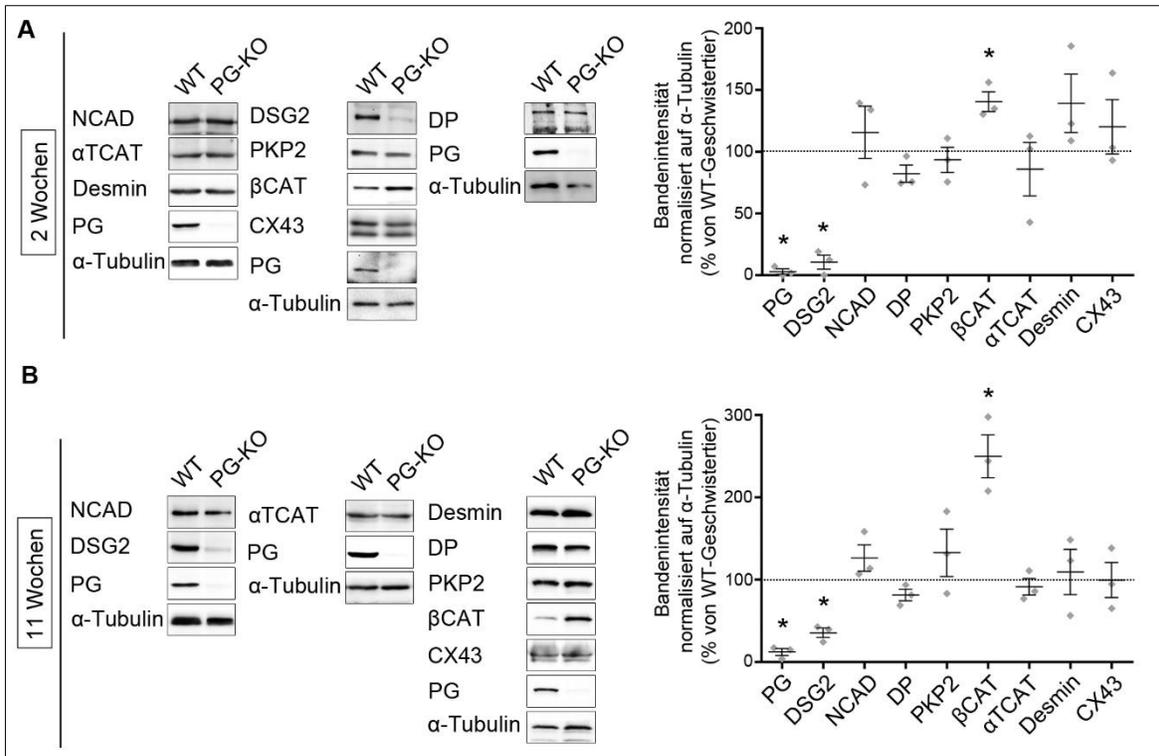


Abb. 20: Charakterisierung der Proteinexpression in 2 und 11 Wochen alten PG-KO-Mäusen  
 Das mittels Western Blot-Analyse bestimmte Protein-Expressionsprofil von Glanzstreifenmolekülen mit korrespondierender Analyse der Bandenintensitäten in 2 Wochen (A) und 11 Wochen alten (B) PG-KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Geschwistertieren zeigt eine signifikante Reduktion von PG mit einer Verminderung von DSG2 und Vermehrung von  $\beta$ -Catenin, während die restlichen Proteine keine Veränderungen aufweisen.  $\alpha$ -Tubulin dient als Ladekontrolle. Jede Raute im Streudiagramm repräsentiert den Wert eines PG-KO/WT-Pärchens. Rechts sind jeweils repräsentative Western Blot-Aufnahmen zu den densitometrischen Analysen links abgebildet. [\* $P < 0,05$  im Vergleich zu WT Geschwistertier.  $n = 3$  Mäuse je Kondition. Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

Obwohl bei 2 Wochen alten PG-KO-Herzen noch keine histologischen Veränderungen feststellbar waren, führte der Verlust von PG auf der Ebene der Proteinexpression ( $3,1 \pm 2,2$  % des WT) zu einer signifikanten Reduktion der DSG2-Menge ( $10,7 \pm 5,6$  % des WT), während andere Glanzstreifenproteine nicht signifikant verändert exprimiert wurden (Bandenintensität: N-Cadherin  $115,7 \pm 21,2$ ; DP  $82,3 \pm 7,1$ ; PKP2  $93,5 \pm 10,2$ ;  $\alpha$ T-Catenin  $86,1 \pm 21,7$ ; Desmin  $139,2 \pm 23,6$ ; CX43  $120,3 \pm 22,0$  jeweils % von WT-Geschwistertier) (Abb. 20A). Nur die Menge an  $\beta$ -Catenin war in PG-KO-Mäusen deutlich vermehrt ( $140,7 \pm 8,0$  % des WT) - vermutlich als Kompensationsmechanismus für den Verlust von PG. Adulte PG-KO-Mäuseherzen im Alter von 11 Wochen wiesen Expressionsmuster vergleichbar zu 2 Wochen alten Tieren mit deutlicher Reduktion von PG und DSG2 und Zunahme von  $\beta$ -

Catenin auf (Bandenintensität: PG  $12,3 \pm 4,0$ ; DSG2  $35,7 \pm 5,6$ ; N-Cadherin  $126,5 \pm 16,1$ ; DP  $81,5 \pm 7,2$ ; PKP2  $132,9 \pm 28,8$ ;  $\beta$ -Catenin  $250,0 \pm 26,1$ ;  $\alpha$ T-Catenin  $91,5 \pm 10,1$ ; Desmin  $109,5 \pm 27,5$ ; CX43  $99,6 \pm 21,2$  jeweils % von WT-Geschwistertier) (Abb. 20B).

Diese Veränderungen der Proteinmengen waren auch morphologisch an den Glanzstreifen feststellbar. So war das DSG2-Immunfluoreszenzsignal in 2 und 11 Wochen alten Herzen mit PG-Defizienz (2 Wochen  $4,1 \pm 0,8$  bzw. 11 Wochen  $4,0 \pm 1,6$ , jeweils % von WT-Geschwistertier) an den Glanzstreifen deutlich reduziert (2 Wochen  $3,9 \pm 0,6$  bzw. 11 Wochen  $9,2 \pm 2,8$  jeweils % von WT), wohingegen  $\beta$ -Catenin dort verstärkt zu finden war (2 Wochen  $128,2 \pm 4,4$  bzw. 11 Wochen  $146,3 \pm 9,1$  jeweils % von WT). Bei allen anderen untersuchten Glanzstreifenproteinen konnte kein Unterschied in der Intensität an den Zell-Zell-Kontakten detektiert werden (2 Wochen: N-Cadherin  $103,6 \pm 1,9$ ; DP  $90,9 \pm 4,3$ ; PKP2  $102,9 \pm 5,5$ ;  $\alpha$ T-Catenin  $96,8 \pm 17,7$ ; Desmin  $87,7 \pm 11,7$ ; CX43  $104,2 \pm 19,0$ ; DSC2  $110,6 \pm 7,4$  bzw. 11 Wochen: N-Cadherin  $114,0 \pm 14,5$ ; DP  $104,3 \pm 10,1$  PKP2  $105,9 \pm 17,0$ ;  $\alpha$ T-Catenin  $90,8 \pm 12,5$ ; Desmin  $118,8 \pm 23,0$ ; CX43  $107,7 \pm 12,2$  jeweils % von WT-Geschwistertier) (Abb. 21).

Diese Ergebnisse deuten an, dass PG für die richtige Lokalisation und Regulation des Proteinumsatzes besonders von DSG2 wichtig zu sein scheint. Außerdem tritt eine Veränderung der desmosomalen Zusammensetzung in PG-KO-Herzen schon vor den charakteristischen histologischen Veränderungen auf.

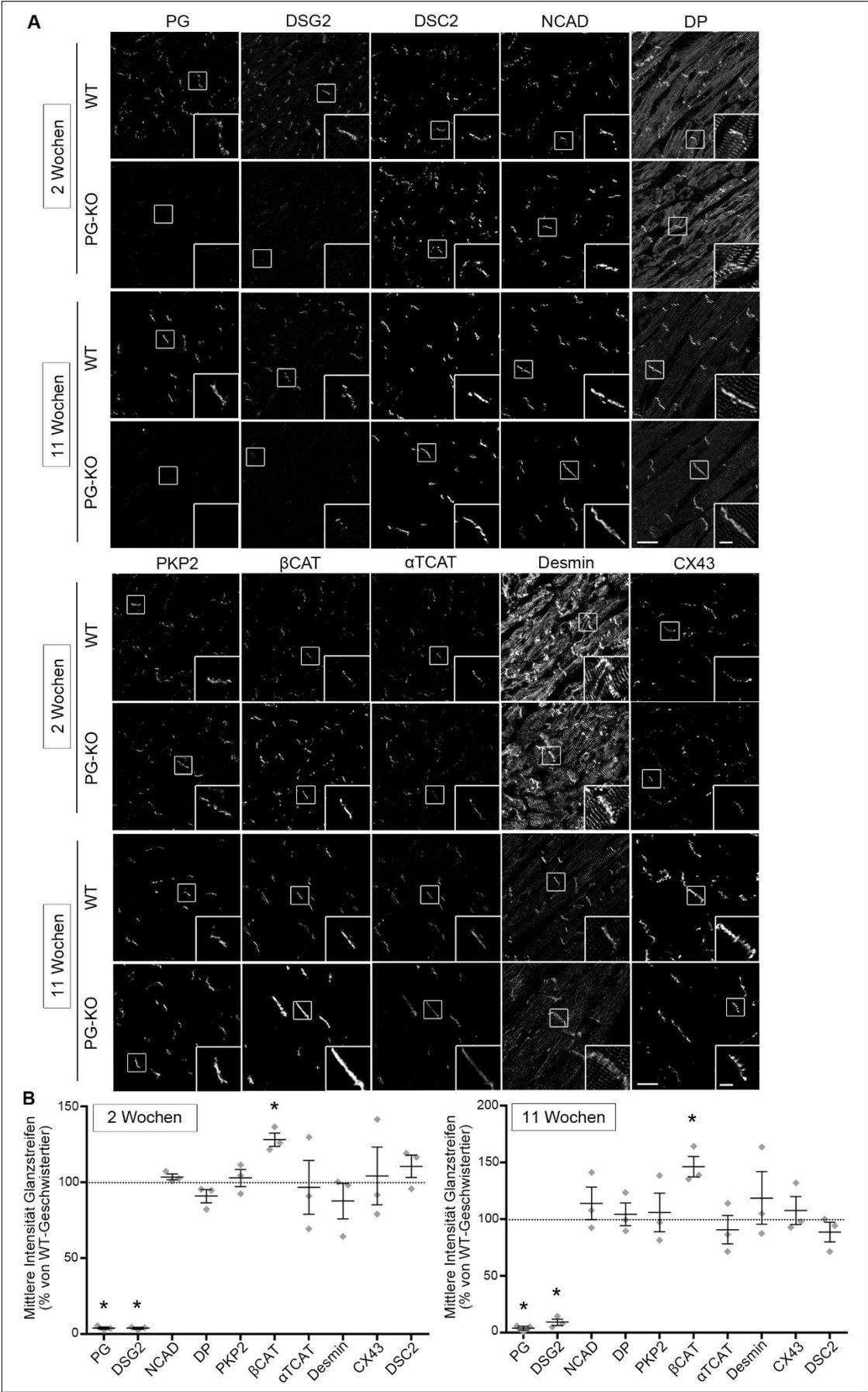


Abb. 21: Charakterisierung der Glanzstreifenproteine in 2 und 11 Wochen alten PG-KO-Mäusen (A) Die repräsentative Immunfluoreszenzdarstellung von Glanzstreifenproteinen mit korrespondierender Analyse der Signalintensität an den Zell-Zell-Kontakten (B) in 2 Wochen und 11 Wochen alten PG-KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Geschwistertieren zeigt einen deutlichen Verlust von PG mit einer Reduktion von DSG2 und Vermehrung von  $\beta$ -Catenin, während die restlichen Proteine keine Veränderungen aufweisen. Die weißen Kästen markieren den jeweils in der unteren rechten Ecke des Übersichtsbildes vergrößerten Glanzstreifen. Jede graue Raute im Streudiagramm repräsentiert den Mittelwert von je 30 analysierten Glanzstreifen eines PG-KO-Tieres dargestellt als Prozent des korrespondierenden WT-Tiers. [\*P < 0,05 im Vergleich zu WT-Geschwistertier. A: Maßstab Übersicht = 20  $\mu$ m, Maßstab Vergrößerung = 5  $\mu$ m. B: n = 3 Mäuse je Kondition. Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

### 3.3.2. Plakoglobin-Abhängigkeit der positiven Adhäsotropie

Um die Bedeutung des Plaqueproteins PG für die positive Adhäsotropie zu untersuchen, wurden Dissoziationsversuche sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* mit und ohne Erhöhung der cAMP-Spiegel durch F/R-Behandlung für 1 h durchgeführt. So konnte in HL-1-Zellen, deren PG-Proteinspiegel durch Transfektion mit siPG spezifisch reduziert wurde, im Vergleich zu Zellen, die mit unspezifischer siNT behandelt wurden, ein basaler Haftungsverlust durch die Verminderung von PG mit Zunahme der Fragmentanzahl von  $7,2 \pm 0,7$  auf  $15,4 \pm 3,1$  festgestellt werden. In siPG-behandelten Zellen war allerdings kein signifikanter Anstieg der interzellulären Haftung durch Erhöhung der cAMP-Spiegel mittels F/R (Fragmentanzahl:  $86,2 \pm 19,0$  % von Kontrolle siPG) verglichen zu siNT-behandelten Zellen (Fragmentanzahl:  $47,7 \pm 11,3$  % von Kontrolle siNT) mehr nachzuweisen (Abb. 22A). Interessanterweise zeigten mit siPG-behandelte Kardiomyozyten übereinstimmend mit den Befunden aus den PG-KO-Herzen in Western Blot-Experimenten neben der signifikanten Verminderung der PG-Spiegel (Quotient von siNT:  $0,57 \pm 0,10$ ) auch eine Verminderung der DSG2-Spiegel (Quotient von siNT:  $0,69 \pm 0,06$ ) (Abb. 22B).

Die *ex vivo*-Dissoziationsversuche wurden parallel in 2 Wochen alten PG-KO- und WT-Herzen vor Einsetzen der Fibrose und Hypertrophie durchgeführt, um sekundäre Effekte durch die histologischen Veränderungen zu minimieren. In PG-KO- verglichen zu WT-Herzsnitten war hierbei, entsprechend zu den Ergebnissen *in vitro*, die Reduktion der Anzahl der herausgelösten Einzelkardiomyozyten durch 1-stündige Iso- oder F/R-Inkubation signifikant aufgehoben (WT: Iso  $68,1 \pm 4,7$ ; F/R  $47,0 \pm 3,5$  bzw. PG-KO: Iso  $97,6$

$\pm 7,8$ ; F/R  $93,6 \pm 8,6$  jeweils % der jeweiligen Kontrolle) (Abb. 22C). In diesem Modell waren hingegen keine signifikanten Unterschiede in der basalen Zellkohäsion zwischen PG-KO ( $26,0 \pm 4,0$  Einzelkardiomyozyten) und WT ( $27,3 \pm 4,6$  Einzelkardiomyozyten) messbar.

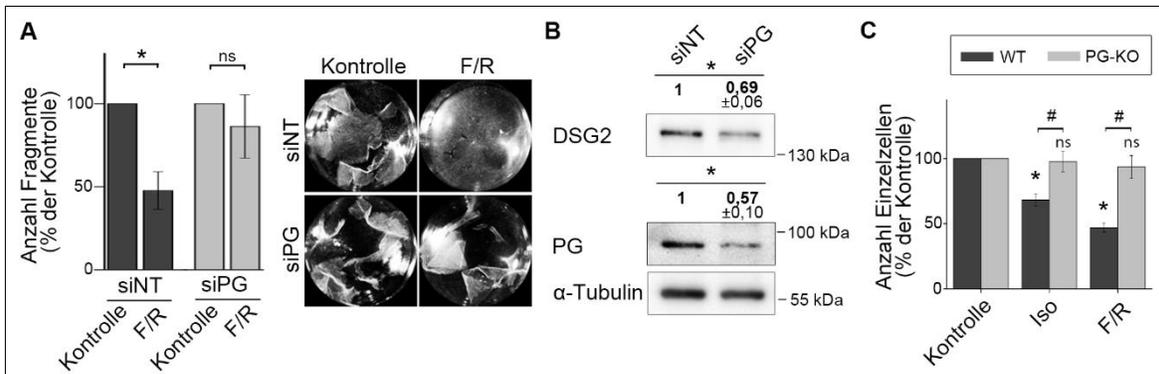


Abb. 22: Die Zunahme der interzellulären Haftung nach adrenerger Stimulation ist abhängig von PG. Die Zunahme der interzellulären Haftung von siNT-behandelten HL-1-Zellen im Dissoziationsversuch nach Inkubation mit F/R für 1 h ist nach Reduktion der PG-Spiegel mittels siPG aufgehoben. Die Aufnahmen auf der rechten Seite zeigen repräsentative Zellverbände nach Applikation von mechanischem Stress. (B) Korrespondierende Western Blot-Analyse zur Überprüfung der Effizienz der PG-Reduktion mit Auswirkungen auf die DSG2-Expression durch siPG. Die Menge anderer desmosomaler Proteine war unverändert (nicht gezeigt). Die Werte über den jeweiligen Banden geben die densitometrische Auswertung der Bandenintensität als Quotient von siNT, jeweils bezogen auf die Ladekontrolle  $\alpha$ -Tubulin, wieder. (C) Adrenerge Stimulation mit Iso oder F/R für 1 h reduziert die Anzahl der aus WT-Schnitten herausgelösten Kardiomyozyten in Dissoziationsversuchen *ex vivo*, während keine Reduktion der Anzahl der herausgelösten Zellen unter gleichen Konditionen bei PG-KO-Schnitten nachweisbar ist. [A: \*P < 0,05; (ns)P  $\geq$  0,05; n = 8 siNT; n = 6 siNT + F/R; n = 7 siPG; n = 6 siPG + F/R. B: \*P < 0,05; n = 5. C: 3 Mäuse WT, n = 7 für Kontrolle, Iso; n = 6 F/R; 4 Mäuse Pg KO, n = 9 für Kontrolle, Iso; n = 8 F/R. Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

Diese Daten deuten insgesamt an, dass der positive adhäsotrope Effekt auf die Zell-Zell-Haftung sowohl in kultivierten Herzschnitten als auch in HL-1-Zellen abhängig von der Expression von PG ist.

Parallel zu funktionellen Experimenten wurden in HL-1-Kardiomyozyten auch Immunfluoreszenzdarstellungen mit dem Ziel durchgeführt, den Einfluss der PG-Verminderung auf die Zunahme von DSG2-Molekülen an den Zell-Zell-Junktionen durch adrenerge Stimulation zu untersuchen. Wie aus den oben gezeigten Western Blot-Studien und Immunfluoreszenz-Daten der PG-KO-Mäuse zu erwarten, war die basale Menge von DSG2 an den Zellgrenzen in siPG-behandelten Zellen deutlich vermindert (Signallänge DSG2/Membran: Kontrolle siNT  $0,054 \pm 0,006$ ; Kontrolle siPG  $0,011 \pm 0,001$ ) (Abb. 23). Auch

die Zunahme der DSG2-Signale an den Zell-Zell-Kontaktzonen durch F/R-Inkubation über 1 h konnte in siPG-behandelten Zellen im Vergleich zu siNT-Zellen nicht rekapituliert werden (Signallänge DSG2/Membran: siNT + F/R  $0,170 \pm 0,015$ ; siPG + F/R  $0,013 \pm 0,001$ ).

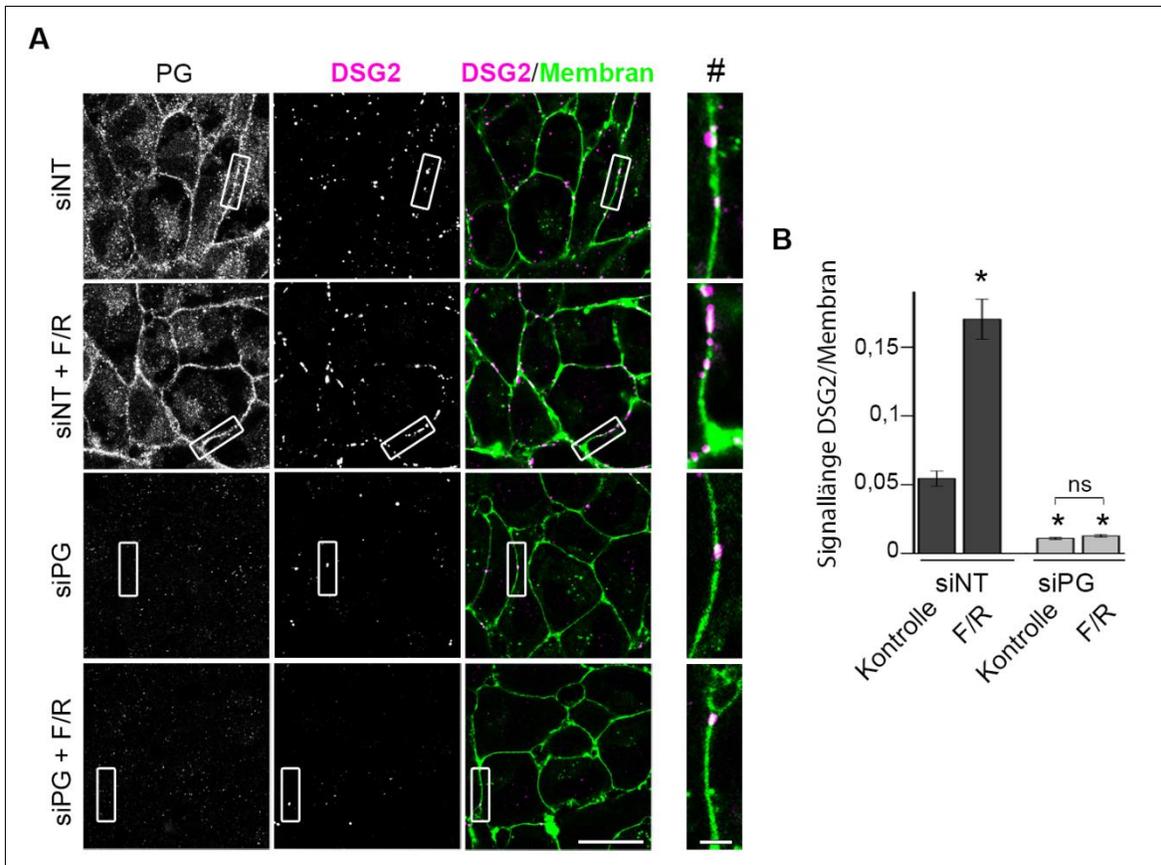


Abb. 23: Die Zunahme von DSG2-Signalen an den Zellgrenzen nach cAMP-Spiegelerhöhung wird durch Reduktion der PG-Expression verhindert

(A) Repräsentative Aufnahmen der Dreifach-Immunfluoreszenzdarstellung zeigen eine basal verminderte DSG2-Signanzahl in siPG- im Vergleich zu siNT-behandelten HL-1-Zellen. Nach F/R-Inkubation für 1 h ist die Zunahme der DSG2-Färbung an der Zellmembran in Zellen mit vermindertem PG gegenüber siNT-Zellen aufgehoben. Die weißen Kästen markieren jeweils das Areal der Vergrößerung (#) rechts. (B) zeigt die korrespondierende Auswertung zu (A) mit Analyse der DSG2-Signale an den Zellgrenzen als Quotient aus der gesamten DSG2-Signallänge und der Länge der Zellmembran. Die Zellmembran wurde vor Fixation der Zellen mit Sulfo-NHS-Biotin markiert und mit Streptavidin-ALEXA 488 detektierbar gemacht. [\*P < 0,05 im Vergleich zu siNT Kontrolle; (ns)P ≥ 0,05. Maßstab Übersicht = 15 µm, Maßstab Vergrößerung = 1 µm. B, C: n = 90 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten.]

