Alma de Angelis

Der Einfluss des genetischen Hintergrundes und kammerspezifischer Genexpressionsmuster auf strukturelle und molekulare Veränderungen im Krankheitsverlauf der arrhythmogenen Kardiomyopathie

Der Einfluss des genetischen Hintergrundes und kammerspezifischer Genexpressionsmuster auf strukturelle und molekulare Veränderungen im Krankheitsverlauf der arrhythmogenen Kardiomyopathie

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Alma de Angelis

aus Padova (Italien)

Berichter: PD Dr. rer. nat. Claudia A. Krusche
PD Dr. med. Charlotte Weyland

Tag der mündlichen Prüfung: 20.04.2026

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar.

Für meine Großeltern, Eltern, Schwester

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis iv
1 Einleitung 1
1.0 Die arrhythmogene Kardiomyopathie: Definition und Begriffsentwicklung 1
1.1 Histopathologie der AC 2
1.2 Die AC ist vor Allem aber nicht nur eine Erkrankung der Desmosomen: der Aufbau des Glanzstreifens 3
1.3 Genetik der AC 6
1.4 Pathogenese der AC 9
1.5 Epidemiologie, Diagnostik und klinisches Management der AC 9
1.6 Das AC-Tiermodell 13
2 Zielsetzung 16
3 Material 17
3.0 Mausstämme 17
3.1 Geräte, Laborgebrauchsgegenstände und Verbrauchsmaterialien 17
3.2 Mikroskope 21
3.3 Chemikalien und Lösungen 22
3.4 Selbst hergestellte Puffer und Lösungen 25
3.5 Gebrauchsfertige Reagenzien und Kits 28
3.6 Antikörper 29
3.7 Sonde für die RNA in-situ Hybridisierung 31
3.8 Primer für die real-time quantitative PCR 32
3.9 Computerprogramme 32
4 Methoden 34
4.0 Tierhaltung, Autopsie und Gewinnung von Gewebeproben 34
4.1 Histologische und immunhistochemische Färbungen 35
4.1.0 Paraffineinbettung und Entparaffinierung 35
4.1.1 Kryo-Konservierung und Anfertigung von Kryoschnitten 36
4.1.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung 37
4.1.3 Azan-Färbung 38
4.1.4 von Kossa-Färbung 39
4.1.5 Immunhistochemie auf Paraffinschnitten 41
4.1.6 Immunhistochemie auf Kryoschnitte 49
4.1.7 Methode der Auswertung der histologischen/immunhistochemischen Färbungen 52

4.2 Immunfluoreszenz 53
4.3 In-situ-Hybridisierung 55
4.4 qRT-PCR 57
4.4.0 RNA-Isolierung 57
4.4.1 cDNA-Synthese 58
4.4.2 Durchführung und Auswertung der qRT-PCR 59
4.5 Statistische Auswertung 60
5 Ergebnisse 61
5.1 Makroskopie der murinen AC-Herzen 61
5.2 Mikroskopie der murinen AC-Herzen 64
5.2.0 Mikroskopischer Aufbau der Atrien- und Ventrikelwand muriner FVBN Dsg2$^{wt/wt}$ 64
5.2.1 Rarefizierung der Glanzstreifen in FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen: Desmoglein 2-Immunhistochemie 67
5.2.2 Kardiomyozytenverlust, Inflammation und Dilatation der Herzkammern der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ Mäusen: histologische Färbungen (HE, Azan) 68
5.2.3 Fibrotische Läsionen: histologische Färbungen (HE, Azan) 72
5.2.4 Kalzifizierende Läsionen: Histologie (Kossa), In-situ-Hybridisierung (Osteopontin) 75
5.3 Hypertrophie der periläsionalen Kardiomyozyten: Immunfluoreszenz (WGA-TRITC) und DAPI-Kernfärbung 78
5.4 Analyse der kardialen mRNA-Expression der 29-31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse 89
5.4.0 BNP mRNA-Expression 89
5.4.1 Galektin-3 (Lgals3) mRNA-Expression 90
5.4.2 GDF15 mRNA-Expression 91
5.5 Histologischer und immunhistochemischer Nachweis von Immunzellen in der akuten Phase der AC 92
5.5.0 Histologische Färbungen 92
5.5.1 Lokalisation von CD44-positive Immunzellen 95
5.5.2 Lokalisation von CD3-positive Immunzellen 98
5.5.3 Lokalisation von F4/80-positive Immunzellen 99
5.5.4 Lokalisation von CD 206-positive Immunzellen 101
5.5.5 Lokalisation von CD11b- und CD11c-positive Immunzellen 103
5.6 Kardiale CD68 mRNA Expression 106
5.7 Die Extrazellularmatrix 107
5.8 TGF-β*2* -mRNA Expression 110