Anschließend wurde die DSG2-Reorganisation nach PG-Verminderung mit AFM-Messungen auf vitalen Zellen untersucht. Um Zellen mit reduzierten PG-Spiegeln für die Messung identifizieren zu können, wurde siPG bzw. siNT an den rot fluoreszierenden

Cyaninfarbstoff Cy3 gekoppelt und in HL-1-Zellen transfiziert. Wie durch die Immunfluoreszenzdarstellungen bestätigt, haben die Zellen, welche Cy3-siPG enthalten, nach dieser Behandlung reduzierte PG-Spiegel verglichen zu Cy3-siNT enthaltenden Zellen oder Zellen ohne Cy3-Markierung (Abb. 24A). Für AFM-Messungen wurden jeweils die Zellgrenzen zweier Cy3-siRNA enthaltender HL-1-Kardiomyozyten aufgesucht, wie in Abb. 24B gezeigt.

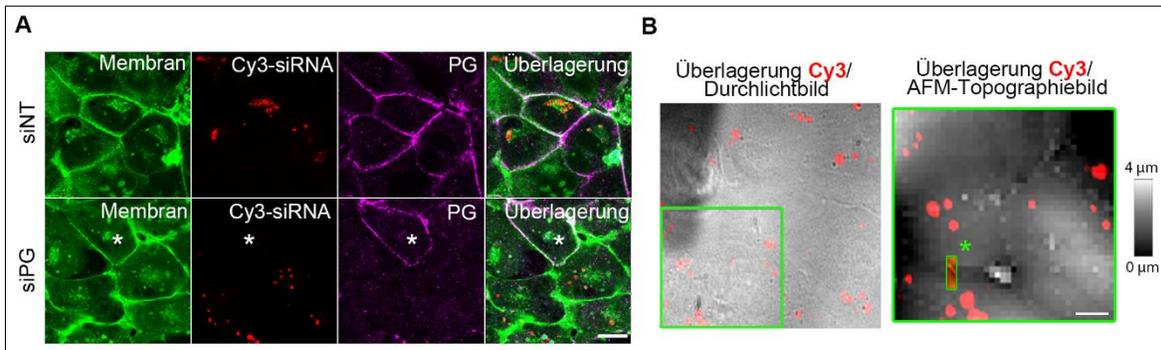


Abb. 24: AFM-Versuchsaufbau zur Messung auf HL-1-Zellen mit Proteinreduktion durch Cy3-gekoppelte siRNA

(A) In HL-1-Zellen, die Cy3-gekoppelte siPG enthalten, ist eine Reduktion von PG im Vergleich zu siNT-behandelten Zellen oder einer Zelle, die keine Cy3-siRNA enthält (markiert mit \*), detektierbar. Die Membran wurde mit Sulfo-NHS-Biotin markiert und mit Streptavidin-ALEXA 488 detektierbar gemacht. (B) Für AFM-Messungen wurden Areale an Zellgrenzen von zwei benachbarten Zellen, die jeweils Cy3-siRNA enthalten (markiert mit grünem \*), gewählt. Die grüne Box im Durchlichtbild links markiert die Stelle für das AFM-Topographiebild rechts. [A: Maßstab = 10 µm. B: Maßstab = 10 µm. Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

AFM-Messungen auf Cy3-siNT-enthaltenden Zellen mit einer DSG2-beschichteten Messspitze zeigten, wie bereits oben für nicht-transfizierte Zellen beschrieben, eine Verschiebung der DSG2-vermittelten Bindungsereignisse von der Zelloberfläche Richtung Zellgrenze nach Inkubation mit F/R über 30 min – 2 h (Abb. 25A). Führt man die Messungen nun an Zellgrenzen von zwei benachbarten Cy3-siPG-enthaltenden Kardiomyozyten aus, war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar. Dies ließ sich auch mittels Verteilungsquotienten objektivieren (siNT  $1,11 \pm 0,22$ ; siNT + F/R  $2,02 \pm 0,10$ ; siPG  $0,98 \pm 0,12$ ; siPG + F/R  $1,11 \pm 0,12$ ) (Abb. 25B).

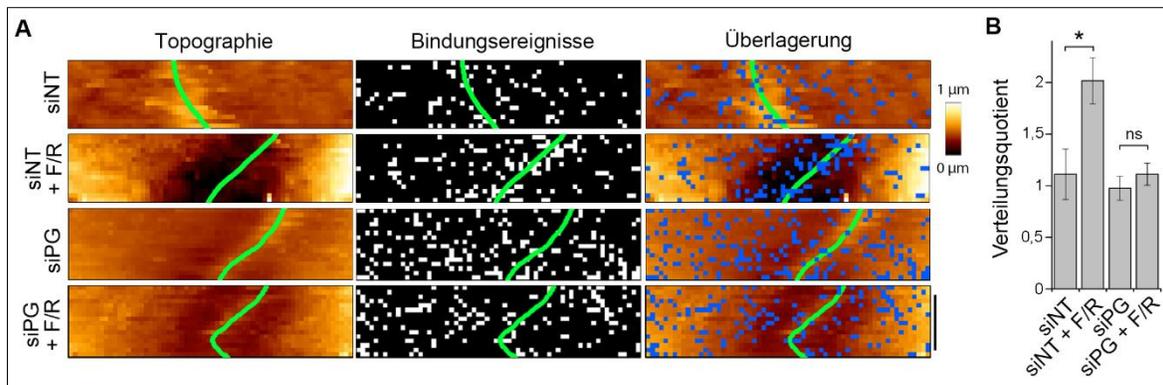


Abb. 25: Die Reorganisation von DSG2-vermittelten Bindungsereignissen durch adrenerge Signalwegsaktivierung ist abhängig von PG

Repräsentative AFM-Topographiebilder mit korrespondierender Bindungsereignis-Verteilung (A) und Auswertung des Verteilungsquotienten (B) zeigen nach F/R-Inkubation über 30 min – 2 h eine Zunahme der DSG2-vermittelten Bindungsereignisse an den Zellgrenzen (markiert durch eine grüne Line) von HL-1-Zellen, die Cy3-siNT enthalten. An den Zellgrenzen von Zellen, die Cy3-siPG enthalten, ist im Vergleich keine Reorganisation der DSG2-vermittelten Bindungen nachweisbar. Jeder weiße bzw. blaue Pixel in der Überlagerung markiert einen Messpunkt mit Bindungsereignis. [\*P < 0,05; (ns)P ≥ 0,05. Maßstab = 1 μm; n = 6. Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

Gemeinsam zeigen diese Daten, dass positive Adhäsotropie mit Zunahme der Zell-Zell-Haftung und Vermehrung mit Reorganisation von DSG2-Molekülen an den Zellgrenzen von der Expression von PG abhängig ist.

### 3.3.3. Plakoglobin-Abhängigkeit des positiven inotropen und chronotropen Effekts adrenerger Stimulation

Bisher konnte gezeigt werden, dass positive Adhäsotropie ein neuer Mechanismus zur Regulation der Zell-Zell-Haftung ist, welcher abhängig von der Expression von PG zu sein scheint. Um die Bedeutung dieser neuen Sympathikusfunktion genauer zu beleuchten, wurden *ex vivo*-Herzperfusionsen nach Langendorff (Langendorff, 1895; Bell et al., 2011) durchgeführt. Hierbei können am isolierten, kontrahierenden Herzen der Pulsdruck des Herzschlages und die korrespondierende Herzfrequenz gemessen werden. Bei der Perfusion von WT-Herzen kam es durch Zugabe von 2 μmol/l Iso in den Perfusionspuffer für 10 min im Vergleich zu basalen Werten zu einer deutlichen Zunahme des Pulsdruckes auf ca.  $350 \pm 50$  % und der Herzfrequenz auf ca.  $200 \pm 40$  % der Grundlinie, was den positiv inotropen und chronotropen Effekt des Sympathikus auf die Herzfunktion unter

physiologischen Bedingungen widerspiegelt. In PG-KO-Herzen, die für 10 min mit Iso perfundiert wurden, war im Unterschied zu WT-Herzen kaum eine Veränderung des Pulsdruckes (ca.  $110 \pm 15$  % der Grundlinie) oder der Herzfrequenz (ca.  $110 \pm 10$  % der Grundlinie) messbar (Abb. 26).

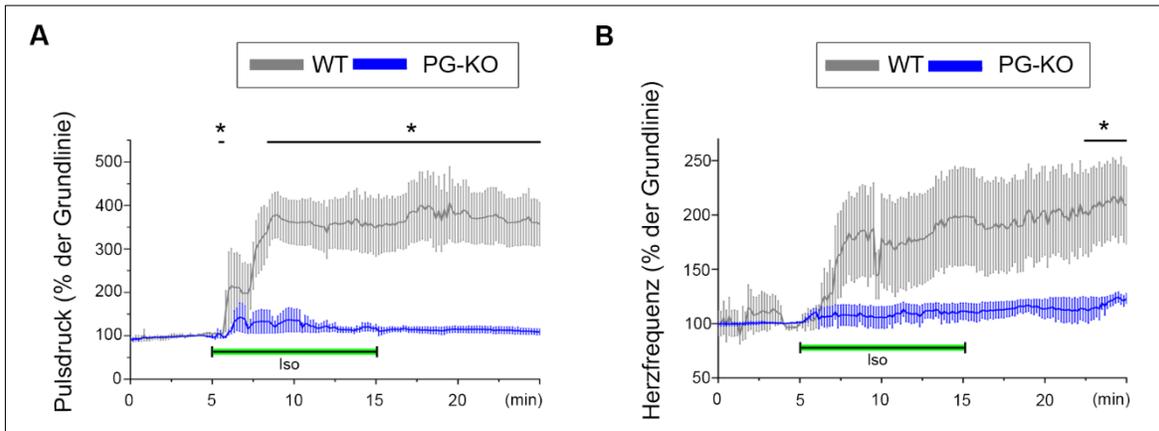


Abb. 26: Der positive inotrope und chronotrope Effekt adrenerger Stimulation ist PG-abhängig. Die kumulierten Werte des Pulsdruckes (A) und der Herzfrequenz (B) von 10 Wochen alten, *ex vivo*-perfundierten PG-KO-Herzen zeigen nach Zugabe von  $2 \mu\text{mol/l}$  Iso für 10 min im Vergleich zu WT-Herzen keinen deutlichen Anstieg. Der grüne Balken markiert jeweils den Zeitraum der Iso-Perfusion. Jeder Messpunkt ist mit dem zugehörigen SEM dargestellt. [\*P < 0,05 im Vergleich zum korrespondierenden Zeitpunkt WT. n = 6 Mäuse je Kondition. Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

Bei der morphologischen Analyse derselben Herzen im Anschluss an diese Experimente waren vermehrt komplett oder teilweise aufgerissene Glanzstreifen in PG-KO-Herzen nach Iso-Perfusion feststellbar. WT-Herzen, perfundiert mit Iso oder ohne Perfusion, und auch PG-KO-Herzen, die nicht perfundiert wurden, wiesen keine solchen Veränderungen auf (Abb. 27). Diese Beobachtungen legen nahe, dass mangelnde Zunahme der interzellulären Haftung durch PG-Defizienz während sympathischer Stimulation zu einer reduzierten inotropen und chronotropen Antwort des Herzens führt. Durch den gestörten positiv adhäsotropen Effekt kann sich die mechanische Kopplung der Kardiomyozyten möglicherweise nicht an die erhöhte Belastung anpassen, sodass die Glanzstreifen auseinanderreißen und damit auch die Ino- und Chronotropie beeinträchtigt werden. Dies

würde bedeuten, dass positive Adhäsotropie entscheidend für eine suffiziente Regulation der Herzfunktion durch den Sympathikus ist.

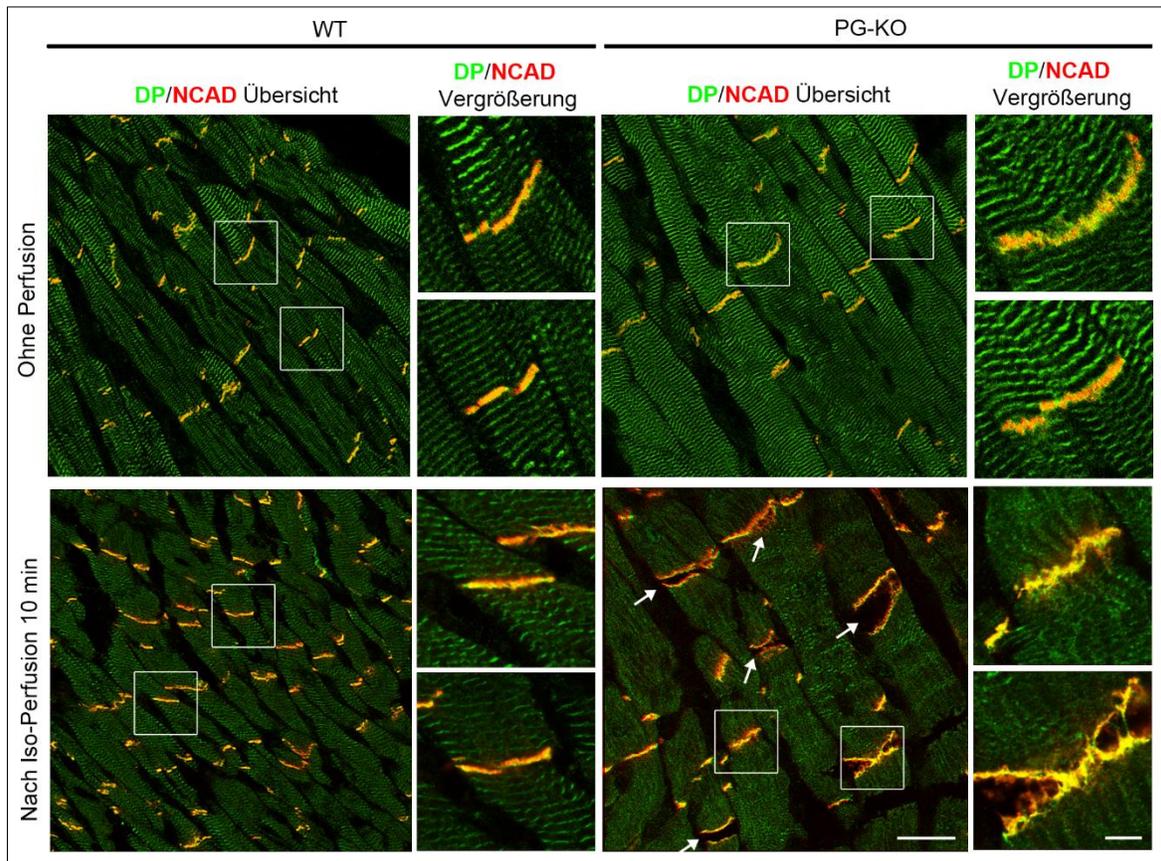


Abb. 27: Perfusion mit Iso führt zu aufgerissenen Glanzstreifen in PG-KO-Herzen  
 Repräsentative Doppel-Immunfluoreszenzdarstellungen, im Anschluss an die in Abb. 26 beschriebenen Experimente durchgeführt, zeigen in PG-KO-Herzen nach Perfusion mit Iso für 10 min im Vergleich zu WT- und nicht-perfundierten PG-KO-Herzen aufgerissene Glanzstreifen (Pfeile), welche durch N-Cadherin und DP markiert wurden. Die weißen Kästen markieren die jeweils rechts vergrößert dargestellten Glanzstreifen. [Maßstab Übersicht = 25  $\mu$ m, Maßstab Vergrößerung = 5  $\mu$ m,  $n$  = 6 Mäuse je Kondition. Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

### **3.4. Positive Adhäsotropie wird durch Proteinkinase A-abhängige Phosphorylierung von Plakoglobin an Serin 665 vermittelt**

#### **3.4.1. Proteinkinase A-Abhängigkeit der positiven Adhäsotropie**

Der adrenerge sekundäre Botenstoff cAMP aktiviert über seinen klassischen Signalweg zum einen die PKA, zum anderen den cAMP-Effektor EPAC (Fujita et al., 2017). Um zu untersuchen, ob diese beiden Zielmoleküle eine Rolle bei der positiven Adhäsotropie spielen, wurden Dissoziationsversuche mit unterschiedlicher Modulation der Aktivität von PKA und EPAC *in vitro* und *ex vivo* durchgeführt. So wurde PKA vor der Inkubation mit F/R durch H89 (20  $\mu\text{mol/l}$ ) inhibiert bzw. durch Behandlung mit dem cAMP-Analogon 6-Bnz-cAMP (100  $\mu\text{mol/l}$ ) direkt aktiviert. Eine direkte Aktivierung von EPAC wurde durch eine Behandlung der Kardiomyozyten mit dem cAMP-Analogon O-Me-cAMP (100  $\mu\text{mol/l}$ ) erreicht (Holz et al., 2006). Um Effekte auf Grund unspezifischer Nebenwirkungen der Mediatoren auszuschließen, wurden in einem weiteren Versuchsaufbau die Wirkung der PKA-Aktivierung siRNA-vermittelt verhindert, indem die katalytischen PKA-Untereinheiten PKA $\alpha$  und PKA $\beta$  mittels siRNA-Kombination für beide Untereinheiten (siPKA) herunterreguliert wurden (Murray, 2008).

Bei Durchführung der beschriebenen Dissoziationsversuche in HL-1-Zellen war nach Vorinkubation mit H89 für 1 h der Abfall der Fragmentzahlen nach Zugabe von F/R für 1 h nicht mehr nachzuweisen (Kontrolle  $15,0 \pm 1,9$ ; F/R  $5,0 \pm 0,5$ ; H89 + F/R  $19,0 \pm 4,1$ ) (Abb. 28A). Die Behandlung mit 6-Bnz-cAMP als PKA-Aktivator für 2 h hingegen zeigte eine signifikante Reduktion der Fragmente ( $6,0 \pm 1,0$ ), vergleichbar mit den Werten nach F/R-Inkubation. Die Aktivierung von EPAC durch Inkubation mit O-Me-cAMP für 2 h verminderte zwar die Anzahl der Fragmente gegenüber der Kontrolle ( $9,0 \pm 1,8$ ), jedoch wurde keine statistische Signifikanz erreicht. Diese Versuche deuten darauf hin, dass positive Adhäsotropie in HL-1-Zellen primär über eine Aktivierung der PKA vermittelt wird. Die Relevanz der PKA für die Zunahme der Zellkohäsion nach cAMP-Erhöhung konnte auch in Experimenten mit Reduktion ihrer Aktivität durch siPKA bestätigt werden. Im Vergleich zu siNT-behandelten Zellen, bei denen es nach Zugabe von F/R zur vorher beschriebenen

Haftungssteigerung kam (siNT  $17,0 \pm 2,7$ ; siNT + F/R  $6,5 \pm 1,3$  Fragmente), war in siPKA-behandelten Zellrasen keine signifikante Veränderung nach F/R Inkubation mit  $15,5 \pm 2,0$  Fragmenten im Vergleich zu Kontrollbedingungen mit  $14,4 \pm 2,2$  Fragmenten messbar (Abb. 28B).

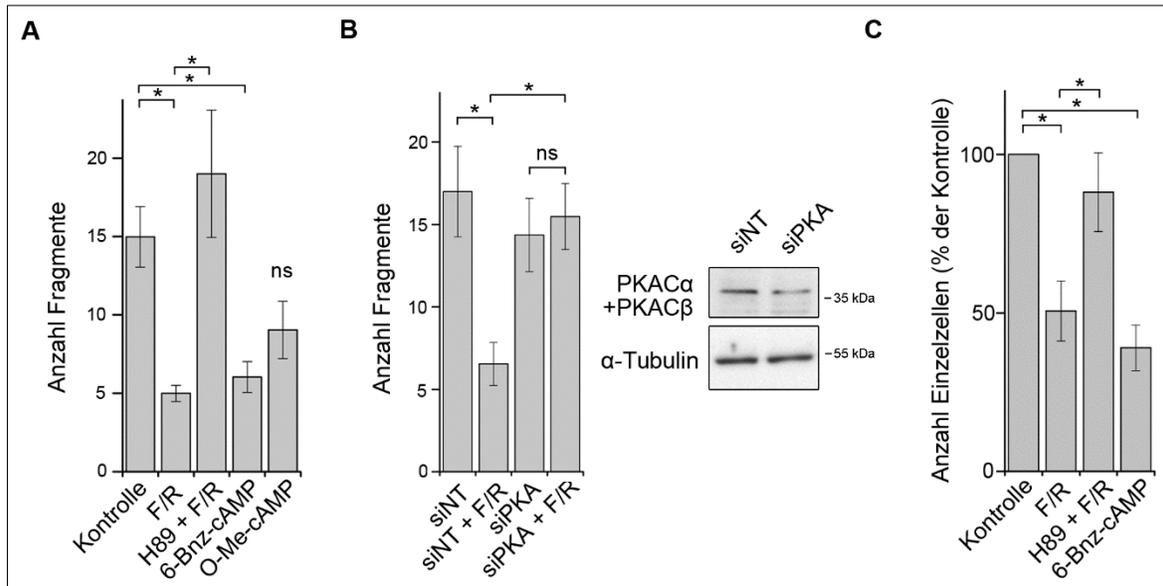


Abb. 28: Die Zunahme der interzellulären Haftung durch adrenerge Stimulation ist abhängig von PKA

In Dissoziationsversuchen in HL-1-Zellen ist die Zunahme der interzellulären Haftung durch Behandlung mit F/R für 1 h durch die Vorinkubation mit dem PKA-Inhibitor H89 für 1 h aufhebbar. Die Aktivierung der PKA durch 6-Bnz-cAMP über 2 h stärkt vice versa die Zellkohäsion, wohingegen der EPAC-Aktivator O-Me-cAMP zu keiner signifikanten Veränderung der Haftung führt. (B) Die Stärkung der Zell-Zell-Haftung durch F/R-Inkubation, die in siNT-Kontrollzellen erkennbar ist, ist in HL-1-Zellen, deren PKA-Aktivität durch siPKA (spezifische siRNA zur Herunterregulation der katalytischen PKA-Untereinheiten PKAC $\alpha$  und PKAC $\beta$ ) gehemmt wurde, nicht mehr nachzuweisen. Das rechte Feld zeigt repräsentative Western Blot-Analysen, die parallel zu den Dissoziationsversuchen angefertigt wurden, um die Reduktion der PKAC $\alpha$  und PKAC $\beta$  zu bestätigen.  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle. (C) Die Vorinkubation mit dem PKA-Inhibitor H89 hemmt in *ex vivo*-Dissoziationsversuchen die Steigerung der interzellulären Haftung durch F/R-Inkubation. Die PKA-Aktivierung durch 6-Bnz-cAMP stärkt umgekehrt die Zellkohäsion. [\*P < 0,05; (ns)P  $\geq$  0,05. A: n = 18 für Kontrolle; n = 21 F/R; n = 10 H89 + F/R; n = 16 6-Bnz-cAMP; n = 14 O-Me-cAMP. B: n = 12 siNT; n = 13 siNT + F/R; n = 10 siPKA; n = 13 siPKA + F/R. C: n = 10 für Kontrolle; n = 8 F/R; n = 11 H89 + F/R; n = 6 6-Bnz-cAMP. Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

In *ex vivo*-Dissoziationsversuchen konnte außerdem, wie in den *in vitro*-Experimenten, die PKA-Abhängigkeit der positiven Adhäsotropie gezeigt werden. So wurde die Reduktion der Anzahl der herausgelösten Einzelkardiomyozyten durch F/R mittels H89-Vorinkubation

signifikant verhindert (F/R  $50,6 \pm 9,5$ ; F/R + H89  $88,1 \pm 12,4$  jeweils % von Kontrolle), wohingegen 6-Bnz-cAMP zu einer deutlichen Zunahme der interzellulären Haftung mit Verringerung der Anzahl der dissoziierten Einzelkardiomyozyten führte (6-Bnz-cAMP  $39,0 \pm 7,2$  % von Kontrolle) (Abb. 28C).

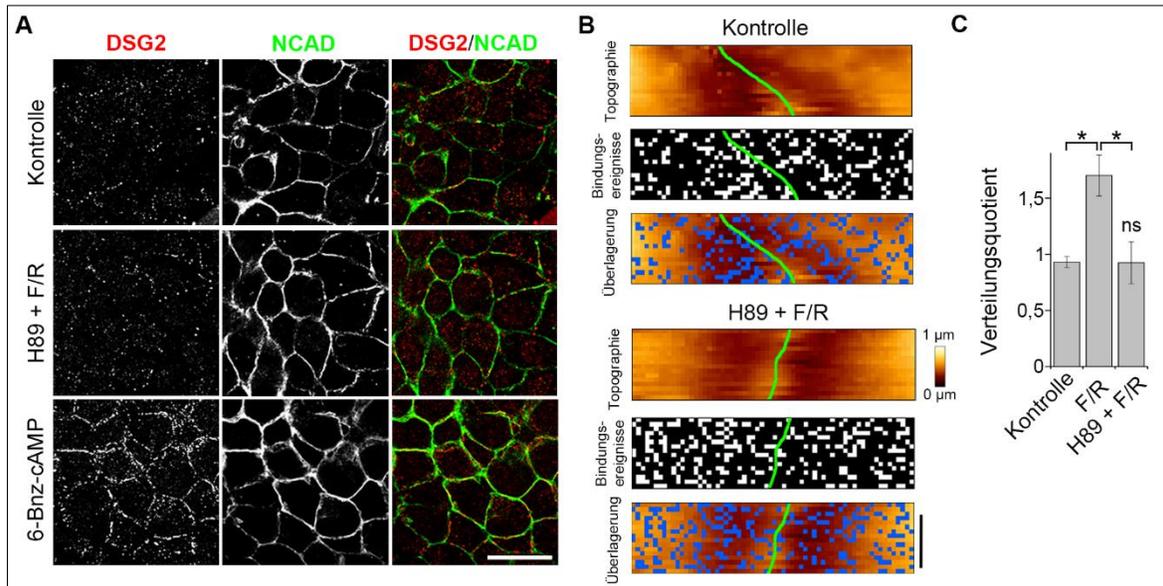


Abb. 29: Die Reorganisation von DSG2 durch adrenerge Stimulation ist abhängig von PKA. Bei Hemmung der PKA mittels H89 kommt es nach F/R-Behandlung zu keiner Zunahme von DSG2-Signalen an den Zell-Zell-Grenzen in der Immunfluoreszenzdarstellung (A) bzw. Verlagerung von DSG2-vermittelten Bindungsereignissen an die Zellgrenze (markiert mit einer grünen Linie) bei AFM-Untersuchungen (B, C). PKA-Aktivierung durch 6-Bnz-cAMP führt zu einer ähnlichen DSG2-Reorganisation wie durch F/R (siehe Abb. 12, Experimente wurden parallel durchgeführt). Jeder weiße bzw. blaue Pixel in der Überlagerung markiert einen Messpunkt mit Bindungsereignis. [\*P < 0,05; (ns)P ≥ 0,05 im Vergleich zu Kontrolle. A: Maßstab = 20 µm, n = 3. B, C: Maßstab = 1 µm, n = 6. Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

Bei der Überprüfung der Rolle der PKA bei der cAMP-induzierten Veränderungen der DSG2-Lokalisation konnte festgestellt werden, dass die Reorganisation mit Zunahme von DSG2-Molekülen an den Zellgrenzen sowohl in der Immunfluoreszenzdarstellung als auch in AFM-Messungen durch PKA-Inhibition mittels H89 verhindert werden konnte (Verteilungsquotient: Kontrolle  $0,89 \pm 0,09$ ; F/R  $1,70 \pm 0,19$ ; F/R + H89  $0,92 \pm 0,19$ ) (Abb. 29). Umgekehrt führte eine Inkubation mit dem PKA-Aktivator 6-Bnz-cAMP in der Immunfluoreszenzdarstellung zu einer deutlichen Zunahme von DSG2-Signalen an den Zell-

Zell-Junktionen. Somit sind alle bisher festgestellten Charakteristika der positiven Adhäsiotropie abhängig von der Aktivierung von PKA.

### **3.4.2. Phosphorylierung von Plakoglobin an Serin 665 durch adrenerge Stimulation über die Proteinkinase A**

Es ist bekannt, dass Phosphorylierungen von desmosomalen Proteinen wie DP (Albrecht et al., 2015), PKP2 (Bass-Zubek et al., 2008) oder PG (Gaudry et al., 2001) die Funktion und Assemblierung von Desmosomen regulieren können (Nekrasova und Green, 2013). Daher wurde im nächsten Schritt untersucht, ob desmosomale Proteine durch adrenerge Stimulation phosphoryliert werden und ob dies abhängig von PKA ist. Zur Feststellung des Phosphorylierungsstatus wurden Phos-Tag-Experimente auf Basis einer Gelelektrophorese mit anschließendem Immunoblot durchgeführt. Durch Zugabe von 30  $\mu\text{mol/l}$  des Phos-Tag-Moleküls in das Acrylamidgel kommt es während der Gelelektrophorese zu einem spezifischen „Zurückhalten“ von phosphorylierten Proteinen und somit zu einer langsameren, von der Anzahl der Phosphatreste abhängigen Migration dieser Moleküle im Gel. Im anschließenden Immunoblot kann dann die phosphorylierte Fraktion eines bestimmten Proteins auf der Membran im Vergleich zur weniger oder unphosphorylierten Fraktion „weiter oben“ detektiert werden (Kinoshita et al., 2006).

So wurden HL-1-Zellen mit siPKA und siNT im Vergleich transfiziert, mit Iso und F/R für 1 h behandelt und mittels Phos-Tag-Gel analysiert. Für PKP2 und DSG2 konnten keine eindeutig phosphorylierten Proteinfractionen erkannt werden (nicht gezeigt). Bei PG hingegen trat durch Zugabe von Phos-Tag eine Doppelbande bei allen Konditionen auf, wobei der Quotient aus der „höheren“, höhergradig phosphorylierte Proteinfraction und der „tieferen“, geringergradig phosphorylierten Proteinfraction in siNT-behandelten Zellen nach F/R- bzw. Iso-Inkubation signifikant auf das  $2,04 \pm 0,15$ - bzw.  $1,45 \pm 0,07$ -Fache der siNT-Kontrolle zugenommen hatte (Abb. 30A). Diese Zunahme der Phosphorylierung von PG durch Erhöhung der cAMP-Spiegel wurde durch Reduktion der PKA mittels siPKA fast vollständig verhindert (Höhergradig phosphorylierte Proteinfraction/ geringergradig phosphorylierte Proteinfraction: siPKA  $1,05 \pm 0,06$ ; siPKA + F/R  $1,27 \pm 0,12$ ; siPKA + Iso  $0,98$

$\pm 0,15$  je Quotient von siNT). Bei der Untersuchung des Plaqueproteins DP konnte zwar eine basale Phosphorylierung festgestellt werden, jedoch war keine signifikante Veränderung der obersten, phosphorylierten Bande nach adrenerger Stimulation oder PKA-Inhibition im Vergleich zu schneller migrierenden Banden messbar (Höhergradig phosphorylierte Proteinfraktion/ geringergradig phosphorylierte Proteinfraktion: siNT + F/R  $1,07 \pm 0,19$ ; siNT + Iso  $1,03 \pm 0,14$ ; siPKA  $1,04 \pm 0,06$ ; siPKA + F/R  $1,04 \pm 0,13$ ; siPKA + Iso  $0,94 \pm 0,10$  je Quotient von siNT) (Abb. 30B). Daraus ist zu schließen, dass sympathische Stimulation zu einer Zunahme der Phosphorylierung von PG in Abhängigkeit von PKA führt.

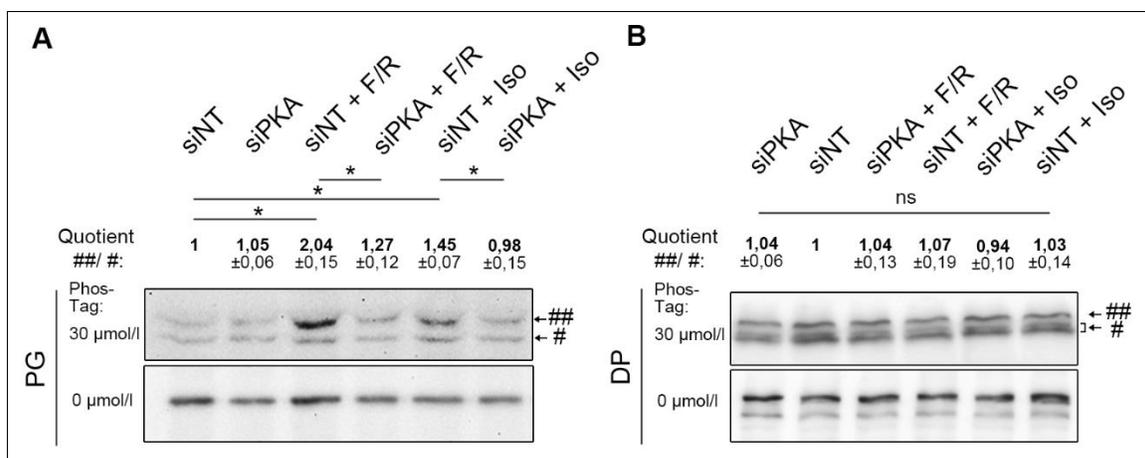


Abb. 30: Adrenerge Stimulation führt zu einer PKA-abhängigen PG-Phosphorylierung

In Phos-Tag-Experimenten ist die Phosphorylierung eines Proteins als Unterschied in der Migrationsgeschwindigkeit detektierbar. So präsentiert sich die höhergradig phosphorylierte Proteinfraktion nach Zugabe von  $30 \mu\text{mol/l}$  Phos-Tag in das Trenngel als höhere Bande (##) im Vergleich zur geringergradig phosphorylierten Proteinfraktion (#). Ein parallel angefertigter Immunoblot ohne Zugabe von Phos-Tag in das Trenngel ( $0 \mu\text{mol/l}$ ) dient zum Ausschluss einer Proteinfragmentierung. So ist für PG (A) eine Zunahme der Phosphorylierung (## im Vergleich zu #) nach adrenerger Stimulation erkennbar, die durch Inhibition der PKA mittels siPKA verhindert werden kann. Bei DP (B) sind hingegen keine Veränderungen unter gleichen Bedingungen erkennbar. Die angegebenen Werte geben jeweils die densitometrische Auswertung als Quotienten der ##- und #-Bande bezogen auf siNT wieder. [ $*P < 0,05$ ; (ns) $P \geq 0,05$ . A:  $n = 8$  siNT;  $n = 10$  siPKA;  $n = 8$  siNT + F/R;  $n = 7$  siPKA + F/R;  $n = 7$  siNT + Iso;  $n = 6$  siPKA + Iso. B:  $n = 7$  siNT;  $n = 8$  siPKA;  $n = 6$  siNT + F/R;  $n = 5$  siPKA + F/R;  $n = 6$  siNT + Iso;  $n = 5$  siPKA + Iso. Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

Um diese PG-Phosphorylierungsstelle genauer untersuchen zu können, wurden die in HL-1-Kardiomyozyten vorkommenden Phosphorylierungen und ihre jeweiligen Sequenzen mittels Massenspektrometrie bestimmt und ihre jeweilige Phosphoproteinmenge basal

und nach F/R-Inkubation gemessen. Hierfür wurden HL-1-Zellen für 1 h mit oder ohne F/R behandelt, lysiert und anschließend das enthaltene PG mittels Immunpräzipitation aufgereinigt. Die Phosphopeptid-spezifische Massenspektrometrie dieser Proteinfraction mit anschließender Analyse der Daten wurde im Zentrallabor für Proteinanalytik der LMU von Dr. Andreas Schmidt und Prof. Axel Imhof durchgeführt und ist in Schinner et al., 2017 genauer beschrieben. Bei diesen Experimenten waren unter Kontrollbedingungen zwei phosphorylierte Stellen in der PG-Sequenz an S182 und S665 nachweisbar, wobei nach Behandlung mit F/R nur für S665 die Intensität der phosphorylierten Peptide auf  $187,6 \pm 9,9$  % gegenüber der Kontrolle anstieg (Abb. 31A). Für S182 war mit einer Phosphopeptid-Intensität von  $108,3 \pm 3,0$  % der Kontrolle keine deutliche Veränderung unter gleichen Bedingungen feststellbar.

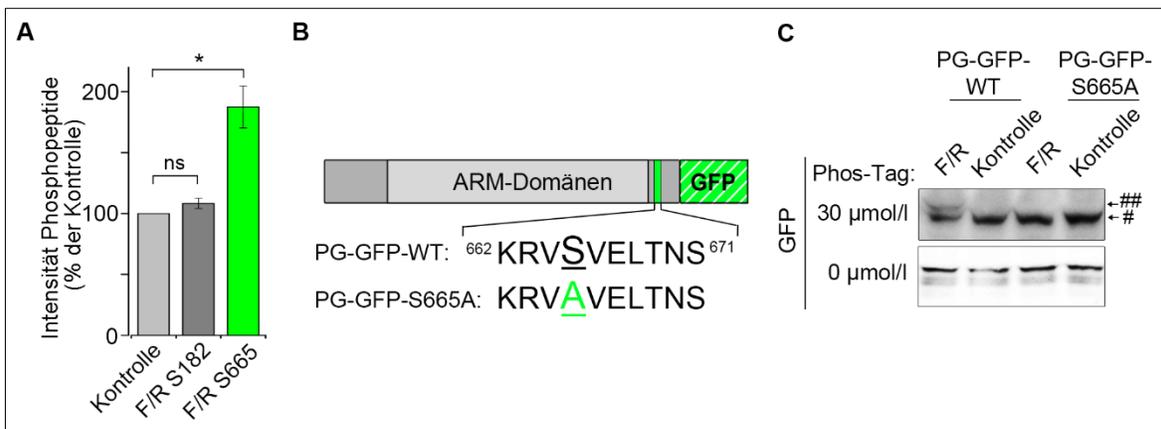


Abb. 31: Phosphorylierung von PG an S665 durch adrenerge Signalwegsaktivierung (A) Die Phosphopeptid-spezifische Massenspektrometrie nach PG-Aufreinigung durch Immunpräzipitation mit HL-1-Lysaten zeigt eine Zunahme der Phosphorylierung von PG an S665 nach F/R-Behandlung, während die Phosphorylierung an S182 unverändert bleibt. (B) Schematische Darstellung der Struktur des PG-GFP-WT-Fusionsproteins und der phosphodefizienten Mutante PG-GFP-S665A. (C) Ein repräsentativer Phos-Tag-Versuch mit transfizierten HL-1-Zellen zeigt das Fehlen der F/R-vermittelten Phosphorylierung (##) von phosphodefizientem PG-GFP im Vergleich zur WT-Kontrolle. [\*P < 0,05; (ns)P ≥ 0,05. A: n = 3. C: n = 5. Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

Damit die Bedeutung dieser Phosphorylierungsstelle für die positive Adhäsotropie genauer untersucht werden konnte, wurde im nächsten Schritt von Dr. Mariya Radeva eine Mutagenese des PG-GFP-WT-Plasmids an S665 durchgeführt, um durch Substitution des

Serins mit einem Alanin, wie in Abb. 31B dargestellt, eine an S665 phosphodefiziente PG-GFP-Mutante zu generieren (PG-GFP-S665A) (Schinner et al., 2017).

Zur Bestätigung der Funktionalität dieses Konstruktes in HL-1-Zellen wurde in diesen Zellen PG-GFP-S665A bzw. PG-GFP-WT als Kontrolle exprimiert und anschließend mittels Phos-Tag-Experimenten analysiert. Nur bei Expression von PG-GFP-WT war nach F/R-Stimulation eine Doppelbande von GFP und somit eine Phosphorylierung von PG-GFP-WT erkennbar, während bei Expression von PG-GFP-S665A sowohl mit als auch ohne cAMP-Spiegelerhöhung nur eine einzige Bande mittels anti-GFP detektierbar war (Abb. 31C). Dies verifiziert zum einen die Phosphodefizienz des neu generierten Konstrukts, zum anderen bestätigt dieses Experiment die Zunahme der Phosphorylierung von PG an S665 durch adrenerge Signalwegsaktivierung in HL-1-Zellen.

Zur Identifizierung möglicher Kinasen, die für die Phosphorylierung von PG an dieser Stelle verantwortlich sein könnten, wurde für die PG-Sequenz um S665 eine Übereinstimmungssuche mit bekannten Kinasmotiven mit Hilfe der pkaPS-Predictor-Software (Neuberger et al., 2007) durchgeführt. Interessanterweise wurde PKA als wahrscheinlichste phosphorylierende Kinase für diese Stelle vorhergesagt (Schinner et al., 2017). Zusammen mit den gezeigten Daten, dass positive Adhäsotropie abhängig von PKA ist, könnte dies bedeuten, dass PG durch erhöhte cAMP-Spiegel über eine PKA-Aktivierung direkt an S665 phosphoryliert wird.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde getestet, ob PKA PG *in vitro* an S665 phosphorylieren kann. Daher wurde eine dem PG-GFP-S665A-Konstrukt entsprechende phosphodefiziente PG-Mutante mit GST als Fusionsprotein generiert, um das entsprechende Protein bakteriell exprimieren und anschließend anhand des GST-Anteils aufzureinigen zu können. Das aufgereinigte PG-GST-S665A, mit PG-GST-WT als Kontrolle, wurde nun in einem *in vitro*-Kinase-Versuch zusammen mit der freien katalytischen und somit aktiven PKA-Untereinheit PKA $\alpha$  inkubiert. Im Vergleich dazu erfolgte die Inkubation mit PKA $\alpha$  als eine alternativ mögliche phosphorylierende Kinase. Mittels Phos-Tag-Experimenten wurde anschließend der Phosphorylierungsstatus der PG-Fusionsproteine

detektiert. Nach Inkubation von PG-GST-WT mit PKAC $\alpha$  traten, zusätzlich zur basal vorhandenen PG-Bande, zwei langsamer migrierende Banden (p1 und p2) auf, die zwei, zumindest *in vitro* vorkommende, PKA-Phosphorylierungsstellen andeuten (Abb. 32). Dies ist gut vereinbar mit dem theoretischen Vorkommen mehrerer PKA-Phosphorylierungsmotive in PG (Neuberger et al., 2007; Schinner et al., 2017). Wurde hingegen das phosphodefiziente PG-GST-S665A mit PKA inkubiert, fehlte die höhere dieser beiden Banden (p2). Dies beweist, dass PKA PG direkt an S665 phosphorylieren kann. Verglichen mit dem Grundzustand ohne Kinase-Zugabe, war durch Inkubation mit PKC $\alpha$  bei beiden Fusionsproteinen keine Veränderung des Phosphorylierungsstatus erkennbar.