5.9 Heterozygote FVBN Dsg2$^{wt/mt}$ Mäuse 111
6 Diskussion 112
6.1 Histomorphologischer Vergleich zwischen murinen und humanen AC-Herzen 112
6.2 Kammer-spezifische Genexpressionsmuster 113
6.3 Der Kardiomyozyten-Verlust ist der Auslöser der myokardialen Schädigung 115
6.4 Immunzellen sind der Treiber der Krankheitsentwicklung und modulieren den Schweregrad der arrhythmogenen Kardiomyopathie 117
6.5 Kardiomyozyten-Hypertrophie und Ca^{2+}-Handling 119
6.6 Kalzifizierende Läsionen und die Rolle von Osteopontin 122
6.7 Fibrotische Umbauprozesse: FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ versus B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse 124
6.8 Die „Fibrose-Inflammations-Achse“ 125
6.9 Kardiale *Remodelling* und Fibrose-Marker: GDF 15 und TGFβ-2 126
6.10 Limitationen 128
7 Zusammenfassung 129
8 Summary 129
9 Literaturverzeichnis 131
10 Abbildungsverzeichnis 158
11 Tabellenverzeichnis 163
12 Danksagung 165
13 Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung 166
14 Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung 167
15 Lebenslauf 168

Abkürzungsverzeichnis

AC *arrhythmogene Kardiomyopathie*

AJ *adherens junctions*

AK *Antikörper*

ALVC *arrhythmogene linksventrikuläre Kardiomyopathie*

AP *alkalische Phosphatase*

APD *Aktionspotentialdauer*

APS *Ammoniumperoxodisulfat*

ARVC/D *arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie/Dysplasie*

BNP *B-Typ natriuretisches Peptid*

BSA *Bovines Serumalbumin Fraction V*

CD cluster of differentiation

CDH2 *Cadherin 2*

cDNA *complementary DNA*

CL *cytoplasmatic loops*

CLEC *C-type lectin*

CMRT *kardiale Magnettomographie*

CTNNA3 *α-T-catenin*

CR *complement receptor*

Cx *Connexine*

DAB *Diaminobenzidin*

DAMP *damage-associates molecular patterns*

DAPI *4‘,6-Diamidin-2-phenylindol*

DC *dendritic cells*

DES *Desmin*

dH_2O *Aqua dest*

DNA *Desoxyribonukleinsäure*

DP/DSP *Desmoplakin*

DSC *Desmocollin-2*

DSG2 *Degmoglein-2*

$Dsg2^{mt/mt}$ *Homozygot Desmoglein 2 mutiert*

$Dsg2^{wt/mt}$ *Heterozygot Desmoglein 2 mutiert*

$Dsg2^{wt/wt}$ *Homozygot Desmoglein 2 Wildtyp*

EA *extracellular anchor domain*

EC *extracellular cadherin repeats*

EDTA *Ethylendiamintetraessigsäure*

EGF *epidermal growth factor*

EL *extracellular loops*

EM *Elektronenmikroskopie*

ESC *European Society of Cardiology*

FA *Fascia adhaerens*

FCS *fetal calf serum*

FELASA *Federation of European Laboratory Animal Science Associations*

G-CSF *Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor*

GDF15 *growth and differentiation factor 15*

gj *gap junction*

GPCR *G protein-coupled receptor*

HCl *Hydrochlorid*

HE Hämatoxylin-Eosin

HMBS Hydroxymethylbilane synthase

HRP *Horseradish peroxidase*

IA *intracellular anchor domain*

ICAM *intercellular adhesion molecule*

ICD *implantierbarer Kardioverter-Defibrillator*

ICS *intracellular cadherin segment*

IL *Interleukin*

IP-10 *inteferon γ induced protein 10*

ISH *In-situ Hybridisierung*

JUP *Junction Plakoglobin*

LAMP *Lysosom-assoziierte-Membran-Glykoprotein*

LANUV *Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz*

LD *linker domain*

LDAC *links-dominante arrhythmogene Kardiomyopathie*

Lgals3 *galektin-3*

LMNA Laminin A/C

LV *linker Ventrikel*

MAC myeloid cell adhesion molecule complex

MHC-1 *major histocompatibility complex-1*

MIP-2 *macrophage inflammatory protein-2*

MR *Mannose Rezeptor*

mRNA *messenger RNA*

mRNA *messenger RNA*

MRT *Magnetresonanztomographie*

NaCl *Natriumchlorid*

NaOH *Natronlauge*

Nf2 *Neurofibromin 2*

NK-Zellen *natürliche Killerzellen*

NT-pro BNP *N-terminales pro-B-Typ-natriuretisches Peptid*

Oligo-dT-Nukleotide *Oligo-Desoxythymidin-Nukleotide*

OPN *Osteopontin*

PBS *Phosphat-gepufferte Salzlösung*

PG *Plakoglobin*

PKP2 *Plakophilin-2*

PLN *Phospholamban*

PRR *pattern recognition receptor*

qRT-PCR *real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion*

RFA *Radiofrequenzablation*

RNA *Ribonukleinsäure*

RSB *Rechtsschenkelblock*

RUD *repeat unit domain*

RV *rechter Ventrikel*

RVD *rechtsventrikuläre Dysplasie*

SCN5A/ Nav1.5 *Sodium Voltage-gated Channel alpha Subunit 5*

SD *Standardabweichung*

SD *Standardabweichung*

SERCA Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase

SMAD *small worm phenotype/ mother against decaplentaplegic*

SPP1 *secreted Phosphoprotein 1*

T *T-Tubulus*

TCR *T-cell receptor*

TD *terminal domain*

TGF-*β transforming* growth factor *β*

TM *transmembran domain*

TMEM 43 Transmembranprotein 43

TNC *Tenascin C*

Tris *Trishydroxymethyl-aminomethan*

TRITC
Tetramethylrhodaminisothiocyanat

TTN Titin

Tween 20
Polyoxyethylenesorbitanmonolaurate

UPL *Universal Probe Library*

VES *ventrikuläre Extrasystolen*

VE-Wasser *vollentsalztes Wasser*

VT *ventrikuläre Tachykardie*

WGA *Wheat Germ Agglutinin*

1 Einleitung

1.0 Die arrhythmogene Kardiomyopathie: Definition und Begriffsentwicklung

Die arrhythmogene Kardiomyopathie (AC) ist eine Erkrankung des Herzmuskels, die histopathologisch durch den progressiven Ersatz des Myokards durch Binde- und Fettgewebe und klinisch durch das Auftreten von ventrikulären Arrhythmien und einer systolischen Dysfunktion gekennzeichnet ist (Thiene et al. 1988, Corrado et al. 2017). Eine der frühsten Beschreibung der Erkrankung, die im Rückblick als Vorläuferkonzepte gedeutet werden könnten, findet sich im Werk „De Motu Cordis et Aneurysmatibus“, das 1736 von Giovanni Maria Lancisi, dem damaligen Leibarzt des Papstes und Professor für Anatomie in Rom, veröffentlicht wurde. Der Begriff „rechtsventrikuläre Dysplasie“ (RVD) wurde erstmals 1978 im Rahmen eines Fallberichts von Frank et al. sowie in einer Fallserie von Marcus und Kollegen im Jahr 1982 verwendet. Eine klare Abgrenzung zum Morbus Uhl, einer seltenen kongenitalen Fehlbildung mit nahezu vollständigem Fehlen des rechtsventrikulären Myokards (Uhl 1952), war zum damaligen Zeitpunkt noch nicht möglich. Die im Jahr 2023 revidierte Leitlinie der European Society of Cardiology (ESC) zum Management von Kardiomyopathien definiert die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) wie folgt: „die ARVC ist definiert als das Vorliegen einer überwiegend rechtsventrikulären Dilatation und/oder einer rechtsventrikulären Funktionsstörung bei gleichzeitiger histologischer Beteiligung und/oder elektrokardiographischer Anomalien, basierend auf den publizierten und 2010 modifizierten *Task-Force*-Konsenskriterien“ (Marcus F.I. 2010, Arbelo E. 2023). Autopsie-Untersuchungen, Genotyp/Phänotyp-Korrelationsanalysen und der zunehmende Einsatz der Kontrastmittel-gestützten kardialen Magnettomographie (CMRT) haben im Verlauf der letzten Jahre wesentlich zur Identifizierung der für die ARVC charakteristischen Infiltration des Myokards mit Binde- und Fettgewebe beigetragen. Dieses Merkmal gilt heute als zentrales phänotypisches Kennzeichnen der Erkrankung. In vielen Fällen sind aber nicht nur der rechte, sondern auch der linke Ventrikel betroffen, mitunter kann die Infiltration des linken Ventrikels die des rechten übertreffen. Norman et al. 2005 beschrieben Varianten der ARVC mit überwiegender linksventrikulärer oder