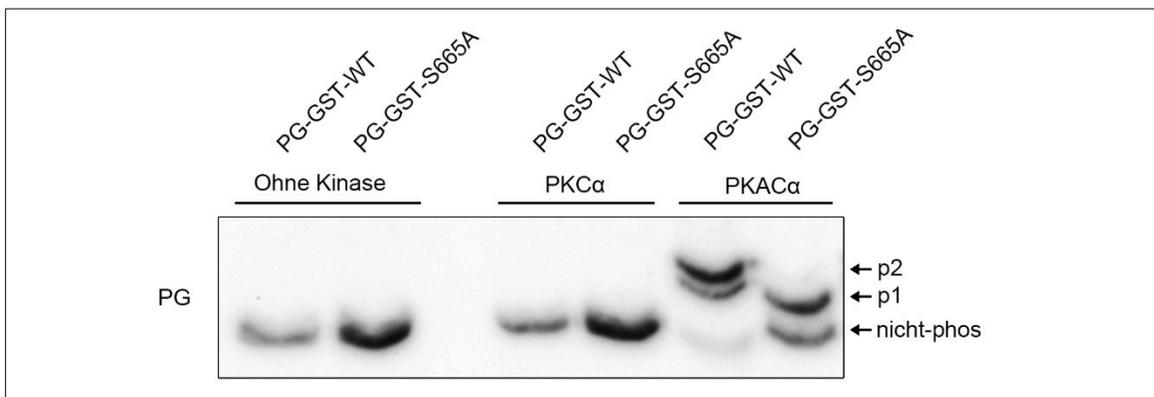


Abb. 32: PKA phosphoryliert PG an S665 *in vitro*

Die repräsentative Phos-Tag-Analyse nach *in vitro*-Kinase-Versuch zeigt eine doppelte Phosphorylierung (p1 und p2) des bakteriell exprimierten und über GST aufgereinigten PG-GST-WT nach Zugabe der katalytischen PKA-Untereinheit PKAC $\alpha$ , wohingegen der Phosphorylierungsstatus p2 bei der phosphodefizienten Mutante PG-GST-S665A fehlt. PKC $\alpha$  führt zu keiner direkten Phosphorylierung von PG. [ $n = 6$  bakterielle Klone. Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

### 3.4.3. Positive Adhäsotropie durch Phosphorylierung von Plakoglobin an S665

In den folgenden Schritten wurde nun untersucht, ob die vorher beschriebenen Effekte der positiven Adhäsotropie abhängig von der Phosphorylierung von PG an S665 sind. Tatsächlich waren HL-1-Zellen, die PG-GFP-S665A exprimierten, im Vergleich zu PG-GFP-WT-exprimierenden Zellen im Dissoziationsversuch nicht mehr in der Lage, die Zell-Zell-Haftung durch erhöhte cAMP-Spiegel zu verstärken (Anzahl Fragmente: PG-GFP-WT: F/R  $36,3 \pm 7,4$ ; PG-GFP-S665A: Kontrolle  $102,2 \pm 15,3$ ; F/R  $90,8 \pm 14,3$  je % von Kontrolle PG-GFP-WT) (Abb. 33A). Auch die Reorganisation von DSG2 mit Zunahme der Signale an den

Zellgrenzen durch Behandlung mit F/R für 1 h war in Zellen, die das phosphodefiziente Konstrukt enthielten, im Vergleich mit WT-Konstrukt-transfizierten Zellen nicht mehr nachvollziehbar (Abb. 33B).

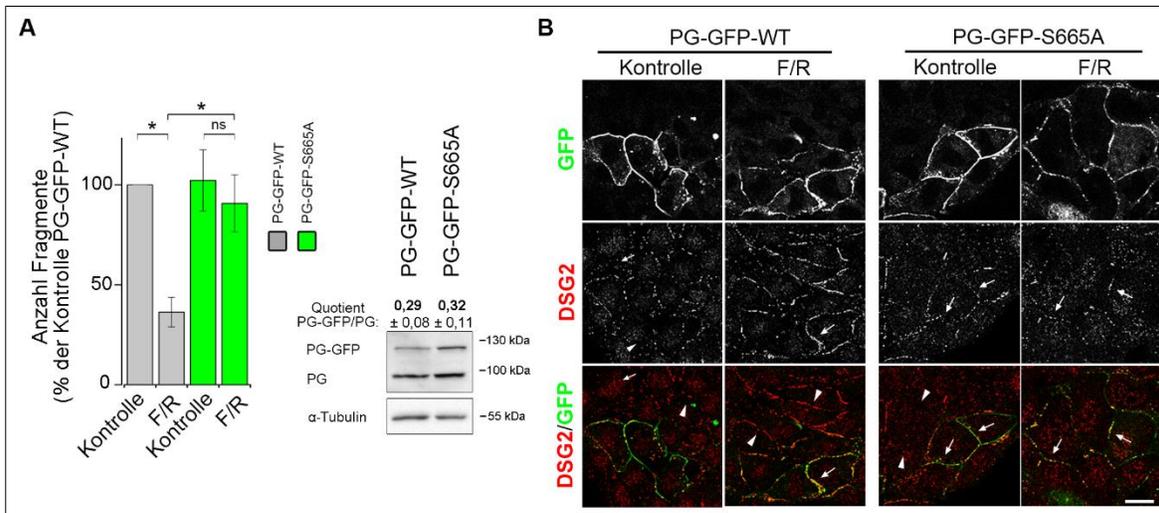


Abb. 33: Zunahme der interzellulären Haftung und Reorganisation von DSG2 nach adrenerger Stimulation ist abhängig von einer PG-Phosphorylierung an S665

(A) Expression des phosphodefizienten PG-GFP-S665A inhibiert in HL-1-Zellen die Steigerung der Haftung durch F/R-Inkubation für 1 h im Vergleich zur WT-Kontrolle im Dissoziationsversuch. Die Abbildung rechts zeigt repräsentative Western Blot-Analysen zur Überprüfung der PG-Konstruktexpression und Analyse des Verhältnisses der Expression des exogenen PG zu endogenen PG (Quotient PG-GFP/PG).  $\alpha$ -Tubulin dient als Ladekontrolle. (B) In den repräsentativen Abbildungen ist an den Zellgrenzen von Zellen, die PG-GFP-WT exprimieren (Pfeile), eine Zunahme der DSG2-Signale nach F/R-Behandlung wie in nicht-transfizierten Zellen (Pfeilspitzen) erkennbar. An Zellgrenzen von Zellen, die PG-GFP-S665A enthalten, ist keine Reorganisation von DSG2 detektierbar. [\*P < 0,05; (ns)P  $\geq$  0,05. A: je n = 8 Kontrolle, je n = 11 F/R. B: Maßstab = 15  $\mu$ m, n = 3. Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

Durch die grün fluoreszierende GFP-Markierung konnten für AFM-Messungen jeweils die Zellgrenze von je zwei PG-GFP-exprimierenden Zellen selektiert werden. Hierbei zeigte sich an der Zell-Zell-Junktion von zwei HL-1-Kardiomyozyten, die PG-GFP-WT exprimierten, die Zunahme der DSG2-vermittelten Bindungsereignisse an der Zellgrenze nach Zugabe von F/R (Verteilungsquotient: Kontrolle  $0,99 \pm 0,11$ ; F/R  $1,48 \pm 0,05$ ) (Abb. 34A, B). Im Gegensatz dazu wurde dieser Effekt durch Expression des phosphodefizienten PG-GFP-S665A vollständig verhindert (Verteilungsquotient: Kontrolle  $1,03 \pm 0,09$ ; F/R  $0,92 \pm 0,07$ ). Bei der Analyse der jeweiligen Bindungskräfte der DSG2-vermittelten Bindungsereignisse zeigte sich außerdem bei Expression von PG-GFP-WT eine signifikante Zunahme der

Bindungskräfte von  $36,50 \pm 0,37$  pN auf  $39,94 \pm 0,41$  pN nach F/R-Zugabe, wohingegen bei Expression von PG-GFP-S665A der Anstieg der Bindungskräfte mit  $39,51 \pm 0,60$  pN nach cAMP-Spiegelerhöhung im Vergleich zu  $40,21 \pm 0,63$  pN unter Kontrollbedingungen aufgehoben war (Abb. 34C).

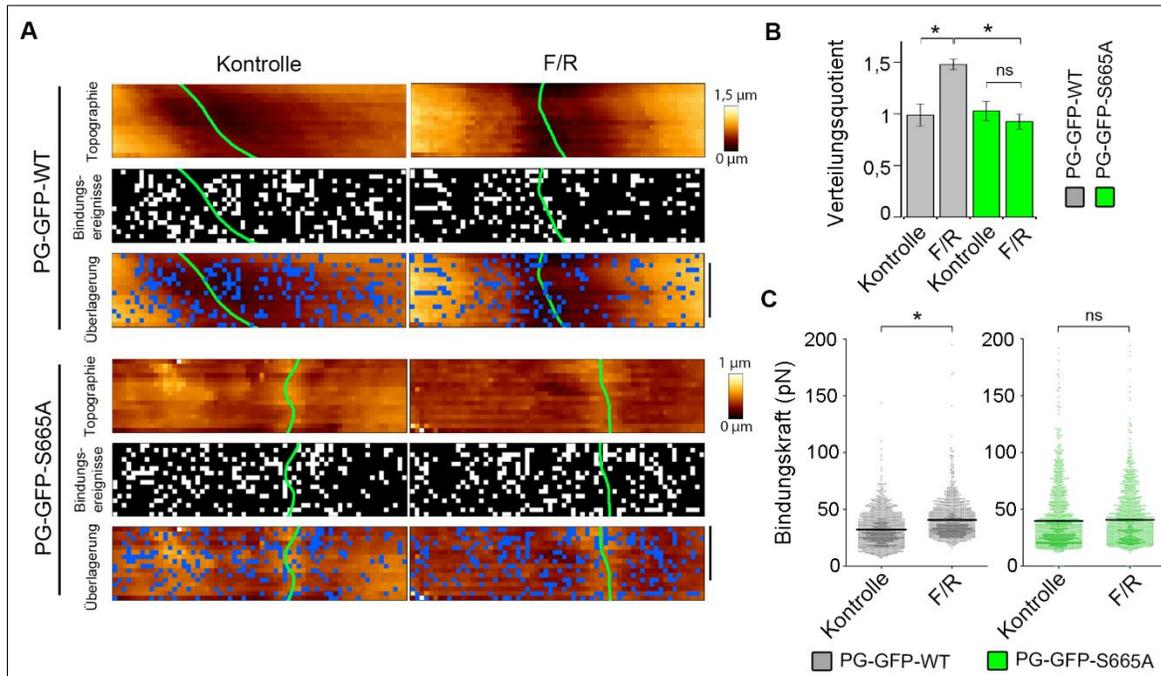


Abb. 34: Reorganisation von DSG2-vermittelten Bindungsereignissen mit Zunahme der Bindungskraft nach adrenerger Stimulation ist abhängig von PG-Phosphorylierung an S665  
Bei AFM-Experimenten mit DSG2-funktionalisierten Spitzen zeigt sich in repräsentativen Abbildungen (A) sowie bei der Analyse des Verteilungsquotienten (B), im Gegensatz zur Expression von PG-GFP-WT, keine Verlagerung der Bindungsereignisse an die Zellgrenze (markiert mit einer grünen Linie) von PG-GFP-S665A-exprimierenden HL-1-Zellen durch F/R-Behandlung für 30 min – 2h. (C) Auch die Zunahme der DSG2-Bindungskräfte auf PG-GFP-WT-Zellen nach F/R-Inkubation ist durch Phosphodefizienz an S665 verhindert. Jeder Punkt markiert die Bindungskraft eines Bindungsereignisses. Die Balken markieren den Mittelwert  $\pm$  SEM. [\*P < 0,05; (ns)P  $\geq$  0,05. A: Maßstab = 1  $\mu\text{m}$ . B: n = 6. C: n > 1.300 aus 6 Experimenten. Modifiziert nach Schinner et al., 2017.]

Zusammen zeigen diese Ergebnisse, dass die beschriebenen Effekte der positiven Adhäsotropie mit Erhöhung der Zell-Zell-Haftung, Reorganisation der Haftkontakte mit Zunahme von DSG2-Molekülen an den Zell-Zell-Junktionen und Steigerung der DSG2-vermittelten Bindungskräfte abhängig von der Phosphorylierung von PG an S665 sind, welche direkt durch PKA vermittelt wird.

## 4. Diskussion

### 4.1. Positive Adhäsotropie als neue Funktion des Sympathikus

In dieser Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass adrenerge Stimulation zu einer Erhöhung der Zell-Zell-Haftung von Kardiomyozyten führt. Außerdem induzierte die sympathische Stimulation eine Veränderung in der Qualität der interzellulären Bindung, die zu einer erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Unabhängigkeit der Haftung führte. Diese Regulation der kardialen Zellkohäsion war vergesellschaftet mit einer Reorganisation der Zell-Zell-Junktionen mit Zunahme von DSG2, PG und DP an den Zell-Zell-Kontaktzonen und gleichzeitiger Erhöhung der Bindungskraft von DSG2-Molekülen. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese Effekte abhängig von einer direkten Phosphorylierung des Plaqueproteins PG an S665 durch PKA ist (Abb. 35). Zusammengenommen identifiziert diese Studie eine neue kardiale Funktion des Sympathikus zur Regulation der interzellulären Haftung der Kardiomyozyten, die in Anlehnung an die bereits bekannten Sympathikus-Funktionen als „positive Adhäsotropie“ bezeichnet wird.

#### 4.1.1. Wirkung der positiven Adhäsotropie auf Kardiomyozyten

Mit Hilfe von Dissoziationsversuchen *in vitro* und *ex vivo* stellte sich heraus, dass die mechanische Kopplung von Kardiomyozyten durch adrenerge Stimulation und Erhöhung des zugehörigen sekundären Botenstoffes cAMP verstärkt wird. Die Zunahme von DSG2-, DP- und PG-Molekülen an den Zell-Zell-Kontaktzonen in der Immunfluoreszenzdarstellung korrelierte mit einer Zunahme der DSG2-vermittelten Bindungskräfte in AFM-Messungen auf lebenden Kardiomyozyten sowie ultrastrukturell mit einer Verlängerung der Zellkontakte (Schinner et al., 2017). So scheint der zugrundeliegende Mechanismus für eine Verstärkung der interzellulären Haftung die Reorganisation des desmosomalen Plaques und Zunahme der desmosomaler Komponenten an den Zell-Zell-Junktionen mit Erhöhung der DSG2-Bindungskraft zu sein. Immunfluoreszenzdarstellungen in DSG2-GFP-exprimierenden Kardiomyozyten und AFM-Messungen legen nahe, dass eine Fraktion an nicht in Desmosomen gebundenen DSG2-Molekülen auf der Zelloberfläche durch eine

Verschiebung an die Zell-Zell-Kontaktzone als mögliche Reserve zur schnellen Anpassung der interzellulären Haftung an eine veränderte Belastung dient. Diese Verschiebung von DSG2-Molekülen geschieht möglicherweise im Komplex mit DP und PG, da diese Proteine nach adrenerger Stimulation ebenfalls vermehrt an den Zell-Zell-Grenzen zu finden waren, während die Interaktion mit DSG2 in der Immunpräzipitation sowie die zytoskelettale Verankerung der desmosomalen Komplexe in der Triton-X-100-vermittelten Proteinfractionierung unverändert blieb. So wurde erst kürzlich in Keratinozyten gezeigt, dass DSG3 an der Zelloberfläche mit DP und dem Intermediärfilament Keratin co-lokalisiert (Vielmuth et al., 2018), was auch auf Kardiomyozyten mit DSG2, DP und Desmin zutreffen könnte und in weiterführenden Studien untersucht werden muss.

Bei zellfreien AFM-Messungen mit einer DSG2-funktionalisierten Spitze auf einem mit DSG2-beschichteten Glimmer konnten in dieser Studie homophile Bindungen zwischen DSG2-Molekülen nachgewiesen werden. Dies stimmt mit anderen Studien überein, die ebenfalls homophile Interaktionen für desmosomale Cadherine (Nie et al., 2011), wie DSG2 (Schlegel et al., 2010; Schlipp et al., 2014) oder DSG3 (Vielmuth et al., 2015) nachweisen konnten. Allerdings scheinen auch heterophile Interaktionen zwischen den einzelnen DSG-Isoformen und auch zwischen DSGs und DSCs zu existieren (Harrison et al., 2016; Vielmuth et al., 2018). Da jedoch DSG2-vermittelte Bindungsereignisse sowohl zellfrei als auch auf Kardiomyozyten durch einen monoklonalen, gegen den extrazellulären Teil von DSG2 gerichteten Antikörper um ein ähnliches Maß reduziert werden konnten, ist zumindest überwiegend von homophilen DSG2-Interaktionen in beiden Versuchsansätzen auszugehen.

Adrenerge Stimulation führte zu einer desmosomalen Reorganisation, während N-Cadherin als Haftungsmolekül der Adhärensjunktionen keinen Unterschied in der Lokalisation aufwies. Dies unterstreicht die Relevanz von desmosomalen Proteinen für die positive Adhäsotropie. Gleichwohl kam es in einer anderen Studie, zumindest während der Ausbildung der Haftkontakte, über EPAC zu einer Zunahme von N-Cadherin an den Zell-Zell-Grenzen von Kardiomyozyten nach cAMP-Spiegelerhöhung (Somekawa et al., 2005).

Da sich die Verteilung von N-Cadherin nicht deutlich verändern muss, um trotzdem Auswirkungen auf andere Proteine des Glanzstreifens wie zum Beispiel CX43 zu haben (Smyth et al., 2010), kann eine Beteiligung von N-Cadherin an der positiven Adhäsotropie aufgrund dieser Daten nicht ausgeschlossen werden.

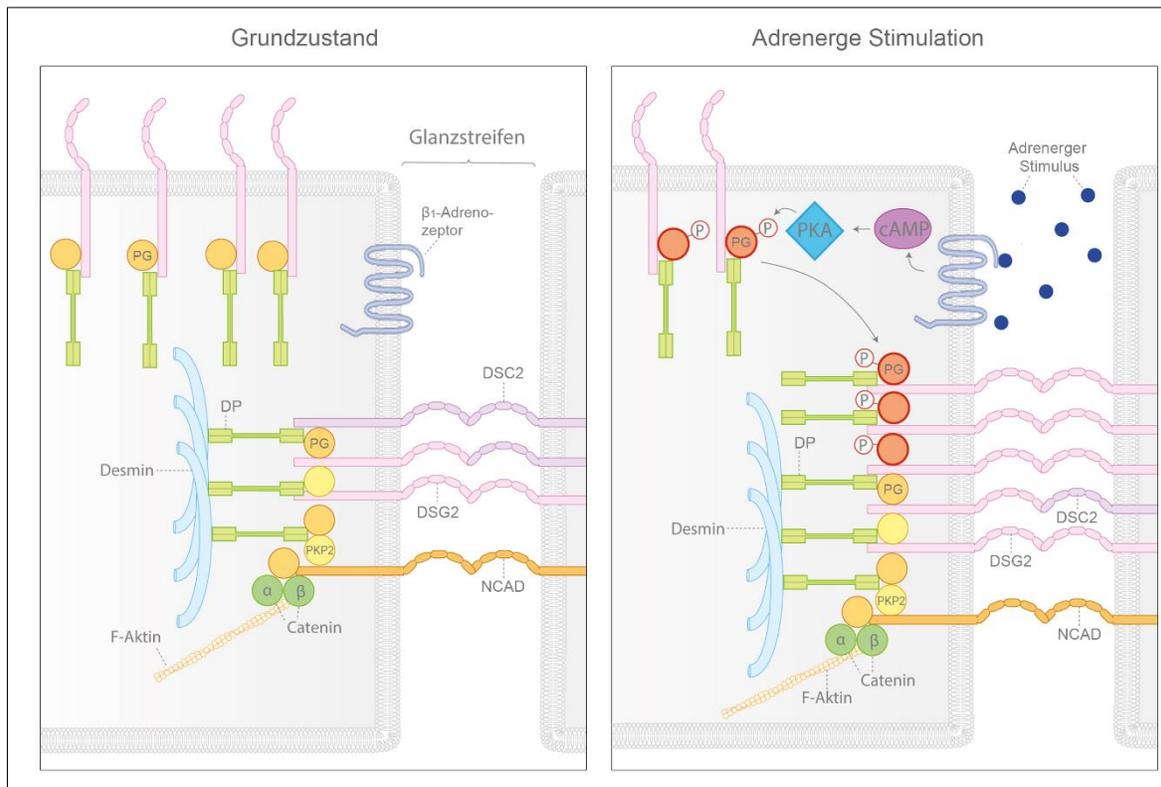


Abb. 35: Mechanismen der positiven Adhäsotropie

Im Vergleich zum Grundzustand führt adrenerge Stimulation über den sekundären Botenstoff cAMP zu einer Aktivierung der PKA, die wiederum zu einer Phosphorylierung des desmosomalen Plaqueproteins PG an S665 führt. Hierdurch kommt es zu einer Relokalisation von außerhalb der Glanzstreifen befindlichen DSG2, PG und DP an die Glanzstreifen, welche mit einer Zunahme der Zellkohäsion korreliert.

Studien haben gezeigt, dass ein globaler PG-Verlust aufgrund eines Defekts des Herzens bereits embryonal letal ist, was die kritische Rolle von PG für die Herzentwicklung unterstreicht (Bierkamp et al., 1996). Daher wurde für die vorliegende Studie ein herzspezifischer, erst später einsetzender PG-KO etabliert. Im Gegensatz zu aus globalen PG-KO-Embryonen isolierten Keratinozyten, die abhängig vom Differenzierungsgrad eine Reduktion verschiedener desmosomaler Proteine wie DP, DSG2 und DSG3 aufwiesen (Yin et al., 2005), war in herzspezifischem PG-KO-Myokard mittels Western Blot-Analyse und

Immunfluoreszenzdarstellung ausschließlich eine signifikante Reduktion des Adhäsionsmoleküls DSG2 detektierbar. Dies gleicht den Daten aus ähnlichen Maus-Modellen (Li et al., 2011a; Li et al., 2011b). Auch hier fanden sich keine Änderungen der Proteinexpression bis auf die erwähnte Reduktion von DSG2 und eine Vermehrung der  $\beta$ -Catenin-Menge. Die Veränderungen in den PG-KO-Herzen traten bereits vor der Fibrose und Hypertrophie im Alter von 2 Wochen auf. Diese Daten deuten an, dass PG besonders für die Expression und den Einbau von DSG2 in Desmosomen wichtig ist. Die Erhöhung von  $\beta$ -Catenin war sowohl in einem anderen herzspezifischen PG-KO (Li et al., 2011a; Li et al., 2011b), in Keratinozyten des generellen PG-KOs (Bierkamp et al., 1999) als auch in einem leberspezifischen PG-KO zu finden (Zhou et al., 2015), wobei  $\beta$ -Catenin in PG-KO-Zellen vermehrt mit desmosomalen Proteinen assoziiert zu sein schien (Bierkamp et al., 1999; Zhou et al., 2015). Es ist anzunehmen, dass  $\beta$ -Catenin im vorliegenden Modell zumindest teilweise den Verlust von PG kompensieren kann.

Zusätzlich zur Verstärkung der generellen Zell-Zell-Haftung nach adrenerger Stimulation war eine Änderung der Haftungsqualität mit Zunahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Unabhängigkeit der Zell-Zell-Haftung in Hyperadhäsionsversuchen messbar, was bislang nur für Desmosomen in Keratinozyten bekannt war (Garrod und Taberner, 2014). Es wird angenommen, dass es durch konformationelle Änderungen der DSG-Moleküle, die in ihrer Struktur flexibler als klassische Cadherine zu sein scheinen (Tariq et al., 2015), zu einer geordneteren Anordnung der Extrazellulärdomänen der DSG-Moleküle innerhalb des Desmosoms kommt. Hierdurch sollen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die für die Cadherinbindung wichtig sind, „eingeschlossen“ werden und eine verstärkte Haftung ermöglichen. PKC $\alpha$ -vermittelte Signalwege scheinen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Hyperadhäsion zu spielen, wobei die genauen Zielstrukturen und Mechanismen noch nicht bekannt sind (Garrod und Kimura, 2008; Garrod und Taberner, 2014). Auch zur genaueren Untersuchung des Phänomens der Hyperadhäsion und seiner Bedeutung in Kardiomyozyten sind für die Zukunft weitere Studien geplant.