biventrikulärer Manifestation (ALVC= arrhythmogene linksventrikuläre Kardiomyopathie/ LDAC= links-dominante arrhythmogene Kardiomyopathie). In früheren Arbeiten (Takemura et al. 2008, Bezrucav I. Dissertation 2020) und in der vorliegenden Dissertation wurde auch die atriale Beteiligung an der Pathogenese der ARVC untersucht. Der Begriff „arrhythmogene Kardiomyopathie“ (AC), der eine Weiterentwicklung des Terminus ARVC/D darstellt, wurde unter Berücksichtigung der neuen wissenschaftlichen Erkenntnisse eingeführt (Corrado et al. 2020) und findet in der folgenden Arbeit Anwendung.

1.1 Histopathologie der AC

Die AC ist durch einen progressiven Kardiomyozytenverlust charakterisiert, der von der epikardialen Seite ausgeht und sich transmural in Richtung Endokard ausdehnt, was zu einer progressiven Dilatation und Verdünnung der Myokardwand führt (Corrado et al. 2017). Aneurysmen, welche für die AC pathognomonisch sind, bilden sich überwiegend im Bereich des rechten Ventrikels im sogenannten „Dysplasiedreieck“ (*triangle of dysplasia*), bestehend aus rechtsventrikulärer Basis, Apex und Ausflusstrakt (Marcus F.I. et al. 1982, Basso et al. 1996). Unter Berücksichtigung der Varianten mit links- oder biventrikulärer Beteiligung, schlugen Te Riele et al. (2013) einen „displaced triangle of dysplasia“ vor, welcher die laterale Wand des linken Ventrikels anstatt des Apex einschließt. Der Kardiomyozytenuntergang löst eine Inflammationsreaktion im geschädigten Myokard aus (Pilichou et al. 2009), wobei Mastzellen, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten den Hauptteil der Immunzellen ausmachen (Campuzano et al. 2020). Die myokardiale Schädigung induziert eine Hypertrophie periläsionaler Kardiomyozyten (Gerçek et al. 2017). Diese geht mit Veränderungen des Ca^{2+}-Handling, erhöhtem oxidativen Stress, einer Dysregulation der Erregungs-Kontraktionskopplung, einer Sarkomerdysfunktion sowie mit metabolischen und energetischen Umstrukturierungen einher, welche letztlich zu einem weiteren Kardiomyozyten-Untergang und zu einer fortschreitenden Einschränkung der Herzfunktion führt (Bernardo et al. 2010). Das geschädigte Myokard wird durch Fett- und Bindegewebe ersetzt. Dabei treten zwei Formen der kardialen

Fibrosierung auf, die interstitielle Fibrose und die Ersatzfibrose (replacement fibrosis), welche irreversible Umbauprozesse des Myokards darstellen (Thiene et al. 1988, Basso et al. 2005).

Zur vertieften Erforschung der Pathogenese der arrhythmogenen Kardiomyopathien sowie zur Identifikation potenzieller therapeutischer Zielstrukturen wurden im Rahmen dieser Arbeit phänotypische Veränderungen zu Krankheitsbeginn und im Verlauf der Krankheitsentwicklung systematisch untersucht.

1.2 Die AC ist vor allem aber nicht nur eine Erkrankung der Desmosomen: der Aufbau des Glanzstreifens

Die AC ist eine genetisch heterogene Erkrankung, die vor allem durch Mutationen in desmosomalen Proteinen verursacht wird (Gerull et al. 2004, Pilichou et al. 2006, Syrris et al. 2006, Beffagna et al. 2007, Asimaki et al. 2007). Eine detaillierte Analyse des ultrastrukturellen Aufbaus des Glanzstreifens ist daher essenziell für das Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankung.