In der vorliegenden Studie spielt bei der positiven Adhäsotropie PKA durch die Phosphorylierung des desmosomalen Plaqueproteins PG eine essentielle Rolle. So konnte

die Abhängigkeit der positiven Adhäsotropie sowohl von PG als auch von PKA in Dissoziations-, Immunfluoreszenz- und AFM-Versuchen gezeigt werden. Eine Zusammenführung dieser Ergebnisse gelang dank Phos-Tag-Untersuchungen, die eine gesteigerte und PKA-abhängige Phosphorylierung von PG nach adrenerger Stimulation detektierten. Die Identifikation der Stelle dieser PG-Phosphorylierung an S665 und der Nachweis als direkte PKA-Phosphorylierungsstelle gelang durch Massenspektrometrie und *in vitro*-Kinase-Versuche. Mittels einer phosphodefizienten PG-Mutante an S665 konnte gezeigt werden, dass sowohl die Zunahme der Zellkohäsion und DSG2-Bindungskraft als auch die Umstrukturierung der Zellkontakte mit Zunahme von DSG2 durch adrenerge Stimulation von der direkten Phosphorylierung von PG an S665 durch PKA abhängig ist. So war bereits vorher aus Studien in Keratinozyten bekannt, dass Phosphorylierungen desmosomaler Moleküle die Zell-Zell-Haftung durch Regulation des Auf-, Ein- und Abbaus desmosomaler Proteine beeinflussen können. So wird beispielsweise DP durch Phosphodefizienz an S2849, einer PKC $\alpha$ -Phosphorylierungsstelle, vermehrt mit dem Intermediärfilamentsystem assoziiert, was mit einer erhöhten interzellulären Haftung und Ca<sup>2+</sup>-Unabhängigkeit in Keratinozyten korreliert (Godsel et al., 2005; Kroger et al., 2013; Dehner et al., 2014). Außerdem wird angenommen, dass im Sinne einer Phosphorylierungskaskade diese Phosphorylierung nötig ist, um weitere Phosphorylierungen des C-terminalen DP-Anteils zu ermöglichen. Dies scheint wiederum die Assoziation von DP mit Intermediärfilamenten und den Aufbau von Desmosomen zu regulieren (Albrecht et al., 2015). Ebenso wurden Phosphorylierungen anderer desmosomaler Proteine wie DSC3 oder DSG3 nachgewiesen, die eine Rolle bei der Regulation der desmosomalen Funktion zu spielen scheinen (Aoyama et al., 1999; Aoyama et al., 2009). Auch für PG konnte gezeigt werden, dass Tyrosin-Phosphorylierungen, vermittelt durch den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl.: „Epidermal growth factor receptor“; EGFR), zum Verlust der Assoziation mit DP und zur Verminderung der Zellkohäsion in Keratinozyten führen (Gaudry et al., 2001; Yin et al., 2005). In Hepatozyten wurde hingegen eine PKA-abhängige Phosphorylierung von PG beschrieben, die hier

interessanterweise für die Kompensation von PG bei Verlust von  $\beta$ -Catenin eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Wickline et al., 2011; Wickline et al., 2013).

Aus Untersuchungen in Keratinozyten weiß man zudem, dass Desmosomen durch Assoziationen mit Kinasen wie der Mitogen-aktivierten Proteinkinase p38, PKC $\alpha$  oder Src eine Art Knotenpunkt verschiedener Signalwege bilden und so die Zell-Zell-Haftung und Migration regulieren können (Waschke und Spindler, 2014; Rotzer et al., 2015). Auch für Kardiomyozyten wurde auf Basis der Pathogenese der arrhythmogenen Kardiomyopathie gezeigt, dass desmosomale Glanzstreifenkomponenten Signalwege regulieren können, die wie Glykogensynthase-Kinase-3 $\beta$  oder Wnt wichtig für die Erregungsweiterleitung oder Differenzierung sind (Garcia-Gras et al., 2006; Chelko et al., 2016). Allerdings ist noch ungeklärt, wie die Haftung von Kardiomyozyten durch desmosomale Proteine und Signalwege reguliert werden kann. So decken die Ergebnisse dieser Studie mit der PKA-vermittelten PG-Phosphorylierung zum ersten Mal einen Signalweg zur Beeinflussung der Zellkohäsion in Kardiomyozyten auf.

#### **4.1.2. Verstärkte Zell-Zell-Haftung durch adrenerge Signalwege in verschiedenen Geweben**

In dieser Untersuchung wurde gezeigt, dass die Zell-Zell-Haftung *in vitro* und *ex vivo* nach adrenerger Signalwegsaktivierung durch Umstrukturierung der Desmosomen verstärkt wird. Dies steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus Keratinozyten und Endothelzellen, in denen ebenfalls eine gestärkte interzelluläre Haftung durch cAMP-Spiegelerhöhung nachgewiesen werden konnte.

So stellte sich in Keratinozyten *in vitro* und *in vivo* heraus, dass adrenerge Stimulation suffizient ist, um einen Pemphigus-Antikörper-induzierten Haftungsverlust zu verhindern, wobei ebenfalls, wie bei der positiven Adhäsotropie, PKA involviert zu sein scheint (Spindler et al., 2010). Auch die Störung der Zell-Zell-Haftung und des Aufbaus von Desmosomen durch Reduktion der PKP3-Proteinspiegel konnte durch Iso- und F-Inkubation, hier hingegen vermittelt über EPAC, aufgehoben werden (Todorovic et al., 2014). Außerdem wurde durch die Behandlung von Keratinozyten mit dem

transformierenden Wachstumsfaktor- $\beta$ 1 (engl.: „Transforming growth factor  $\beta$ -1“; TGF- $\beta$ -1) eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und Verlust von E-Cadherin an den Zell-Zell-Grenzen induziert, wobei eine Erhöhung des cAMP-Spiegels, möglicherweise PKA-vermittelt, diese Effekte aufheben konnte (Santibanez et al., 2003).

Im Gegensatz zu Keratinozyten, für die nur wenige Untersuchungen des Einflusses von adrenerger Stimulation auf die Zell-Zell-Haftung bekannt sind, ist eine Regulation der Endothelbarriere durch cAMP seit langem etabliert. Mechanistisch induziert hier adrenerge Stimulation mit Erhöhung des cAMP-Spiegels über die Zielstrukturen PKA und EPAC eine Stabilisierung der Endothelbarriere (Michel und Curry, 1999; Mehta und Malik, 2006; Spindler und Waschke, 2011; Radeva und Waschke, 2017). Auch eine erhöhte Permeabilität der Barriere durch Behandlung beispielsweise mit Histamin, Thrombin, Bradykinin (Michel und Curry, 1999) sowie Lipopolysaccharide oder Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (Schlegel und Waschke, 2009; Schick et al., 2012) kann durch Behandlung mit Mediatoren, die die cAMP-Produktion anregen, wieder aufgehoben werden. Diese Stärkung der Endothelbarriere korreliert sowohl mit einer Vermehrung von Schlussleisten (engl.: „Tight junctions“)-Proteinen als auch einer Reorganisation und Zunahme des endothelialen Adhäsionsmoleküls VE-Cadherin mit ultrastruktureller Vermehrung von Adhärensjunktionen (Adamson et al., 2008; Spindler et al., 2011). Außerdem war eine EPAC-vermittelte Erhöhung der Bindung von Endothelzellen an VE-Cadherin-beschichtete Flächen nach cAMP-Spiegelerhöhung messbar (Fukuhara et al., 2005). Ähnlich wie bei der positiven Adhäsotropie sind diese Effekte bereits nach kurzzeitiger Inkubation über 30 min – 1 h nachweisbar (Spindler et al., 2011).

Diese Studien verdeutlichen, dass adrenerge Signalwegsaktivierung mit Erhöhung des Botenstoffes cAMP neben dem Herzen auch in anderen Geweben zu einer Stärkung der Zell-Zell-Haftung führt, was andeutet, dass dies einen allgemeingültigen Mechanismus zur positiven Regulation der interzellulären Haftung in verschiedenen Geweben des Körpers darstellen könnte. So sind in Zukunft weiterführende Studien zur Aufklärung der genauen Zielstrukturen des cAMP-Signalwegs an den Zellkontakten von Endothelzellen, sowie

Untersuchungen des Einflusses der cAMP-Erhöhung auf die Zell-Zell-Haftung in weiteren Gewebearten nötig.

#### **4.1.3. Mögliche Bedeutung der positiven Adhäsotropie für die Herzfunktion**

Zusätzlich zu den bereits bekannten Funktionen konnte die positive Adhäsotropie in dieser Studie als neue Funktion des Sympathikus identifiziert werden. So zeigten Langendorff-perfundierte Herzen von WT-Mäusen nach Iso-Zugabe eine sofort einsetzende Erhöhung der Herzfrequenz und des Pulsdruckes, was den positiv chronotropen und inotropen Effekt des Sympathikus widerspiegelt. Gleichzeitig war in transversalen Herzschnitten dieser Mäuse der positiv adhäsiotrope Effekt mit Zunahme der Zell-Zell-Haftung nach Iso- oder F/R-Inkubation detektierbar, was in Herzschnitten von PG-KO-Mäusen unter gleichen Bedingungen nicht nachweisbar war. In Bezug auf Pulsdruck und Herzfrequenz sprachen die Herzen der PG-KO-Mäuse auch nicht mehr auf die Zugabe von Iso an. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt auf sekundären Veränderungen durch Fibrose und Hypertrophie beruht. Jedoch waren bei anschließenden morphologischen Untersuchungen der perfundierten PG-KO-Herzen im Gegensatz zu verschiedenen Kontrollen aufgerissene Glanzstreifen mit Kardiomyozyten, die ihren Kontakt zueinander teilweise gänzlich verloren hatten, zu erkennen. Unter Einbezug der fehlenden Chrono- und Inotropie in PG-KO-Herzen kann dies so interpretiert werden, dass Kardiomyozyten, die ihre Haftung als Antwort auf die Aktivierung des Sympathikus nicht verstärken können, auch zu keiner insgesamten Zunahme der Kontraktionskraft und Schlagfrequenz fähig sind. So kann das Gewebe möglicherweise dem erhöhten mechanischen Stress aufgrund der unangepassten Zellkohäsion nicht mehr standhalten, was dann die Kontraktilität beeinträchtigt. Somit lassen diese Daten eine Abhängigkeit der positiven Ino- und Chronotropie von einer suffizienten positiven Adhäsotropie vermuten. Dies wird von Untersuchungen an Herzen unterstützt, deren Zell-Zell-Haftung, entweder durch (1) einen Überschuss der Aminosäure L-Tryptophan zur Inhibition der allgemeinen, Tryptophan-vermittelten Cadherinbindung, oder durch (2) ein DSG-spezifisches Peptid, das die DSG-vermittelte Bindung blockiert, gestört wurde. Bei anschließender adrenerger Stimulation

mittel Iso konnten diese Herzen die Frequenz und Kontraktionskraft im Vergleich zu Kontrollherzen nicht erhöhen (Schlipp et al., 2014).

Adrenerge Signalwegsaktivierung reguliert in Kardiomyozyten neben den Desmosomen auch Gap Junctions mit CX43 als elektrische Kopplungskomponente des Glanzstreifens. So beeinflusst cAMP über PKA- und EPAC-Aktivierung die Permeabilität und Akkumulation von CX43, sodass eine vermehrte Neubildung von Gap Junctions und auch schnellere Erregungsweiterleitung induziert werden können (Darrow et al., 1996; Somekawa et al., 2005). Es wird angenommen, dass durch cAMP/EPAC-abhängige Phosphorylierung von CX43 an S368 die Permeabilität und Erregungsweiterleitung über Gap Junctions reguliert werden kann (Ek-Vitorin et al., 2006; Duquesnes et al., 2010; Alstrom et al., 2015; Nassal et al., 2016). Auch die Natriumkanal-Untereinheit  $Na_v1.5$  ist an den Glanzstreifen im Komplex mit DSG2 zu finden (Rizzo et al., 2012), wo die Funktion dieses Moleküls durch PKA-abhängige Phosphorylierung reguliert wird (Campbell et al., 2014).

Zusammengenommen kann adrenerge Stimulation mit Erhöhung der cAMP-Spiegel gleichzeitig sowohl die mechanische als auch die elektrische Kopplung der Glanzstreifen beeinflussen. Dies passt zu den Ergebnissen anderer Studien, die zeigen, dass Expression, Lokalisation und Funktion von CX43 von einer suffizienten interzellulären Haftung abhängig sind (Sato et al., 2009; Gehmlich et al., 2011; Lyon et al., 2014; Kant et al., 2015). So könnte für die gestörte inotrope Antwort der PG-KO-Herzen auch eine Beeinträchtigung der elektrischen Kopplung der Glanzstreifen durch eine dysregulierte Zell-Zell-Haftung eine Rolle spielen. Dies alles unterstreicht, dass der Glanzstreifen unter physiologischen wie pathologischen Gesichtspunkten als funktionelle Einheit mit Abhängigkeiten aller Komponenten voneinander zu sehen ist (Delmar, 2004; Delmar und McKenna, 2010).

#### **4.2. Mögliche Bedeutung der positiven Adhäsiotropie unter pathologischen Bedingungen**

Mutationen desmosomaler Proteine wie DSG2 und PG können zu arrhythmogener Kardiomyopathie führen, die einen der Hauptgründe für plötzlichen Herztod bei jungen Menschen darstellt (Corrado et al., 2017). Zwar sind bis jetzt keine Mutationen im Bereich

der in dieser Studie gefundenen PG-Phosphorylierungsstelle S665 bekannt, jedoch scheint PG auch bei Mutationen in anderen Proteinen beeinflusst und verändert zu sein. So beschrieb eine Reihe von Studien bei einem Großteil der untersuchten Patienten mit arrhythmogener Kardiomyopathie eine Reduktion des PG-Fluoreszenzsignals an den Glanzstreifen. Dies war unabhängig davon, welches desmosomale Protein mutiert war (Asimaki et al., 2009; Gehmlich et al., 2010; Noorman et al., 2013). Dieser Effekt scheint weniger durch eine Reduktion von PG, sondern mehr durch eine Veränderung der Erreichbarkeit des Epitops des in diesen Studien benutzten PG-Antikörpers hervorgerufen zu sein (Kant et al., 2016). So spielt möglicherweise eine konformationelle Änderung von PG eine zentrale Rolle bei der arrhythmogenen Kardiomyopathie, wobei Veränderungen in der Phosphorylierbarkeit von PG und somit eine Blockierung des positiven adhäsotropen Effekts der sympathischen Stimulation denkbar wären. Dazu passend scheint die arrhythmogene Kardiomyopathie durch körperliche Anstrengung und somit Sympathikusaktivierung mit erhöhter mechanischer Belastung des Herzens verstärkt symptomatisch zu werden (Thiene et al., 1988; Denis et al., 2014). Auch in einem heterozygoten PG-KO-Mausmodell war sowohl eine Aggravation des Auftretens von Arrhythmien durch körperliches Training (Kirchhof et al., 2006) als auch umgekehrt eine Hinauszögerung des Auftretens der ventrikulären Dilatation und Arrhythmien durch Vor- und Nachlast-senkende Medikamente wie Furosemid oder Nitrate im Vergleich zu WT- bzw. Placebo-behandelten Tieren nachweisbar (Fabritz et al., 2011). Zusammen mit der oben beschriebenen möglichen physiologischen Bedeutung kann man die Hypothese aufstellen, dass es bei der arrhythmogenen Kardiomyopathie durch Veränderungen von PG mit entsprechender Fehlregulation der positiven Adhäsotropie zu einer insuffizienten Anpassung der Haftung auf die gleichzeitig induzierte erhöhte mechanische Belastung zu kommen scheint. Diese führt durch den höheren mechanischen Stress möglicherweise zu einer Entkopplung der Glanzstreifen und Kardiomyozyten voneinander mit anschließender Nekrose und bindegewebigen Umbauten. Neben PG scheint außerdem DSG2 bei unterschiedlichen Mutationen der arrhythmogenen Kardiomyopathie vermindert exprimiert zu sein (Vite et al., 2013). Dies könnte eine insuffiziente positive Adhäsotropie

noch weiter verstärken, da durch eine PG-Phosphorylierung vermehrt DSG2-Moleküle mit einer erhöhten Bindungskraft an die Zell-Zell-Grenzen verschoben werden. Diese Überlegungen unterstreichen sowohl unter physiologischen als auch klinischen Gesichtspunkten die Relevanz der positiven Adhäsotropie und ihrer zugrundeliegenden Mechanismen für die Regulation der Zell-Zell-Haftung und deren Einfluss auf die gesamte Herzfunktion.

## 5. Zusammenfassung

Um eine koordinierte Kontraktion des Herzens mit Erhaltung der strukturellen Integrität zu ermöglichen, sind Kardiomyozyten jeweils an den Glanzstreifen miteinander verbunden. Desmosomen sind zusammen mit Adhärensjunktionen in diesen komplexen Strukturen essentiell für die Zell-Zell-Haftung. Das sympathische Nervensystem ist mit seinen Funktionen wie der positiven Ino-, oder Chronotropie ein Hauptregulator der Herzfunktion. Die vorliegende Arbeit untersucht daher, ob adrenerge Stimulation zur Anpassung an sich ändernde Anforderungen auch Einfluss auf die mechanische Komponente des Glanzstreifens nehmen kann. Nach adrenerger Signalwegaktivierung durch Iso oder F/R war eine deutliche Zunahme der interzellulären Haftung in kultivierten Kardiomyozyten sowie in murinen Herzschnitten feststellbar. Parallel hierzu war eine Reorganisation des desmosomalen Adhäsionsmoleküls DSG2 mit Zunahme an den Zell-Zell-Junktionen und ein Anstieg der DSG2-Bindungskraft mittels Rasterkraftmikroskopie detektierbar. Im Gegensatz hierzu zeigte sich für N-Cadherin, das Adhäsionsmolekül der Adhärensjunktionen in Kardiomyozyten, keine Veränderung. Für diese Effekte der adrenergen Stimulation wurde die Bezeichnung „positive Adhäsiotropie“ etabliert. Diese war abhängig von der Expression des desmosomalen Plaqueproteins PG und Aktivierung der PKA. So konnte durch phosphoproteomische Untersuchungen die Phosphorylierung von PG an S665 durch PKA identifiziert werden. Die Expression von an S665 phosphodefizientem PG blockierte sowohl die Stärkung der Zell-Zell-Haftung als auch die Reorganisation von DSG2 mit Zunahme der Bindungskräfte nach cAMP-Spiegelerhöhung. Außerdem waren die Herzen eines neu-etablierten PG-KO-Mausmodells nicht mehr in der Lage, die Herzfrequenz und den Pulsdruck nach adrenerger Stimulation zu erhöhen. Zusammenfassend identifiziert diese Studie eine neue grundlegende Funktion des Sympathikus im Herzen. Diese als „positive Adhäsiotropie“ bezeichnete Funktion ist abhängig von einer direkten Phosphorylierung von PG durch PKA an S665. Da eine Dysregulation von PG außerdem ein Charakteristikum der arrhythmogenen Kardiomyopathie ist, erweitern diese Ergebnisse das Wissen über die Regulation der Zell-Zell-Haftung im Herzen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Adamson, R. H., J. C. Ly, R. K. Sarai, J. F. Lenz, A. Altangerel, D. Drenckhahn und F. E. Curry (2008). Epac/Rap1 pathway regulates microvascular hyperpermeability induced by PAF in rat mesentery. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 294(3): H1188-1196.
- Agullo-Pascual, E., M. Cerrone und M. Delmar (2014). Arrhythmogenic cardiomyopathy and Brugada syndrome: diseases of the connexome. *FEBS letters* 588(8): 1322-1330.
- Agullo-Pascual, E., D. A. Reid, S. Keegan, M. Sidhu, D. Fenyo, E. Rothenberg und M. Delmar (2013). Super-resolution fluorescence microscopy of the cardiac connexome reveals plakophilin-2 inside the connexin43 plaque. *Cardiovascular research* 100(2): 231-240.
- Aktary, Z., M. Alaei und M. Pasdar (2017). Beyond cell-cell adhesion: Plakoglobin and the regulation of tumorigenesis and metastasis. *Oncotarget* 8(19): 32270-32291.
- Albrecht, L. V., L. Zhang, J. Shabanowitz, E. Purejav, J. A. Towbin, D. F. Hunt und K. J. Green (2015). GSK3- and PRMT-1-dependent modifications of desmoplakin control desmoplakin-cytoskeleton dynamics. *The Journal of cell biology* 208(5): 597-612.
- Alstrom, J. S., L. W. Stroemlund, M. S. Nielsen und N. MacAulay (2015). Protein kinase C-dependent regulation of connexin43 gap junctions and hemichannels. *Biochemical Society transactions* 43(3): 519-523.
- Aoyama, Y., M. K. Owada und Y. Kitajima (1999). A pathogenic autoantibody, pemphigus vulgaris-IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes. *European journal of immunology* 29(7): 2233-2240.
- Aoyama, Y., Y. Yamamoto, F. Yamaguchi und Y. Kitajima (2009). Low to high Ca<sup>2+</sup> -switch causes phosphorylation and association of desmocollin 3 with plakoglobin and desmoglein 3 in cultured keratinocytes. *Experimental dermatology* 18(4): 404-408.
- Asimaki, A., H. Tandri, H. Huang, M. K. Halushka, S. Gautam, C. Basso, G. Thiene, A. Tsatsopoulou, N. Protonotarios, W. J. McKenna, H. Calkins und J. E. Saffitz (2009). A new diagnostic test for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *The New England journal of medicine* 360(11): 1075-1084.
- Bass-Zubek, A. E., R. P. Hobbs, E. V. Amargo, N. J. Garcia, S. N. Hsieh, X. Chen, J. K. Wahl, 3rd, M. F. Denning und K. J. Green (2008). Plakophilin 2: a critical scaffold for PKC alpha that regulates intercellular junction assembly. *The Journal of cell biology* 181(4): 605-613.
- Bell, R. M., M. M. Mocanu und D. M. Yellon (2011). Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology* 50(6): 940-950.
- Bierkamp, C., K. J. McLaughlin, H. Schwarz, O. Huber und R. Kemler (1996). Embryonic heart and skin defects in mice lacking plakoglobin. *Developmental biology* 180(2): 780-785.

- Bierkamp, C., H. Schwarz, O. Huber und R. Kemler (1999). Desmosomal localization of beta-catenin in the skin of plakoglobin null-mutant mice. *Development* 126(2): 371-381.
- Borrmann, C. M., C. Grund, C. Kuhn, I. Hofmann, S. Pieperhoff und W. W. Franke (2006). The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. II. Colocalizations of desmosomal and fascia adhaerens molecules in the intercalated disk. *European journal of cell biology* 85(6): 469-485.
- Brandenburger, M., J. Wenzel, R. Bogdan, D. Richardt, F. Nguemo, M. Reppel, J. Hescheler, H. Terlau und A. Dendorfer (2012). Organotypic slice culture from human adult ventricular myocardium. *Cardiovascular research* 93(1): 50-59.
- Broussard, J. A., S. Getsios und K. J. Green (2015). Desmosome regulation and signaling in disease. *Cell and tissue research* 360(3): 501-512.
- Cabral, R. M., H. Wan, C. L. Cole, D. J. Abrams, D. P. Kelsell und A. P. South (2010). Identification and characterization of DSPla, a novel isoform of human desmoplakin. *Cell and tissue research* 341(1): 121-129.
- Cadwell, C. M., W. Su und A. P. Kowalczyk (2016). Cadherin tales: Regulation of cadherin function by endocytic membrane trafficking. *Traffic* 17(12): 1262-1271.
- Campbell, A. S., S. R. Johnstone, G. S. Baillie und G. Smith (2014). beta-Adrenergic modulation of myocardial conduction velocity: Connexins vs. sodium current. *Journal of molecular and cellular cardiology* 77: 147-154.
- Celentano, A. und N. Cirillo (2017). Desmosomes in disease: a guide for clinicians. *Oral diseases* 23(2): 157-167.
- Cerrone, M., J. Montnach, X. Lin, Y. T. Zhao, M. Zhang, E. Agullo-Pascual, A. Leo-Macias, F. J. Alvarado, I. Dolgalev, T. V. Karathanos, K. Malkani, C. J. M. Van Opbergen, J. J. A. van Bavel, H. Q. Yang, C. Vasquez, D. Tester, S. Fowler, F. Liang, E. Rothenberg, A. Heguy, G. E. Morley, W. A. Coetzee, N. A. Trayanova, M. J. Ackerman, T. A. B. van Veen, H. H. Valdivia und M. Delmar (2017). Plakophilin-2 is required for transcription of genes that control calcium cycling and cardiac rhythm. *Nature communications* 8(1): 106.
- Chelko, S. P., A. Asimaki, P. Andersen, D. Bedja, N. Amat-Alarcon, D. DeMazumder, R. Jasti, C. A. MacRae, R. Leber, A. G. Kleber, J. E. Saffitz und D. P. Judge (2016). Central role for GSK3beta in the pathogenesis of arrhythmogenic cardiomyopathy. *JCI insight* 1(5).
- Chen, J., O. E. Nekrasova, D. M. Patel, J. L. Klessner, L. M. Godsel, J. L. Koetsier, E. V. Amargo, B. V. Desai und K. J. Green (2012). The C-terminal unique region of desmoglein 2 inhibits its internalization via tail-tail interactions. *The Journal of cell biology* 199(4): 699-711.
- Chtcheglova, L. A., J. Waschke, L. Wildling, D. Drenckhahn und P. Hinterdorfer (2007). Nano-scale dynamic recognition imaging on vascular endothelial cells. *Biophysical journal* 93(2): L11-13.
- Claycomb, W. C., N. A. Lanson, Jr., B. S. Stallworth, D. B. Egeland, J. B. Delcarpio, A. Bahinski und N. J. Izzo, Jr. (1998). HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(6): 2979-2984.

- Corrado, D., M. S. Link und H. Calkins (2017). Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *The New England journal of medicine* 376(1): 61-72.
- Darrow, B. J., V. G. Fast, A. G. Kleber, E. C. Beyer und J. E. Saffitz (1996). Functional and structural assessment of intercellular communication. Increased conduction velocity and enhanced connexin expression in dibutyryl cAMP-treated cultured cardiac myocytes. *Circulation research* 79(2): 174-183.
- De Backer, D. (2011). Treatment of shock. *Acta clinica Belgica* 66(6): 438-442.
- Dehner, C., V. Rotzer, J. Waschke und V. Spindler (2014). A desmoplakin point mutation with enhanced keratin association ameliorates pemphigus vulgaris autoantibody-mediated loss of cell cohesion. *The American journal of pathology* 184(9): 2528-2536.
- Delmar, M. (2004). The intercalated disk as a single functional unit. *Heart rhythm* 1(1): 12-13.
- Delmar, M., D. W. Laird, C. C. Naus, M. S. Nielsen, V. K. Verselis und T. W. White (2017). Connexins and Disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*.
- Delmar, M. und W. J. McKenna (2010). The cardiac desmosome and arrhythmogenic cardiomyopathies: from gene to disease. *Circulation research* 107(6): 700-714.
- Delva, E., D. K. Tucker und A. P. Kowalczyk (2009). The desmosome. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1(2): a002543.
- Denis, A., F. Sacher, N. Derval, H. S. Lim, H. Cochet, A. J. Shah, M. Daly, X. Pillois, K. Ramoul, Y. Komatsu, A. Zemmoura, S. Amraoui, P. Ritter, S. Ploux, P. Bordachar, M. Hocini, P. Jais und M. Haissaguerre (2014). Diagnostic value of isoproterenol testing in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology* 7(4): 590-597.
- Duquesnes, N., M. Derangeon, M. Metrich, A. Lucas, P. Mateo, L. Li, E. Morel, F. Lezoualc'h und B. Crozatier (2010). Epac stimulation induces rapid increases in connexin43 phosphorylation and function without preconditioning effect. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 460(4): 731-741.
- Dusek, R. L., L. M. Godsel und K. J. Green (2007). Discriminating roles of desmosomal cadherins: beyond desmosomal adhesion. *Journal of dermatological science* 45(1): 7-21.
- Ebner, A., L. Wildling, A. S. Kamruzzahan, C. Rankl, J. Wruss, C. D. Hahn, M. Holzl, R. Zhu, F. Kienberger, D. Blaas, P. Hinterdorfer und H. J. Gruber (2007). A new, simple method for linking of antibodies to atomic force microscopy tips. *Bioconjugate chemistry* 18(4): 1176-1184.
- Ek-Vitorin, J. F., T. J. King, N. S. Heyman, P. D. Lampe und J. M. Burt (2006). Selectivity of connexin 43 channels is regulated through protein kinase C-dependent phosphorylation. *Circulation research* 98(12): 1498-1505.
- Ernst, L. A., R. K. Gupta, R. B. Mujumdar und A. S. Waggoner (1989). Cyanine dye labeling reagents for sulfhydryl groups. *Cytometry* 10(1): 3-10.
- Fabritz, L., M. G. Hoogendijk, B. P. Scicluna, S. C. van Amersfoort, L. Fortmueller, S. Wolf, S. Laakmann, N. Kreienkamp, I. Piccini, G. Breithardt, P. R. Noppinger, H. Witt, K. Ebnet, T. Wichter, B. Levkau, W. W. Franke, S. Pieperhoff, J. M. de Bakker, R. Coronel und P. Kirchhof (2011). Load-reducing therapy prevents development of

- arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in plakoglobin-deficient mice. *Journal of the American College of Cardiology* 57(6): 740-750.
- Farman, G. P., K. Tachampa, R. Mateja, O. Cazorla, A. Lacampagne und P. P. de Tombe (2008). Blebbistatin: use as inhibitor of muscle contraction. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 455(6): 995-1005.
- Fontaine, G., R. Frank, J. L. Tonet, G. Guiraudon, C. Cabrol, G. Chomette und Y. Grosogeat (1984). Arrhythmogenic right ventricular dysplasia: a clinical model for the study of chronic ventricular tachycardia. *Japanese circulation journal* 48(6): 515-538.
- Franke, W. W., C. M. Borrmann, C. Grund und S. Pieperhoff (2006). The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. I. Molecular definition in intercalated disks of cardiomyocytes by immunoelectron microscopy of desmosomal proteins. *European journal of cell biology* 85(2): 69-82.
- Fujita, T., M. Umemura, U. Yokoyama, S. Okumura und Y. Ishikawa (2017). The role of Epac in the heart. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 74(4): 591-606.
- Fukuhara, S., A. Sakurai, H. Sano, A. Yamagishi, S. Somekawa, N. Takakura, Y. Saito, K. Kangawa und N. Mochizuki (2005). Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway. *Molecular and cellular biology* 25(1): 136-146.
- Garcia-Gras, E., R. Lombardi, M. J. Giocondo, J. T. Willerson, M. D. Schneider, D. S. Khoury und A. J. Marian (2006). Suppression of canonical Wnt/beta-catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *The Journal of clinical investigation* 116(7): 2012-2021.
- Garrod, D. und T. E. Kimura (2008). Hyper-adhesion: a new concept in cell-cell adhesion. *Biochemical Society transactions* 36(Pt 2): 195-201.
- Garrod, D. und L. Tabernero (2014). Hyper-adhesion: a unique property of desmosomes. *Cell communication & adhesion* 21(5): 249-256.
- Garrod, D. R. (2013). The assay that defines desmosome hyper-adhesion. *The Journal of investigative dermatology* 133(2): 576-577.
- Gaudry, C. A., H. L. Palka, R. L. Dusek, A. C. Huen, M. J. Khandekar, L. G. Hudson und K. J. Green (2001). Tyrosine-phosphorylated plakoglobin is associated with desmogleins but not desmoplakin after epidermal growth factor receptor activation. *The Journal of biological chemistry* 276(27): 24871-24880.
- Gehmlich, K., A. Asimaki, T. J. Cahill, E. Ehler, P. Syrris, E. Zachara, F. Re, A. Avella, L. Monserrat, J. E. Saffitz und W. J. McKenna (2010). Novel missense mutations in exon 15 of desmoglein-2: role of the intracellular cadherin segment in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy? *Heart rhythm* 7(10): 1446-1453.
- Gehmlich, K., P. D. Lambiase, A. Asimaki, E. J. Ciaccio, E. Ehler, P. Syrris, J. E. Saffitz und W. J. McKenna (2011). A novel desmocollin-2 mutation reveals insights into the molecular link between desmosomes and gap junctions. *Heart rhythm* 8(5): 711-718.

- Giloh, H. und J. W. Sedat (1982). Fluorescence microscopy: reduced photobleaching of rhodamine and fluorescein protein conjugates by n-propyl gallate. *Science* 217(4566): 1252-1255.
- Godsel, L. M., S. N. Hsieh, E. V. Amargo, A. E. Bass, L. T. Pascoe-McGillicuddy, A. C. Huen, M. E. Thorne, C. A. Gaudry, J. K. Park, K. Myung, R. D. Goldman, T. L. Chew und K. J. Green (2005). Desmoplakin assembly dynamics in four dimensions: multiple phases differentially regulated by intermediate filaments and actin. *The Journal of cell biology* 171(6): 1045-1059.
- Goossens, S., B. Janssens, S. Bonne, R. De Rycke, F. Braet, J. van Hengel und F. van Roy (2007). A unique and specific interaction between alphaT-catenin and plakophilin-2 in the area composita, the mixed-type junctional structure of cardiac intercalated discs. *Journal of cell science* 120(Pt 12): 2126-2136.
- Griswold, D. E., E. F. Webb, J. Breton, J. R. White, P. J. Marshall und T. J. Torphy (1993). Effect of selective phosphodiesterase type IV inhibitor, rolipram, on fluid and cellular phases of inflammatory response. *Inflammation* 17(3): 333-344.
- Harper, S. und D. W. Speicher (2011). Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods in molecular biology* 681: 259-280.
- Harrison, O. J., J. Brasch, G. Lasso, P. S. Katsamba, G. Ahlsen, B. Honig und L. Shapiro (2016). Structural basis of adhesive binding by desmocollins and desmogleins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(26): 7160-7165.
- Hatzfeld, M. (2007). Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochimica et biophysica acta* 1773(1): 69-77.
- Hinterdorfer, P. und Y. F. Dufrene (2006). Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nature methods* 3(5): 347-355.
- Holz, G. G., G. Kang, M. Harbeck, M. W. Roe und O. G. Chepurny (2006). Cell physiology of cAMP sensor Epac. *The Journal of physiology* 577(Pt 1): 5-15.
- Ishii, K., R. Harada, I. Matsuo, Y. Shirakata, K. Hashimoto und M. Amagai (2005). In vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 IgG autoantibodies in pemphigus vulgaris. *The Journal of investigative dermatology* 124(5): 939-946.
- Kaestner, L., A. Scholz und P. Lipp (2015). Conceptual and technical aspects of transfection and gene delivery. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 25(6): 1171-1176.
- Kandela, I. K., R. Bleher und R. M. Albrecht (2007). Multiple correlative immunolabeling for light and electron microscopy using fluorophores and colloidal metal particles. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 55(10): 983-990.
- Kant, S., B. Holthofer, T. M. Magin, C. A. Krusche und R. E. Leube (2015). Desmoglein 2-Dependent Arrhythmogenic Cardiomyopathy Is Caused by a Loss of Adhesive Function. *Circulation Cardiovascular genetics* 8(4): 553-563.
- Kant, S., C. A. Krusche, A. Gaertner, H. Milting und R. E. Leube (2016). Loss of plakoglobin immunoreactivity in intercalated discs in arrhythmogenic right ventricular

- cardiomyopathy: protein mislocalization versus epitope masking. *Cardiovascular research* 109(2): 260-271.
- Kaplan, S. R., J. J. Gard, N. Protonotarios, A. Tsatsopoulou, C. Spiliopoulou, A. Anastasakis, C. P. Squarcioni, W. J. McKenna, G. Thiene, C. Basso, N. Brousse, G. Fontaine und J. E. Saffitz (2004). Remodeling of myocyte gap junctions in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy due to a deletion in plakoglobin (Naxos disease). *Heart rhythm* 1(1): 3-11.
- Kinoshita, E., E. Kinoshita-Kikuta, K. Takiyama und T. Koike (2006). Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Molecular & cellular proteomics* : MCP 5(4): 749-757.
- Kirchhof, P., L. Fabritz, M. Zwiener, H. Witt, M. Schafers, S. Zellerhoff, M. Paul, T. Athai, K. H. Hiller, H. A. Baba, G. Breithardt, P. Ruiz, T. Wichter und B. Levkau (2006). Age- and training-dependent development of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in heterozygous plakoglobin-deficient mice. *Circulation* 114(17): 1799-1806.
- Kljuic, A., R. C. Bauer und A. M. Christiano (2004). Genomic organization of mouse desmocollin genes reveals evolutionary conservation. *DNA sequence : the journal of DNA sequencing and mapping* 15(2): 148-152.
- Kroger, C., F. Loschke, N. Schwarz, R. Windoffer, R. E. Leube und T. M. Magin (2013). Keratins control intercellular adhesion involving PKC-alpha-mediated desmoplakin phosphorylation. *The Journal of cell biology* 201(5): 681-692.
- Kuhn, R. und R. M. Torres (2002). Cre/loxP recombination system and gene targeting. *Methods in molecular biology* 180: 175-204.
- Kumar, N. M. und N. B. Gilula (1996). The gap junction communication channel. *Cell* 84(3): 381-388.
- Kurrle, N., F. Vollner, R. Eming, M. Hertl, A. Banning und R. Tikkanen (2013). Flotillins directly interact with gamma-catenin and regulate epithelial cell-cell adhesion. *PLoS one* 8(12): e84393.
- La Gerche, A., H. Heidbuchel, A. T. Burns, D. J. Mooney, A. J. Taylor, H. B. Pfluger, W. J. Inder, A. I. Macisaac und D. L. Prior (2011). Disproportionate exercise load and remodeling of the athlete's right ventricle. *Medicine and science in sports and exercise* 43(6): 974-981.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Langendorff, O. (1895). Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* 61(6): 291-332.
- Li, D., Y. Liu, M. Maruyama, W. Zhu, H. Chen, W. Zhang, S. Reuter, S. F. Lin, L. S. Haneline, L. J. Field, P. S. Chen und W. Shou (2011a). Restrictive loss of plakoglobin in cardiomyocytes leads to arrhythmogenic cardiomyopathy. *Human molecular genetics* 20(23): 4582-4596.
- Li, J., M. D. Levin, Y. Xiong, N. Petrenko, V. V. Patel und G. L. Radice (2008). N-cadherin haploinsufficiency affects cardiac gap junctions and arrhythmic susceptibility. *Journal of molecular and cellular cardiology* 44(3): 597-606.

- Li, J., D. Swope, N. Raess, L. Cheng, E. J. Muller und G. L. Radice (2011b). Cardiac tissue-restricted deletion of plakoglobin results in progressive cardiomyopathy and activation of {beta}-catenin signaling. *Molecular and cellular biology* 31(6): 1134-1144.
- Lopez-Sendon, J., K. Swedberg, J. McMurray, J. Tamargo, A. P. Maggioni, H. Dargie, M. Tendera, F. Waagstein, J. Kjekshus, P. Lechat, C. Torp-Pedersen und C. Task Force On Beta-Blockers of the European Society of (2004). Expert consensus document on beta-adrenergic receptor blockers. *European heart journal* 25(15): 1341-1362.
- Lüllmann-Rauch, R. und F. Paulsen (2012). Histologie, völlig überarbeitete 4. Auflage, 694 S. *Thieme*.
- Luo, Y. und G. L. Radice (2003). Cadherin-mediated adhesion is essential for myofibril continuity across the plasma membrane but not for assembly of the contractile apparatus. *Journal of cell science* 116(Pt 8): 1471-1479.
- Lymperopoulos, A., G. Rengo und W. J. Koch (2013). Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circulation research* 113(6): 739-753.
- Lyon, R. C., V. Mezzano, A. T. Wright, E. Pfeiffer, J. Chuang, K. Banares, A. Castaneda, K. Ouyang, L. Cui, R. Contu, Y. Gu, S. M. Evans, J. H. Omens, K. L. Peterson, A. D. McCulloch und F. Sheikh (2014). Connexin defects underlie arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in a novel mouse model. *Human molecular genetics* 23(5): 1134-1150.
- Mancia, G., R. Fagard, K. Narkiewicz, J. Redon, A. Zanchetti, M. Bohm, T. Christiaens, R. Cifkova, G. De Backer, A. Dominiczak, M. Galderisi, D. E. Grobbee, T. Jaarsma, P. Kirchhof, S. E. Kjeldsen, S. Laurent, A. J. Manolis, P. M. Nilsson, L. M. Ruilope, R. E. Schmieder, P. A. Sirnes, P. Sleight, M. Viigimaa, B. Waeber, F. Zannad, J. Redon, A. Dominiczak, K. Narkiewicz, P. M. Nilsson, M. Burnier, M. Viigimaa, E. Ambrosioni, M. Caulfield, A. Coca, M. H. Olsen, R. E. Schmieder, C. Tsioufis, P. van de Borne, J. L. Zamorano, S. Achenbach, H. Baumgartner, J. J. Bax, H. Bueno, V. Dean, C. Deaton, C. Erol, R. Fagard, R. Ferrari, D. Hasdai, A. W. Hoes, P. Kirchhof, J. Knuuti, P. Kolh, P. Lancellotti, A. Linhart, P. Nihoyannopoulos, M. F. Piepoli, P. Ponikowski, P. A. Sirnes, J. L. Tamargo, M. Tendera, A. Torbicki, W. Wijns, S. Windecker, D. L. Clement, A. Coca, T. C. Gillebert, M. Tendera, E. A. Rosei, E. Ambrosioni, S. D. Anker, J. Bauersachs, J. B. Hitij, M. Caulfield, M. De Buyzere, S. De Geest, G. A. Derumeaux, S. Erdine, C. Farsang, C. Funck-Brentano, V. Gerc, G. Germano, S. Gielen, H. Haller, A. W. Hoes, J. Jordan, T. Kahan, M. Komajda, D. Lovic, H. Mahrholdt, M. H. Olsen, J. Ostergren, G. Parati, J. Perk, J. Polonia, B. A. Popescu, Z. Reiner, L. Ryden, Y. Sirenko, A. Stanton, H. Struijker-Boudier, C. Tsioufis, P. van de Borne, C. Vlachopoulos, M. Volpe und D. A. Wood (2013). 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal* 34(28): 2159-2219.
- Marcus, F. I., W. Zareba, H. Calkins, J. A. Towbin, C. Basso, D. A. Bluemke, N. A. Estes, 3rd, M. H. Picard, D. Sanborn, G. Thiene, T. Wichter, D. Cannom, D. J. Wilber, M.

- Scheinman, H. Duff, J. Daubert, M. Talajic, A. Krahn, M. Sweeney, H. Garan, S. Sakaguchi, B. B. Lerman, C. Kerr, J. Kron, J. S. Steinberg, D. Sherrill, K. Gear, M. Brown, P. Severski, S. Polonsky und S. McNitt (2009). Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia clinical presentation and diagnostic evaluation: results from the North American Multidisciplinary Study. *Heart rhythm* 6(7): 984-992.
- Mehta, D. und A. B. Malik (2006). Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiological reviews* 86(1): 279-367.
- Meng, W. und M. Takeichi (2009). Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1(6): a002899.
- Michel, C. C. und F. E. Curry (1999). Microvascular permeability. *Physiological reviews* 79(3): 703-761.
- Murray, A. J. (2008). Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Science signaling* 1(22): re4.
- Nagar, B., M. Overduin, M. Ikura und J. M. Rini (1996). Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* 380(6572): 360-364.
- Nassal, M. M., A. A. Werdich, X. Wan, M. Hoshi, I. Deschenes, D. S. Rosenbaum und J. K. Donahue (2016). Phosphorylation at Connexin43 Serine-368 Is Necessary for Myocardial Conduction During Metabolic Stress. *Journal of cardiovascular electrophysiology* 27(1): 110-119.
- Nekrasova, O. und K. J. Green (2013). Desmosome assembly and dynamics. *Trends in cell biology* 23(11): 537-546.
- Neuberger, G., G. Schneider und F. Eisenhaber (2007). pkaPS: prediction of protein kinase A phosphorylation sites with the simplified kinase-substrate binding model. *Biology direct* 2: 1.
- Nie, Z., A. Merritt, M. Rouhi-Parkouhi, L. Tabernero und D. Garrod (2011). Membrane-impermeable cross-linking provides evidence for homophilic, isoform-specific binding of desmosomal cadherins in epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 286(3): 2143-2154.
- Nielsen, M. S., L. N. Axelsen, P. L. Sorgen, V. Verma, M. Delmar und N. H. Holstein-Rathlou (2012). Gap junctions. *Comprehensive Physiology* 2(3): 1981-2035.
- Noorman, M., S. Hakim, A. Asimaki, A. Vreker, H. V. van Rijen, M. A. van der Heyden, N. de Jonge, R. A. de Weger, R. N. Hauer, J. E. Saffitz und T. A. van Veen (2013). Reduced plakoglobin immunoreactivity in arrhythmogenic cardiomyopathy: methodological considerations. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 22(5): 314-318.
- Ostap, E. M. (2002). 2,3-Butanedione monoxime (BDM) as a myosin inhibitor. *Journal of muscle research and cell motility* 23(4): 305-308.
- Patel, D. M. und K. J. Green (2014). Desmosomes in the heart: a review of clinical and mechanistic analyses. *Cell communication & adhesion* 21(3): 109-128.
- Ponikowski, P., A. A. Voors, S. D. Anker, H. Bueno, J. G. Cleland, A. J. Coats, V. Falk, J. R. Gonzalez-Juanatey, V. P. Harjola, E. A. Jankowska, M. Jessup, C. Linde, P. Nihoyannopoulos, J. T. Parissis, B. Pieske, J. P. Riley, G. M. Rosano, L. M. Ruilope, F. Ruschitzka, F. H. Rutten, P. van der Meer und M. Authors/Task Force (2016).