Der Glanzstreifen ist eine hochspezialisierte Struktur, die benachbarte Kardiomyozyten sowohl mechanisch als auch elektrisch miteinander verbindet und lichtmikroskopisch im längs angeschnittenen Myokardes einen stufen-/treppenförmigen Aufbau aufweist (Eberth 1866, Forbes & Sperekakis 1985). *Adherens junctions* (= *Fasciae adherentes*) und *Desmosomen* (= *Maculae adherentes*) stellen mechanische Zellverbindungen dar, die der Weiterleitung von Zugkräften und dem mechanischen Zusammenhalt der Kardiomyozyten dienen (Severs 1985, Al-Amoudi & Frangakis 2008). Im Gegensatz dazu ermöglichen gap junctions (Nexus) die elektrophysiologische Kopplung der Kardiomyozyten, indem sie diese funktionell zu einem leitfähigen „Kabel“ verbinden (Sheik et al. 2009).

Adherens junctions (AJ) sind Proteinkomplexe, die aus Transmembranproteinen aus der Cadherin-Familie (Ca^{2+}-abhängige Adhäsionsmoleküle) sowie aus Catenine der Armadillo-Protein-Familie bestehen (Meng & Takeichi 2009). N-Cadherin ist der Hauptvertreter der Cadherine im

Herzmuskel (Volk & Geiger 1984, Radice et al. 1997, Piven et al. 2011). Über die extrazellulären Domänen (EC1-EC5) interagieren N-Cadherin-Moleküle gleicher sowie benachbarter Kardiomyozyten miteinander. Die EC1-EC5 Domänen sind über das Transmembransegment in der Zellmembran verankert. Die intrazelluläre Domäne bindet an Catenine, u.a. α-, β- und p120-Catenin, an Aktinfilamente und bildet somit eine mechanische Verbindung zum Zytoskelett (Nielsen et al. 2023). Adherens junctions fungieren als mechanische Ankerpunkte, die der Übertragung von Kontraktionskräften zwischen benachbarten Kardiomyozyten dienen und unter mechanischer Belastung zur Aufrechterhaltung der Kardiomyozytenarchitektur beitragen (Bays et al. 2014). Darüber hinaus spielen AJ eine wichtige Rolle in der Signalübertragung, indem sie auf die Zelle einwirkende Zugkräfte in chemische Signale umwandeln und diese auf zellulärer Ebene weiterleiten (Wang et al. 2012).

Desmosomen, auch **Maculae adhaerentes** genannt, sind große Proteinkomplexe, die Kardiomyozyten mechanisch miteinander verbinden und eine Verankerung der Desmin-Intermediärfilamenten bewirken (Harmon & Green 2013). Zu den Hauptbestandteilen der kardialen Desmosomen zählen die desmosomalen Cadherine Desmoglein-2 (DSG2) und Desmocollin-2 (DSC2), die Armadillo-Proteine Plakophilin-2 (PKP2) und Plakoglobin (PG) sowie das Plakin Desmoplakin (DP) (Delmar & McKenna 2010). In den kardialen Desmosomen kommen ausschließlich DSG2 und DSC2 vor, sodass bei einem Desmoglein 2-Knockout keine andere Desmoglein-Isoform den Verlust des herzspezifischen DSG2 kompensieren kann (van der Zwaag et al. 2009). Die desmosomalen Cadherine bestehen aus fünf Ca^{2+}-abhängigen extrazellulären Domänen (EC1-5), einer Transmembranregion sowie einem intrazellulären Abschnitt. Letzterer umfasst u.a. eine juxtamembranäre intrazelluläre Ankerregion (IA) und eine cadherinähnliche intrazelluläre Sequenz (ICS) (Shapiro & Weis 2009). Diese zytoplasmatischen Domänen binden Plakophilin-2 (Troyanovsky et al. 1994a, Troyanovsky et al. 1994b) und Plakoglobin (Chen et al. 2002) und diese interagieren mit Desmoplakin. Über DP erfolgt die Verankerung der Desmin-Intermediärfilamente an der Zellmembran (Getsios et al. 2004, Holthöfer et al. 2007, Delva & Kowalczyk 2009, Yeruva & Waschke 2023). Die interzelluläre Adhäsion wird durch die extrazellulären Domänen (EC1-EC2) ermöglicht (North et al. 1999, Nielsen et al. 2023).

Desmosomen tragen wesentlich zur mechanischen Stabilisierung der Kardiomyozyten während der Kontraktions- und Relaxationsphasen bei. Zudem spielen sie eine Rolle in der Zelldifferenzierung, der Regulation der Genexpression und Signalübertragung (Yeruva & Wasche 2023).