- 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European heart journal* 37(27): 2129-2200.
- Protonotarios, A., A. Anastasakis, D. B. Panagiotakos, L. Antoniades, P. Syrris, A. Vouliotis, C. Stefanadis, A. Tsatsopoulou, W. J. McKenna und N. Protonotarios (2016). Arrhythmic risk assessment in genotyped families with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology* 18(4): 610-616.
- Radeva, M. Y. und J. Waschke (2017). Mind the gap: mechanisms regulating the endothelial barrier. *Acta physiologica*.
- Rizzo, S., E. M. Lodder, A. O. Verkerk, R. Wolswinkel, L. Beekman, K. Pilichou, C. Basso, C. A. Remme, G. Thiene und C. R. Bezzina (2012). Intercalated disc abnormalities, reduced Na(+) current density, and conduction slowing in desmoglein-2 mutant mice prior to cardiomyopathic changes. *Cardiovascular research* 95(4): 409-418.
- Rockman, H. A., W. J. Koch und R. J. Lefkowitz (2002). Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* 415(6868): 206-212.
- Rotzer, V., A. Breit, J. Waschke und V. Spindler (2014). Adducin is required for desmosomal cohesion in keratinocytes. *The Journal of biological chemistry* 289(21): 14925-14940.
- Rotzer, V., E. Hartlieb, F. Vielmuth, M. Gliem, V. Spindler und J. Waschke (2015). E-cadherin and Src associate with extradesmosomal Dsg3 and modulate desmosome assembly and adhesion. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72(24): 4885-4897.
- Santibanez, J. F., D. Olivares, J. Guerrero und J. Martinez (2003). Cyclic AMP inhibits TGFbeta1-induced cell-scattering and invasiveness in murine-transformed keratinocytes. *International journal of cancer* 107(5): 715-720.
- Sato, P. Y., W. Coombs, X. Lin, O. Nekrasova, K. J. Green, L. L. Isom, S. M. Taffet und M. Delmar (2011). Interactions between ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin43 at the cardiac intercalated disc. *Circulation research* 109(2): 193-201.
- Sato, P. Y., H. Musa, W. Coombs, G. Guerrero-Serna, G. A. Patino, S. M. Taffet, L. L. Isom und M. Delmar (2009). Loss of plakophilin-2 expression leads to decreased sodium current and slower conduction velocity in cultured cardiac myocytes. *Circulation research* 105(6): 523-526.
- Schick, M. A., C. Wunder, J. Wollborn, N. Roewer, J. Waschke, C. T. Germer und N. Schlegel (2012). Phosphodiesterase-4 inhibition as a therapeutic approach to treat capillary leakage in systemic inflammation. *The Journal of physiology* 590(11): 2693-2708.
- Schinner, C., F. Vielmuth, V. Rotzer, M. Hiermaier, M. Y. Radeva, T. K. Co, E. Hartlieb, A. Schmidt, A. Imhof, A. Messoudi, A. Horn, A. Schlipp, V. Spindler und J. Waschke

- (2017). Adrenergic Signaling Strengthens Cardiac Myocyte Cohesion. *Circulation research* 120(8): 1305-1317.
- Schlegel, N., M. Meir, W. M. Heupel, B. Holthofer, R. E. Leube und J. Waschke (2010). Desmoglein 2-mediated adhesion is required for intestinal epithelial barrier integrity. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 298(5): G774-783.
- Schlegel, N. und J. Waschke (2009). Impaired cAMP and Rac 1 signaling contribute to TNF-alpha-induced endothelial barrier breakdown in microvascular endothelium. *Microcirculation* 16(6): 521-533.
- Schlipp, A., C. Schinner, V. Spindler, F. Vielmuth, K. Gehmlich, P. Syrris, W. J. McKenna, A. Dendorfer, E. Hartlieb und J. Waschke (2014). Desmoglein-2 interaction is crucial for cardiomyocyte cohesion and function. *Cardiovascular research* 104(2): 245-257.
- Scholz, H. (1989). Mechanisms of positive inotropic effects. *Basic research in cardiology* 84 Suppl 1: 3-7.
- Schumann, H. J. (1983). What role do alpha- and beta-adrenoceptors play in the regulation of the heart? *European heart journal* 4 Suppl A: 55-60.
- Severs, N. J. (1985). Intercellular junctions and the cardiac intercalated disk. *Advances in myocardiology* 5: 223-242.
- Singletary, E. M., D. A. Zideman, E. D. De Buck, W. T. Chang, J. L. Jensen, J. M. Swain, J. A. Woodin, I. E. Blanchard, R. A. Herrington, J. L. Pellegrino, N. A. Hood, L. F. Lojero-Wheatley, D. S. Markenson, H. J. Yang und C. First Aid Chapter (2015). Part 9: First Aid: 2015 International Consensus on First Aid Science With Treatment Recommendations. *Circulation* 132(16 Suppl 1): S269-311.
- Slattery, A. D., A. J. Blanch, J. S. Quinton und C. T. Gibson (2013). Calibration of atomic force microscope cantilevers using standard and inverted static methods assisted by FIB-milled spatial markers. *Nanotechnology* 24(1): 015710.
- Smyth, J. W., T. T. Hong, D. Gao, J. M. Vogan, B. C. Jensen, T. S. Fong, P. C. Simpson, D. Y. Stainier, N. C. Chi und R. M. Shaw (2010). Limited forward trafficking of connexin 43 reduces cell-cell coupling in stressed human and mouse myocardium. *The Journal of clinical investigation* 120(1): 266-279.
- Soar, J., C. W. Callaway, M. Aibiki, B. W. Bottiger, S. C. Brooks, C. D. Deakin, M. W. Donnino, S. Drajer, W. Kloeck, P. T. Morley, L. J. Morrison, R. W. Neumar, T. C. Nicholson, J. P. Nolan, K. Okada, B. J. O'Neil, E. F. Paiva, M. J. Parr, T. L. Wang, J. Witt und C. Advanced Life Support Chapter (2015). Part 4: Advanced life support: 2015 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science with Treatment Recommendations. *Resuscitation* 95: e71-120.
- Somekawa, S., S. Fukuhara, Y. Nakaoka, H. Fujita, Y. Saito und N. Mochizuki (2005). Enhanced functional gap junction neofunction by protein kinase A-dependent and Epac-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes. *Circulation research* 97(7): 655-662.
- Spindler, V., D. Peter, G. S. Harms, E. Asan und J. Waschke (2011). Ultrastructural analysis reveals cAMP-dependent enhancement of microvascular endothelial barrier

- functions via Rac1-mediated reorganization of intercellular junctions. *The American journal of pathology* 178(5): 2424-2436.
- Spindler, V., F. Vielmuth, E. Schmidt, D. S. Rubenstein und J. Waschke (2010). Protective endogenous cyclic adenosine 5'-monophosphate signaling triggered by pemphigus autoantibodies. *Journal of immunology* 185(11): 6831-6838.
- Spindler, V. und J. Waschke (2011). Beta-adrenergic stimulation contributes to maintenance of endothelial barrier functions under baseline conditions. *Microcirculation* 18(2): 118-127.
- Standring, S. (2015). *Gray's Anatomy*, 41. Auflage, 1584 S. Elsevier.
- Stroemlund, L. W., C. F. Jensen, K. Qvortrup, M. Delmar und M. S. Nielsen (2015). Gap junctions - guards of excitability. *Biochemical Society transactions* 43(3): 508-512.
- Tariq, H., J. Bella, T. A. Jowitt, D. F. Holmes, M. Rouhi, Z. Nie, C. Baldock, D. Garrod und L. Tabernero (2015). Cadherin flexibility provides a key difference between desmosomes and adherens junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(17): 5395-5400.
- Thiene, G., A. Nava, D. Corrado, L. Rossi und N. Pennelli (1988). Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people. *The New England journal of medicine* 318(3): 129-133.
- Thomason, H. A., A. Scothern, S. McHarg und D. R. Garrod (2010). Desmosomes: adhesive strength and signalling in health and disease. *The Biochemical journal* 429(3): 419-433.
- Todorovic, V., J. L. Koetsier, L. M. Godsel und K. J. Green (2014). Plakophilin 3 mediates Rap1-dependent desmosome assembly and adherens junction maturation. *Molecular biology of the cell* 25(23): 3749-3764.
- Troposkiadis, F., G. Karayannis, G. Giamouzis, J. Skoularigis, G. Louridas und J. Butler (2009). The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. *Journal of the American College of Cardiology* 54(19): 1747-1762.
- Vielmuth, F., E. Hartlieb, D. Kugelmann, J. Waschke und V. Spindler (2015). Atomic force microscopy identifies regions of distinct desmoglein 3 adhesive properties on living keratinocytes. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 11(3): 511-520.
- Vielmuth, F., M. T. Wanuske, M. Y. Radeva, M. Hiermaier, D. Kugelmann, E. Walter, F. Buechau, T. M. Magin, J. Waschke und V. Spindler (2018). Keratins Regulate the Adhesive Properties of Desmosomal Cadherins through Signaling. *J Invest Dermatol* 138(1): 121-131.
- Vite, A., E. Gandjbakhch, C. Prost, V. Fressart, P. Fouret, N. Neyroud, F. Gary, E. Donal, S. Varnous, G. Fontaine, P. Fornes, F. Hidden-Lucet, M. Komajda, P. Charron und E. Villard (2013). Desmosomal cadherins are decreased in explanted arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy patient hearts. *PLoS one* 8(9): e75082.
- Vite, A. und G. L. Radice (2014). N-cadherin/catenin complex as a master regulator of intercalated disc function. *Cell communication & adhesion* 21(3): 169-179.

- Waschke, J. (2008). The desmosome and pemphigus. *Histochemistry and cell biology* 130(1): 21-54.
- Waschke, J., T. M. Böckers und F. Paulsen (2015). Sobotta Lehrbuch Anatomie, 1. Auflage, 848 S. *Urban & Fischer Verlag*.
- Waschke, J. und V. Spindler (2014). Desmosomes and extradesmosomal adhesive signaling contacts in pemphigus. *Medicinal research reviews* 34(6): 1127-1145.
- White, S. M., P. E. Constantin und W. C. Claycomb (2004). Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 286(3): H823-829.
- Whitehead, T. P., L. J. Kricka, T. J. Carter und G. H. Thorpe (1979). Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clinical chemistry* 25(9): 1531-1546.
- Wickline, E. D., P. K. Awuah, J. Behari, M. Ross, D. B. Stolz und S. P. Monga (2011). Hepatocyte gamma-catenin compensates for conditionally deleted beta-catenin at adherens junctions. *Journal of hepatology* 55(6): 1256-1262.
- Wickline, E. D., Y. Du, D. B. Stolz, M. Kahn und S. P. Monga (2013). gamma-Catenin at adherens junctions: mechanism and biologic implications in hepatocellular cancer after beta-catenin knockdown. *Neoplasia* 15(4): 421-434.
- Yin, T., S. Getsios, R. Caldelari, L. M. Godsel, A. P. Kowalczyk, E. J. Muller und K. J. Green (2005). Mechanisms of plakoglobin-dependent adhesion: desmosome-specific functions in assembly and regulation by epidermal growth factor receptor. *The Journal of biological chemistry* 280(48): 40355-40363.
- Yin, T. und K. J. Green (2004). Regulation of desmosome assembly and adhesion. *Seminars in cell & developmental biology* 15(6): 665-677.
- Zhou, L., T. Pradhan-Sundd, M. Poddar, S. Singh, A. Kikuchi, D. B. Stolz, W. Shou, Z. Li, K. N. Nejak-Bowen und S. P. Monga (2015). Mice with Hepatic Loss of the Desmosomal Protein gamma-Catenin Are Prone to Cholestatic Injury and Chemical Carcinogenesis. *The American journal of pathology* 185(12): 3274-3289.

## 7. Anhang

### 7.1. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
+	und
±	plus/minus
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µm/s	Mikrometer pro Sekunde
µm <sup>2</sup>	Quadratmikrometer
µmol/l	Mikromol pro Liter
A	Alanin
Abb.	Abbildung
AFM	Rasterkraftmikroskopie (engl.: „Atomic force microscopy“)
ÄMP	äußere Membranplaque
ANOVA	einfaktorielle Varianzanalyse (engl.: „Analysis of variance“)
anti-DSG2-mRb	monoklonaler DSG2-Antikörper, Spezies: Kaninchen (Rb)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARM	repetitive Domäne in Armadillo-Proteinen
ATP	Adenosintriphosphat
Azan	Azokarmin-/ Anilinblau-Orange-Färbung
BCA	Bicinchoninsäure
BDM	2-,3-Butandionmonoxim
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CHO	ovariale Zelllinie aus dem chinesischen Zwerghamster (engl.: „Chinese hamster ovary cells“)
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cre	Gen der Rekombinase Cre, murin
Cu <sup>1+</sup>	Kupfer(I)-Ion
Cu <sup>2+</sup>	Kupfer(II)-Ion
CX43	Connexin-43

Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocarbocyanin
Cy5	Indodicarbocyanin
dest.	destilliert
DM	dichte Mittellinie
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	Desmoplakin
Dr.	Doktor
DSC	Desmocollin
DSG	Desmoglein
DTT	Dithiothreitol
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (engl.: „Enhanced chemiluminescence“)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl.: „Epidermal growth factor receptor“)
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
engl.	englisch
EPAC	Austauschprotein, direkt aktiviert von cAMP (engl.: „Exchange protein directly activated by cAMP“)
et al.	und weitere
F/R	Forskolin/Rolipram
F-Aktin	filamentäres Aktin
Fc	kristallisierbares Fragment eines Antikörpers (engl.: „Crystallisable fragment“)
<i>flox</i>	von <i>loxP</i> -Stellen flankiert (engl.: „Flanked by <i>loxP</i> “)
FRET	Förster-Resonanz-Energietransfer
G	Erdbeschleunigung
g	Gramm
gam	Ziege-anti-Maus-Fc (engl.: „Goat anti-mouse“)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
garb	Ziege-anti-Kaninchen-Fc (engl.: „Goat anti-rabbit“)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung (engl.: „Hank’s balanced salt solution“)
HCl	Salzsäure

HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IF	Immunfluoreszenzdarstellung
IgG	Immunglobulin G
IMP	innere Membranplaque
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Iso	Isoprenalin
<i>Jup</i>	Gen von PG, murin
K <sup>+</sup>	Kalium-Ion
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LB	lysogene Brühe
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
mA	Milliampere
MEM NEA	nicht-essentielle Aminosäuren (engl.: „Minimum essential medium, non-essential amino acids“)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgHPO <sub>4</sub>	Magnesiumhydrogenphosphat
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm/s	Millimeter pro Sekunde
mmH <sub>2</sub> O	Millimeter Wassersäule
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol/l	Millimol pro Liter
Mn <sup>2+</sup>	Mangan-Ion
Mn <sub>2</sub> Cl	Manganchlorid
mol/l	Mol pro Liter
MTT	Thiazolylblau (engl.: „Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide“)
<i>Myh6</i>	Gen der schweren Kette des Myosins $\alpha$ , murin
<i>n</i>	Anzahl experimenteller Wiederholungen
n. verw.	nicht verwendet
N/m	Newton pro Meter

NA	numerische Apparatur
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NCAD	N-Cadherin, Cadherin-2
ng	Nanogramm
NGS	normales Ziegen Serum (engl.: „Normal goat serum“)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
nN	Nanonewton
NPG	N-Propylgallat
∅	Durchmesser
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCA	P-Cumarsäure
PEG	Polyethylenglykol
PG	Plakoglobin, γ-Catenin
PG-KO	herzspezifische PG-Defizienz (engl.: „PG knock out“)
pH	pH-Wert
PKA	Proteinkinase A
<i>Pkaca</i>	Gen der PKACα, murin
<i>Pkacb</i>	Gen der PKACβ, murin
PKACα	katalytische PKA-Untereinheit-α
PKACβ	katalytische PKA-Untereinheit-β
PKACγ	katalytische PKA-Untereinheit-γ
PKCα	Proteinkinase Cα
PKP	Plakophilin
PM	Plasmamembran
pmol/ml	Pikomol pro Milliliter
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POX	Peroxidase
PPL	Marker mit vorgefärbten Proteinen bekannter Größe (engl.: „Prestained protein ladder“)
Prof.	Professor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Runden pro Minute

RUD	sich wiederholende Einheiten im zytoplasmatischen Teil von Desmogleinen (engl.: „Repeating unit domains“)
s	Sekunde
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: „Sodium dodecyl sulfate“)
SEM	Standardfehler (engl.: „Standard error of the mean“)
siNT	siRNA Kontrolle (engl.: „Non-targeting siRNA“)
siPG	spezifische siRNA zur Herunterregulation von PG
siPKA	Kombination aus spezifischer siRNA zur Herunterregulation von PKA $\alpha$ und PKA $\beta$
siRNA	kleine eingreifende RNA (engl.: „small interfering RNA“)
Tab.	Tabelle
Tbl.	Tablette
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-Tween	Tris-gepuffertes Salzlösung mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tg	transgen
TGF- $\beta$ -1	transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$ 1 (engl.: „Transforming growth factor $\beta$ -1“)
U	Einheiten („Units“)
UK	Großbritannien (engl.: „United Kingdom“)
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (engl.: „United States of America“)
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (engl.: „weight per volume“)
WB	Western Blot-Analyse
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZG	Zellgrenze
ZO	Zelloberfläche
$\alpha$ TCAT	$\alpha$ T-Catenin, Catenin- $\alpha$ 3
$\beta$ CAT	$\beta$ -Catenin, Catenin- $\beta$ 1

## 7.2. Zusammensetzung der Lösungen und Chemikalien

Alle für Zellkultur verwendeten Substanzen wurden vor Gebrauch steril-filtriert oder bereits steril erworben. Sofern nicht anders beschrieben wurden 100-prozentige Lösungen verwendet.

Tab. 6: Verwendete Lösungen und Rezepte

Name	Rezept und Herstellung
Anilinalkohol	0,1 ml Anilinöl in 100 ml 96 % (v/v) Ethanol lösen
Anilinblau-Orange-Lösung	0,5 g Anilinblau, 2 g Orange G in 100 ml dest. Wasser lösen und 8 ml Eisessig zugeben, kurz aufkochen und nach dem Erkalten filtrieren
Aprotinin (1.000-fach)	10 g Aprotinin-Pulver in 10 ml dest. Wasser lösen; Je 1:1.000 eingesetzt
Azokarmin-Lösung	0,1 g Azokarmin G mit 100 ml dest. Wasser aufschwemmen, kurz aufkochen, filtrieren und 1 ml Eisessig zugeben
Bakterien-Lysepuffer	0,2383 g HEPES, 0,1753 g NaCl, 0,0074 g EDTA, 1 ml Glycerol, 20 µl NP-40 mit dest. Wasser auf 20 ml auffüllen und mit HCl auf pH 7,4 einstellen; Vor Benutzung frisch zugeben: 2 mg Lysozym, 3 mg DTT und PMSF (1:100), Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin (je 1:1.000).
BSA/NGS	3 g BSA-Pulver, 1 g NGS-Pulver in 100 ml PBS lösen
Dissoziationspuffer	50 mg ( $\cong$ 25 U) Dispase II in 10 ml HBSS lösen und 100 µl ( $\cong$ 0,65 U) Liberase DH auf Eis zugeben
ECL-Lösung I	500 µl Luminol-Lösung (250 mmol/l in DMSO), 220 µl PCA-Lösung, 5 ml Tris-Puffer (1 mol/l in dest. Wasser, pH 8,5) mit dest. Wasser auf 50 ml auffüllen
ECL-Lösung II	32 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 5 ml Tris-Puffer (1 mol/l in dest. Wasser, pH 8,5) mit dest. Wasser auf 50 ml auffüllen
Elektrophorese-Puffer	30 g Tris-Base, 144 g Glycin, 10 g SDS mit dest. Wasser auf 2 l auffüllen
Elutionspuffer	0,0303 g Tris-Base, 0,0157 g reduziertes Glutathion mit dest. Wasser auf 5 ml auffüllen, mit NaOH auf pH 8,0 einstellen, je 1:10 eingesetzt

Essigalkohol	1 ml Eisessig in 100 ml 96 % (v/v) Ethanol lösen
Ethanolamin-Lösung	0,976 g Ethanolamin-Hydrochlorid in 10 ml ultrapurem Wasser lösen, mit NaOH auf pH 9,6 einstellen
Fibronektin/ Gelatine-Lösung	0,1 g Gelatine (Rinderhaut) in 500 ml dest. Wasser lösen und autoklavieren. Anschließend 1 ml Fibronektin (1 mg/ml) zugeben
Formaldehydlösung (2 %)	20 g Paraformaldehyd in 1 l PBS bei 60°C lösen, mit NaOH auf pH 7,4 einstellen
HBSS	9,83 g HBSS-Pulver, 0,35 g NaHCO <sub>3</sub> in 1 l dest. Wasser lösen
Herzschnitt-Medium	19 ml DMEM mit Nährstoffmix F12 (1:1), 5 ml KnockOut Serumersatz, 250 µl MEM NEA (100-fach), 250 µl L-Glutamin-Lösung (200 mmol/l in PBS), 25 µl 2-Mercaptoethanol, 250 µl Penicillin/Streptomycin
HL-1-Medium	88 ml Claycomb-Medium, 10 ml fetales Kälberserum, 1 ml L-Glutamin-Lösung (200 mmol/l in dest. Wasser), 1 ml Penicillin/Streptomycin
HL-1-Waschmedium	93 ml Claycomb-Medium, 5 ml fetales Kälberserum, 1 ml L-Glutamin-Lösung (200 mmol/l in dest. Wasser), 1 ml Penicillin/Streptomycin
IP-Puffer	0,071 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,4383 g NaCl, 500 µl Triton-X-100, 0,125 g SDS, 0,5 g Natriumdesoxycholat mit dest. Wasser auf 50 ml auffüllen und mit HCl auf pH 7,2 einstellen
Lämmli-Puffer (1-fach)	0,757 g Tris-Base, 2 g SDS, 12,6 g Glycerol, 0,01 g Bromphenolblau in 100 ml dest. Wasser lösen und mit HCl auf pH 6,9 einstellen
Lämmli-Puffer (3-fach)	2,27 g Tris-Base, 6 g SDS, 37,8 g Glycerol, 0,03 g Bromphenolblau in 100 ml dest. Wasser lösen und mit HCl auf pH 6,9 einstellen