Franke et al. (2006) und Borrmann et al. (2006) beschrieben erstmals spezifische Bereiche des Glanzstreifens, deren molekulare Zusammensetzung sowohl adherens junction- als auch desmosomale Proteinen umfasst. Diese Hybridkomplexe, die als Area composita bezeichnet werden, stellen funktionelle Schnittstellen zwischen beiden Zellverbindungen dar.

Gap junctions sind Proteinkomplexe, die Kardiomyozyten elektrisch miteinander koppeln und die Weiterleitung von Aktionspotentialen über den gesamten Zellverband ermöglichen (Severs et al. 2004, Severs et al. 2006, Harris 2008). Diese Zell-Zell Kontakte bestehen aus Membranproteinen, den sogenannten Connexine. Connexine verfügen jeweils über vier Transmembrandomänen (TM1-4), zwei extrazelluläre Schleifen (EL1-2), eine zytoplasmatische Schleife (CL) sowie intrazellluläre N- und C-Termini (Sohl & Willecke 2006). Im Herz von Säugetieren werden insbesondere vier Connexine exprimiert: Cx43, Cx40, Cx45, mCx30.2 (van Kempen et al. 1995, Vozzi et al. 1999). Ein Connexon besteht aus sechs Connexine. Ein Connexon bildet gemeinsam mit einem Connexon der benachbarten Zelle einen funktionellen Gap-Junction-Kanal. Diese Kanäle ermöglichen den direkten Austausch von Ionen und kleineren Molekülen zwischen Kardiomyozyten (Severs et al. 2008).

1.3 Genetik der AC

Die arrhythmogene Kardiomyopathie wird überwiegend autosomal-dominant mit variabler Penetranz vererbt, wobei auch syndromale Formen mit einem autosomal rezessiven Erbgang beschrieben sind. Zudem können mehrere desmosomale Genmutationen, entweder im selben Gen (compound heterozygosity) oder in unterschiedlichen Genen (digenic heterozygosity) vorliegen (Corrado et al. 2017). Heterozygote Mutationen in Genen, die für die desmosomalen Cadherinen Desmoglein-2 und Desmocollin-2, für die Armadillo-Proteine Plakophilin-2 und Plakoglobin sowie für Desmoplakin kodieren, sind ursächlich für die Entstehung der AC (Xu et al. 2010, Rigato et al. 2013). Das Naxos- und Carvajal-Syndrom sind autosomal-rezessiv vererbte Erkrankungen, die durch das gleichzeitige Auftreten einer palmoplantaren Keratose, Wollhaar und einer arrhythmogenen Kardiomyopathie charakterisiert sind. Dabei tritt die Kardiomyopathie bei Naxos rechts-dominant und bei Carvajal links-dominant auf (Protonotarios et al. 1986, Carvajal-Huerta 1998). Das JUP-Gen auf Chromosom 17q21, das für Plakoglobin kodiert, wurde bei der Naxos-Krankheit als ursächliche homozygote Mutation beschrieben (McKoy et al. 2000). Für das Carvajal-Syndrom wurde eine homozygote Mutation im DSP-Gen auf Chromosom 6p23-24, das für Desmoplakin kodiert, identifiziert (Norgett et al. 2000). Außerhalb der Desmosomen wurden im Rahmen einer Studie von van Hengel et al. aus dem Jahr 2013 Mutationen im CTNNA3-Gen, das für α-T-catenin kodiert, in 2 von 76 AC-Probanden beschrieben. Auch Mutationen im CDH2-Gen, das für N-Cadherin kodiert, können ein AC-Phänotyp verursachen (Mayosi et al. 2017, Turkowski et al. 2017). Darüber hinaus wurden Mutationen in Genen identifiziert, die für Komponenten der Kernmembran kodieren und phänotypische Myokardveränderungen hervorrufen, die für die AC pathognomonisch sind. Dazu zählen beispielweise Mutationen im TMEM43-Gen und im LMNA-Gen, welche für das Transmembranprotein 43 (Merner et al. 2008) und für die Lamin-Isoformen A und C (Lamin A/C) kodieren (Quarta et al. 2012). Mutationen im LMNA-Gen können ein heterogenes klinisches Erscheinungsbild verursachen, das über die isolierte AC hinausgeht. Dazu zählen z.B. die Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie, die Gliedergürtel-Muskeldystrophie Typ 1b, die familiäre Lipodystrophie bis hin zur Hutchinson-Gliford-Progerie (Young et al. 2014). Eine Studie von Lorenzon et al. 2013 zeigte, dass Mutationen im Desmin-