Langendorff-Perfusionspuffer	27,558 g NaCl, 8,359 g NaHCO <sub>3</sub> , 1,401 g KCl, 0,641 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,788 g MgSO <sub>4</sub> , 1,501 g CaCl <sub>2</sub> , 0,584 g EDTA, 0,88 g Pyruvat, 7,6 g D-Glucose und 7,5 µl Noradrenalin-Lösung mit dest. Wasser auf 4 l auffüllen; Vor Experiment steril filtrieren und mit Carbogen begaßen
Langendorff-Präparationspuffer	3,44 g NaCl, 1,0452 g NaHCO <sub>3</sub> , 0,18 g KCl, 0,08 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,10 g MgSO <sub>4</sub> , 0,18 g CaCl <sub>2</sub> und 1375 U Heparin mit dest. Wasser auf 500 ml auffüllen, vor Experiment steril filtrieren und auf Eis kühlen
LB-Agarplatten	7,5 g Agar mit 500 ml LB-Medium auffüllen, in Petrischalen (Ø 10mm) gießen und autoklavieren
LB-Medium	50 g Trypton, 25 g Hefeextrakt, 50 g NaCl, 1,5 ml NaOH-Lösung (10 mol/l in dest. Wasser) mit dest. Wasser auf 500 ml auffüllen, mit NaOH auf pH 7 einstellen und autoklavieren
Leupeptin (1.000-fach)	10 g Leupeptin-Pulver in 10 ml dest. Wasser lösen; Je 1:1.000 eingesetzt
Natriumcyanoborhydrid-Lösung	32 mg Natriumcyanoborhydrid, 50 µl NaOH-Lösung (100 mmol/l in dest. Wasser), 450 µl ultrapures Wasser, je 1:10 eingesetzt
Noradrenalin-Lösung	80 mg Noradrenalin-Pulver in 25 ml Ascorbinsäure-Lösung (30 mmol/l in dest. Wasser) lösen
NPG-Lösung	0,3 g N-Propylgallat mit 12 g Glycerol auf 50 °C erwärmen und mit PBS auf 20 g auffüllen
PBS	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,36 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 1 l dest. Wasser lösen und mit NaOH auf pH 7,4 einstellen
PCA-Lösung	0,3 g PCA-Pulver in 20 ml DMSO lösen
Penicillin/Streptomycin	6,05 g Penicillin G, 13 g Streptomycinsulfat mit PBS auf 1 l auffüllen
Pepstatin (1.000-fach)	10 g Pepstatin-Pulver in 10 ml Ethanol lösen; Je 1:1.000 eingesetzt
Phosphataseinhibitormischung (10-fach)	1 Tbl. PhosSTOP gelöst in 1 ml des entsprechenden Puffers; Je 1:10 eingesetzt

PMSF (100-fach)	5 g PMSF-Pulver 280 ml Ethanol lösen; Je 1:100 eingesetzt
Proteaseinhibitormischung (2-fach)	1 Tbl. cOmplete Protease Inhibitor Cocktail gelöst in 50 ml dest. Wasser; Je 1:1 eingesetzt
Sammelgel	1,55 ml dest. Wasser, 0,3 ml Polyacrylamidlösung (30 % [w/v] in dest. Wasser), 0,65 ml Tris-Puffer (0,5 mol/l in dest. Wasser, pH 6,8), 25 µl SDS-Lösung (10% [w/v] in dest. Wasser), 11,25 µl APS-Lösung (10% [w/v] in dest. Wasser), 5,625 µl TEMED
Schneidepuffer	4,770 g NaCl, 0,242 g KCl, 0,104 g MgHPO <sub>4</sub> , 0,079 g CaCl <sub>2</sub> , 1,820 g BDM, 0,715 g HEPES mit dest. Wasser auf 600 ml auffüllen
SDS-Lysepuffer (2-fach)	0,595 g HEPES, 0,074 g EDTA, 0,105 g NaF, 10 ml SDS-Lösung (10% [w/v] in dest. Wasser) mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen und mit HCl auf pH 7,6 einstellen; Vor dem jeweiligen Experiment mit Proteaseinhibitormischung 1:1 versetzen
TBS	2,42 g Tris-Base, 8 g NaCl in 1 l dest. Wasser lösen und mit HCl auf pH 7,6 einstellen
TBS-Tween	950 µl Tween-20 in 2 l TBS lösen
Transfer-Puffer	15,15 g Tris-Base, 73,2 g Glycin, 5 g SDS, 1 l Methanol mit dest. Wasser auf 5 l auffüllen
Trenngel (10 %)	2,025 ml dest. Wasser, 1,675 ml Polyacrylamidlösung (30 % [w/v] in dest. Wasser), 1,25 ml Tris-Puffer (1,5 mol/l in dest. Wasser, pH 8,8), 50 µl SDS-Lösung (10 % [w/v] in dest. Wasser), 22,5 µl APS-Lösung (10 % [w/v] in dest. Wasser), 11,25 µl TEMED
Trenngel (7,5 %)	2,45 ml dest. Wasser, 1,25 ml Polyacrylamidlösung (30 % [w/v] in dest. Wasser), 1,25 ml Tris-Puffer (1,5 mol/l in dest. Wasser, pH 8,8), 50 µl SDS-Lösung (10 % [w/v] in dest. Wasser), 22,5 µl APS-Lösung (10 % [w/v] in dest. Wasser), 11,25 µl TEMED

Triton-Puffer	0,98 g MES, 0,95 g EGTA, 0,102 g MgCl <sub>2</sub> , 500 µl Triton-X-100 mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen
Trypsin/EDTA	0,6 g Trypsin, 0,2 g EDTA mit PBS auf 1 l auffüllen und mit HCl auf pH 7,2 einstellen
Waschpuffer I	0,910 g Tris-Base, 1,315 g NaCl, 0,006 g EDTA, 750 µl Tween-20 mit dest. Wasser auf 150 ml auffüllen und mit HCl auf pH 7,5 einstellen
Waschpuffer II	1,817 g Tris-Base, 1,753 g NaCl, 18,030 g Harnstoff, 750 µl Tween-20 mit dest. Wasser auf 150 ml auffüllen und mit HCl auf pH 7,5 einstellen
Waschpuffer III	1 ml Triton-X-100 in 100 ml PBS lösen

Tab. 7: Kommerzielle Reaktionsansätze

Name; Funktion	Hersteller
cAMP-Enzyme-Immunoassay-Kit; Konzentrationsbestimmung cAMP	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pierce-BCA-Protein-Assay-Kit; Proteinmengenbestimmung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Silencer-siRNA-Labeling-Kit; Generierung von Cy3-siRNA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Tab. 8: Verwendete Chemikalien

Name	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Acetal-PEG-NHS	Labor AG Gruber, Biophysikalisches Institut, Linz, Österreich
Agar	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Agarose, niedrig-temperaturig schmelzend (low melt)	Carl Roth, Karlsruhe
Amxa SF-Lösung	Lonza, Basel, Schweiz
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
Anilinblau	VWR, Radnor, USA
Anilinöl	Merck, Kenilworth, USA
Aprotinin-Pulver	Carl Roth, Karlsruhe
APS	Merck, Kenilworth, USA

Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
ATP	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Azokarmin G	Alfa Aesar, Karlsruhe
BDM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
BSA-Pulver	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CaCl <sub>2</sub>	VWR, Radnor, USA
Chloroform	VWR, Radnor, USA
Claycomb-Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
DePeX	Serva, Heidelberg
D-Glukose	VWR, Radnor, USA
Dispase II	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMEM/ F12 (1:1)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe
DTT	AppliChem, Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eisessig	VWR, Radnor, USA
Ethanol	VWR, Radnor, USA
Ethanolamin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fibronektin (1 mg / ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
FuGENE HD	Promega, Madison, USA
Gelatine (Rinderhaut)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Harnstoff	Merck, Kenilworth, USA
HBSS-Pulver	AppliChem, Darmstadt
HCl	AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt	Merck, Kenilworth, USA
Heparin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
IPTG	Carl Roth, Karlsruhe
KCl	AppliChem, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Carl Roth, Karlsruhe

KnockOut Serumersatz	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kryo-Einbettmedium	Leica, Wetzlar
Laminin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Leupeptin-Pulver	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Liberase DH	Roche, Mannheim
Luminol	AppliChem, Darmstadt
Lysozym	Carl Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MEM NEA (100-fach)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MES	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Methanol	AppliChem, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub>	Carl Roth, Karlsruhe
MgHPO <sub>4</sub>	Alfa Aesar, Karlsruhe
MgSO <sub>4</sub>	Carl Roth, Karlsruhe
Mn <sub>2</sub> Cl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Molybdän-Phosphorsäurehydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Kenilworth, USA
NaCl	AppliChem, Darmstadt
NaF	Merck, Kenilworth, USA
NaHCO <sub>3</sub>	VWR, Radnor, USA
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcyanoborhydrid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumdesoxycholat	Carl Roth, Karlsruhe
NE-Puffer	New England Biolabs, Frankfurt am Main
NGS-Pulver	Jackson Immuno Research, West Grove, USA
Noradrenalin-Pulver	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NP-40	Chalbiochem, San Diego, USA
N-Propylgallat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
OptiMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Orange G	VWR, Radnor, USA
Paraffin (Papablast)	Leica, Wetzlar
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
PCA-Pulver	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin G	AppliChem, Darmstadt

Pepstatin-Pulver	Carl Roth, Karlsruhe
Phalloidin-ALEXA Fluor 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PhosSTOP	Roche, Mannheim
Phos-Tag	Wako Chemicals GmbH, Steinbach
PMSF-Pulver	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Polyacrylamidlösung (30 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PPL-Marker	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pyruvat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
reduziertes Glutathion	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
rekombinante humane PKC $\alpha$	Abcam, Cambridge, UK
rekombinante murine PKA $\alpha$	New England Biolabs, Frankfurt am Main
SDS	Carl Roth, Karlsruhe
Streptavidin-ALEXA Fluor 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Streptomycinsulfat	AppliChem, Darmstadt
Sulfo-NHS-Biotin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TEMED	Merck, Kenilworth, USA
Tetradecanoylphorbol-acetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Triethylamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris-Base	AppliChem, Darmstadt
Triton-X-100	AppliChem, Darmstadt
Trypsin	Serva, Heidelberg
Trypton	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween-20	AppliChem, Darmstadt
Ultrapures Wasser (Ampuwa)	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Xylol	VWR, Radnor, USA
Zitronensäure-Monohydrat	AppliChem, Darmstadt

Soweit nicht anders vermerkt, befindet sich der Herstellersitz in Deutschland.

### 7.3. Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tab. 9: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Deckgläschen	VWR, Radnor, USA
Dialysekäppchen, 0,5 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Glimmer, Siliziumnitrit	SPI Supplies, West Chester, USA
Handschuhe, Nitril	VWR, Radnor, USA
Membranen (0,4 $\mu$ m Porengröße) in sterilen Zellkulturplatten-Einsätzen	Millipore, Tullagreen, Irland

MLCT-Spitzenträger	Bruker, Calle Tecate, USA
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Nitrozellulosemembran	Novex, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Objektträger	VWR, Radnor, USA
Pipettenspitzen (steril, DNA-frei, RNase-frei)	Sarsted, Nümbrecht
Pipettenspitzen (Zellkultur, steril)	Hartenstein, Würzburg
Polyvinylidenfluorid-Membran	Bio-Rad, München
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Wesseling
Spritzennadeln 20G, 27G	B. Braun, Melsungen
Zellkulturgefäße	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Zentrifugationsgefäße 15 ml, 50 ml	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich

Soweit nicht anders vermerkt, befindet sich der Herstellersitz in Deutschland.

Tab. 10: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
AFM, Nanowizard III	JPK Instruments, Berlin
Binokularmikroskop, MZ75	Leica, Wetzlar
Chemilumineszenzdetektor, Fluorchem E	Biozym, Hessisch Oldendorf
CO <sub>2</sub> -Inkubator, C150 (E2)	Binder, Tuttlingen
Einbettautomat, Leica ASP 200S	Leica, Wetzlar
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Elektroporator, 4D-Nucleofector	Lonza, Basel, Schweiz
Exikator	VWR, Radnor, USA
Fluoreszenzmikroskop, DMI8	Leica, Wetzlar
Heizblock	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Konfokalmikroskop, SP5	Leica, Wetzlar
Kreisschüttler, SSM5	Stuart Scientific, Staffordshire, UK
Kryotom, HM 500 OM	Microm International GmbH, Walldorf
Kühlzentrifuge, 5430R, Rotor FA-45-24-11-Kit; Rotor F-35-6-30	Eppendorf, Wesseling
Langendorff-Apparatur, Working Heart System für Mäuse	ADInstruments, Spechbach
Mikroskop (AFM), Axio Observer D1	Carl Zeiss, Jena
Paraffinschneidemaschine	Leica, Wetzlar
Mikroskop mit Phasenkontrast, Axio Vert.A1	Carl Zeiss, Oberkochen
pH-Meter, pH 211	Hanna Instruments, Woonsocket, USA
Pipette, FINNPIPETTE, elektrisch	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Pipetten	Eppendorf, Wesseling
Rotator, Rotator-Genie	Scientific Industries, New York, USA
Sonifiziergerät, Sonifier 250	Branson, Danbury, USA
Spektrophotometer, Infinite M200 PRO	Tecan, Männedorf, Schweiz
Spritzenpumpe	B. Braun, Melsungen
Sterile Werkbank, Herasafe KS 12	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tischzentrifuge, MiniStar	VWR, Radnor, USA
Vakuumpumpe	VWR, Radnor, USA
Vibratom, Leica VT1200S	Leica, Wetzlar
Vortexer, Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waage, KB 600-2	KERN & Sohn GmbH, Balingen
Wasserbad, SUB Aqua 34 Plus	Grant Instruments, Royston, UK
Western Blot-Power supply	Bio-Rad, München
Wippschüttler, SSL4	Stuart Scientific, Staffordshire, UK
Zentrifuge (Zellkultur), Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen

Soweit nicht anders vermerkt, befindet sich der Herstellersitz in Deutschland.

#### 7.4. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Plasmide .....	19
Tab. 2: Verwendete Reagenzien für die Transfektion mit siRNA .....	21
Tab. 3: Verwendete Primärantikörper .....	41
Tab. 4: Verwendete Sekundärantikörper .....	42
Tab. 5: Verwendete Testreagenzien .....	42
Tab. 6: Verwendete Lösungen und Rezepte .....	113
Tab. 7: Kommerzielle Reaktionsansätze.....	117
Tab. 8: Verwendete Chemikalien .....	117
Tab. 9: Verbrauchsmaterialien.....	120
Tab. 10: Verwendete Geräte.....	121

#### 7.5. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Struktur der Desmosomen.....	4
Abb. 2: Aufbau des Glanzstreifens .....	9
Abb. 3: Histopathologie der arrhythmogenen Kardiomyopathie .....	11
Abb. 4: Schematische Darstellung der Analyse von Immunfluoreszenzdarstellungen in HL-1-Kardiomyozyten .....	25
Abb. 5: cAMP-Spiegelerhöhung durch Behandlung von HL-1- .....	46
Abb. 6: Zunahme der interzellulären Haftung und Reduktion der Ca <sup>2+</sup> -Abhängigkeit nach adrenerger Stimulation <i>in vitro</i> .....	47
Abb. 7: Zunahme der interzellulären Haftung nach adrenerger Stimulation <i>ex vivo</i> .....	49
Abb. 8: Versuchsaufbau der AFM-Messungen auf lebenden HL-1-Kardiomyozyten.....	50

Abb. 9: Adrenerge Signalwegsaktivierung führt zu einer Reorganisation und Erhöhung der Bindungskraft von DSG2-vermittelten Bindungsereignissen auf lebenden Kardiomyozyten .....	52
Abb. 10: DSG2-vermittelte Bindungsereignisse auf Zellen sind spezifisch .....	53
Abb. 11: Erhöhung des cAMP-Spiegels führt zu keiner Reorganisation von N-Cadherin-vermittelten Bindungsereignissen auf lebenden Kardiomyozyten .....	54
Abb. 12: Adrenerge Stimulation führt zu einer Zunahme und Verlängerung von DSG2-Immunfluoreszenzsignalen an den Zellgrenzen <i>in vitro</i> .....	55
Abb. 13: Reorganisation von in HL-1-Zellen exprimierten DSG2-GFP-Molekülen durch adrenerge Stimulation.....	56
Abb. 14: Adrenerge Stimulation führt zu einer Zunahme und Verdichtung von DSG2-Immunfluoreszenzsignalen an den Glanzstreifen in murinen Herzschnitten <i>ex vivo</i> .....	57
Abb. 15: Adrenerge Stimulation führt zu einer Zunahme von DSG2-Immunfluoreszenzsignalen an den Glanzstreifen in perfundierten murinen Herzen <i>ex vivo</i> .....	58
Abb. 16: Hemmung der Kontraktilität beeinflusst die positive Adhäsiotropie nicht .....	59
Abb. 17: Adrenerge Stimulation hat keinen Effekt auf die Expression und Zytoskelettverankerung desmosomaler Proteine.....	60
Abb. 18: Zunahme von PG- und DP-Fluoreszenzsignalen an den Zell-Zell-Junktionen parallel zu DSG2 durch adrenerge Stimulation .....	61
Abb. 19: Die Herzen von PG-KO-Mäuse zeigen die Charakteristika der arrhythmogenen Kardiomyopathie .....	63
Abb. 20: Charakterisierung der Proteinexpression in 2 und 11 Wochen alten PG-KO-Mäusen.....	64
Abb. 21: Charakterisierung der Glanzstreifenproteine in 2 und 11 Wochen alten PG-KO-Mäusen	67
Abb. 22: Die Zunahme der interzellulären Haftung nach adrenerger Stimulation ist abhängig von PG.....	68
Abb. 23: Die Zunahme von DSG2-Signalen an den Zellgrenzen nach cAMP-Spiegelerhöhung wird durch Reduktion der PG-Expression verhindert.....	69
Abb. 24: AFM-Versuchsaufbau zur Messung auf HL-1-Zellen mit Proteinreduktion durch Cy3-gekoppelte siRNA.....	70
Abb. 25: Die Reorganisation von DSG2-vermittelten Bindungsereignissen durch adrenerge Signalwegsaktivierung ist abhängig von PG.....	71
Abb. 26: Der positive inotrope und chronotrope Effekt adrenerger Stimulation ist PG-abhängig .	72
Abb. 27: Perfusion mit Iso führt zu aufgerissenen Glanzstreifen in PG-KO-Herzen .....	73
Abb. 28: Die Zunahme der interzellulären Haftung durch adrenerge Stimulation ist abhängig von PKA.....	75
Abb. 29: Die Reorganisation von DSG2 durch adrenerge Stimulation ist abhängig von PKA .....	76
Abb. 30: Adrenerge Stimulation führt zu einer PKA-abhängigen PG-Phosphorylierung .....	78
Abb. 31: Phosphorylierung von PG an S665 durch adrenerge Signalwegsaktivierung .....	79
Abb. 32: PKA phosphoryliert PG an S665 <i>in vitro</i> .....	81
Abb. 33: Zunahme der interzellulären Haftung und Reorganisation von DSG2 nach adrenerger Stimulation ist abhängig von einer PG-Phosphorylierung an S665 .....	82
Abb. 34: Reorganisation von DSG2-vermittelten Bindungsereignissen mit Zunahme der Bindungskraft nach adrenerger Stimulation ist abhängig von PG-Phosphorylierung an S665 .....	83

Abb. 35: Mechanismen der positiven Adhäsotropie..... 86

## 7.6. Eidesstattliche Versicherung

### Eidesstattliche Versicherung

SCHINNER, Camilla Barbara Josephine

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

«Die Rolle von adrenerger Stimulation für die Regulation der Zell-Zell-Haftung im Herzen – positive Adhäsiotropie als neue Funktion des Sympathikus»

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

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

Basel, 15.03.2019

---

Ort, Datum

Camilla Schinner

---

Unterschrift Doktorandin

## 7.7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jens Waschke für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit über dieses interessante Thema verfassen zu können. Ohne seine unermüdliche fachliche Betreuung, wissenschaftliche Unterstützung, konstruktive Kritik und fortwährende Motivation wäre diese Studie nicht möglich gewesen. Ich bin dankbar für das mir entgegengebrachte Vertrauen und all die verschiedenen Möglichkeiten mich wissenschaftlich weiterzuentwickeln. Lieber Jens, dir verdanke ich meine Begeisterung für das Fach Anatomie sowohl in der Forschung als auch in der Lehre – denn frei nach Sigmund Freud: «Anatomy is destiny».

Großer Dank gebührt dem ganzen Team des Lehrstuhl 1 der Anatomischen Anstalt für die anhaltende Unterstützung, Geduld und gute Atmosphäre – ob im Labor, im Präpariersaal oder auf der Isar. Hervorheben möchte ich hier Dr. Eva Arnold, Carina Dehner, Bernd Erber, Martina Hitzenbichler, Prof. Dr. Anja Horn-Bochtler, Dr. Daniela Kugelmann, Sabine Mühlsimer, Dr. Mariya Radeva, Christine Unger, Elias Walter und Dr. Angela Wölfel. Vielen Dank u.a. für die Weitergabe verschiedener Methoden, die Unterstützung bei diversen Experimenten, die fruchtbaren wissenschaftlichen Diskussionen und die Aufmunterungen, wenn nichts zu funktionieren schien. Es war eine tolle Zeit mit euch!

Mein ganz besonderer Dank gilt jedoch Angelika Antonius und Dr. Franziska Vielmuth. Liebe Angelika, ohne deine Geduld, Offenheit und stete Unterstützung bei den verschiedenen Experimenten, wäre das alles nicht machbar gewesen. Liebe Franzi, deine Freundschaft, wissenschaftliche und lehrtechnische Unterstützung und unsere kleinen Kaffee-Peer-Group-Meetings haben mir durch so manchen Tag geholfen und die Zeit in der Anatomie in München unvergesslich gemacht.

Ich danke außerdem Cathleen Plietz und dem Team des Tierstalls für die gute Betreuung der Mäuse. Axel Imhof und Andreas Schmidt bin ich dankbar für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei den Versuchen zur Massenspektrometrie.

Auch möchte ich mich herzlich bei Marlene, Volker und Woffo für das gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Ganz besonders dankbar bin ich meinen Eltern und der ganzen Familie, die immer an mich geglaubt und mich in jeder Situation bedingungslos unterstützt haben. Ihr hattet immer ein offenes Ohr für alle Probleme und habt mir beständig Mut gemacht.

Die größte Unterstützung bekam ich jedoch von meinem Mann. Du weißt, dass Worte nicht beschreiben können, wie wichtig du für den Erfolg dieser Arbeit warst. Danke für deinen Beistand und dein Vertrauen in mich.