Gen (DES-Gen) in seltenen Fällen (2% in einer Kohorte von 91 AC-Patienten) mit einem AC-Phänotyp assoziiert sind. Eine Mutation im Phospholamban-Gen, welches für ein Peptid kodiert, das die SERCA-ATPase hemmt (Frank & Kranias 2000), wurde in europäischen Studien mit AC-Patienten relativ häufig nachgewiesen. Eine spezifische p.Arg14del-Mutation des PLN-Gens konnte in 10-15% der AC-Probanden in einer Kohortenstudie aus den Niederlanden (van Rijsingen et al. 2014) identifiziert werden. Mutationen im SCN5A-Gen, das für die α-Untereinheit des spannungs-abhängigen Natrium-Kanal $Na_v1.5$ kodiert, sind für das Brugada-Syndrom, die familiäre dilatative Kardiomyopathie, Vorhofflimmern sowie in seltenen Fällen auch für die AC ursächlich (Veerman et al. 2015, Te Riele et al. 2017). Bei Patienten mit AC sowie einer Eigen- oder Familienanamnese mit Aortenaneurysmen, Symptome des Loeys-Dietz-Syndroms (zweigipflige Uvula, Gaumenspalte, Hypertelorismus) sollten Mutationen im TGFB3-Gen in Betracht gezogen werden (Beffagna et al. 2005, Bertoli-Avella et al. 2015).

Tabelle 1.0: Genmutationen, die mit einem AC-Phänotyp assoziiert sind

Gen	Protein	Lokalisation	Chromosom
JUP	Junction Plakoglobin	Desmosom	17q21.2
DSP	Desmoplakin	Desmosom	6p24.3
PKP2	Plakophilin-2	Desmosom	12p11.21
DSG2	Desmoglein-2	Desmosom	18q12.1
DSC2	Desmocollin-2	Desmosom	18q12.1
TMEM43	Transmembranprotein 43	Kernmembran	3p25.1
LMNA	Lamin A/C	Kernmembran	1q22
DES	Desmin	Intermediärfilament	2q35
CTNNA3	α-T-catenin	Area composita	10q21.3
PLN	Phospholamban	SERCA	6q22.31
TGFB3	Transforming growth factor-3	Growth factor	14q24.3
TTN	Titin	Sarkomer	2q31.2
SCN5A	α-Unterheineit des spannungs-abhängigen Na-Kanals ($Na_V1.5$)	Na-Kanal	3p22.2
CDH2	Cadherin C	Area composita	18q12.1

1.4 Pathogenese der AC

Die Pathogenese der AC ist bislang nicht vollständig geklärt, jedoch konnten inzwischen mehrere pathophysiologisch relevante Einflussfaktoren identifiziert werden. Desmosomale Mutationen führen wahrscheinlich durch den Verlust der interzellulären Adhäsion benachbarter Kardiomyozyten zum lokalen Untergang und Absterben von Herzmuskelzellen, die durch Binde- und teils auch Fettgewebe ersetzt werden (McKoy et al. 2000). Desmosomen sind nicht nur spezialisierte Zellstrukturen, die der mechanischen Stabilisierung dienen, sondern übernehmen auch zentrale Funktionen in intra- und interzellulären Signaltransduktionsprozessen. In diesem Zusammenhang wurden sie kürzlich als „*mechanosensing signaling nodes*“ beschrieben (Pruna & Ehler 2020). Insbesondere scheinen Wnt- und Hippo-Signalwege lokal an dem Glanzstreifen reguliert zu werden (Yeruva & Wasche 2023). YAP interagiert dabei mit Plakoglobin (PG) und β-Catenin und unterliegt zusätzlich der Regulation durch α-Catenin (Chen et al. 2014, Vite et al. 2028). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Xinβ, ein Regulator des Hippo-Signalweges, am Glanzstreifen lokalisiert ist und darüber zur Rekrutierung von Nf2 (Merlin) beitragt (Guo et al. 2020).

1.5 Epidemiologie, Diagnostik und klinisches Management der AC

Die Prävalenz der AC in der Allgemeinbevölkerung wird auf etwa 1:1000 bis 1:5000 geschätzt. Männer sind dabei etwa dreimal so häufig betroffen wie Frauen (Peters et al. 2004, Corrado & Thiene 2006). Die klinische Manifestation der Erkrankung zeigt eine hohe interindividuelle Variabilität, die von asymptomatischen Verläufen, Synkopen bis zu lebensbedrohlichen ventrikulären Arrhythmien und plötzlichen Herztod durch körperliche Anstrengung reichen kann (Thiene et al. 1988, Corrado et al. 1990, Marcus et al. 2009).

Der Verlauf der AC lässt sich in vier Krankheitsphasen unterteilen (Basso et al. 2009, Pinamonti et al 2014):

1) subklinische Phase (*concealed phase*): diese Phase ähnelt klinisch einer Ionenkanalerkrankung und ist durch das Auftreten ventrikulärer Arrhythmien ohne nachweisbare strukturelle Veränderungen des Myokards gekennzeichnet.

Ein plötzlicher Herztod kann in dieser Phase die erste klinische Manifestation der Erkrankung darstellen (Tabib et al. 2003).

2) Offene elektrische Phase (overt electric disorder): diese Phase ist durch belastungsinduzierte Palpitationen, Synkopen und typischerweise symptomatische ventrikuläre Arrhythmien charakterisiert. Zusätzlich treten strukturelle Veränderungen des Herzens auf.

3) Fortgeschrittene strukturelle Phase: diese Phase ist durch ausgeprägte morphologische Veränderungen des rechten Ventrikels mit fortschreitendem Myokardverlust sowie Ersatz durch Fett- und Bindegewebe gekennzeichnet. Klinisch manifestiert sich eine rechtsventrikuläre Dysfunktion.

4) Endstadium: in dieser Phase liegt häufig eine biventrikuläre Beteiligung mit globaler Herzinsuffizienz vor. Typische Komplikationen umfassen das Auftreten von Vorhofflimmern oder thromboembolischen Ereignissen.

Die Mortalitätsrate variiert zwischen den verschiedenen Studien und reicht von 0,08% pro Jahr bei einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 8,5 Jahren (Nava et al. 2000) bis zu 3,6% pro Jahr bei einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 4,6 Jahren (Lemola et al. 2005).

Aufgrund ihres unspezifischen Charakters und der hohen Variabilität der phänotypischen Ausprägung gestaltet sich die Diagnosestellung der AC häufig als herausfordernd. Die Diagnose basiert auf den 2010 modifizierten *Task-Force*-Kriterien, die in Haupt- und Nebenkriterien unterteilt sind. Berücksichtigt werden dabei folgende diagnostische Domänen: strukturelle Anomalien und Funktionseinschränkungen des rechten Ventrikels, myokardiale Gewebeveränderungen, Repolarisations- und Depolarisationsstörungen, ventrikuläre Arrhythmien und die Familienanamnese. In der revidierten Fassung der Kriterien wird insbesondere der Nachweis einer krankheitsassoziierten Genmutation als Hauptkriterium im Bereich der Familienanamnese berücksichtigt. Die Diagnose einer AC gilt als gesichert, wenn folgende Kriterienkonstellationen erfüllt sind: Vorliegen von a) zwei Hauptkriterien, b) einem Haupt- und zwei Nebenkriterien aus unterschiedlichen Kategorien oder c) vier Nebenkriterien aus unterschiedlichen Kategorien (Marcus et al. 2010).

Tabelle 1.1: Modifizierte Task-Force-Kriterien der AC (modifiziert Marcus et al. 2010)

	HAUPTKRITERIEN	**NEBENKRITERIEN**
Strukturelle Anomalien und Funktionseinschränkung des RV	Regionale Aneurysmen, Dys-/Akinesien und rechtsventrikuläre Dysfunktion (2d Echo, Kardio-MRT)	Regionale Wandbewegungsstörungen und moderat vergrößerter RV
Myokardiale Gewebeveränderungen	< 60% residuelle Kardiomyozyten mit binde- und fettgewebigen Ersatz des RV-Myokards (RV-Angiographie, endomyokardiale Biopsie)	60-75% residuelle Kardiomyozyten mit binde- und fettgewebigen Ersatz des RV-Myokards (RV-Angiographie, endomyokardiale Biopsie)
Repolarisationsstörungen	T-Negativierung in den rechtspräkordialen Ableitungen (V1-V3) bei Patienten > 14 Jahre (ohne Rechtsschenkelblock = RSB)	T-Negativierung in V1-V2 (ohne RSB), V4-V6 oder V1-V4 (mit komplettem RSB) bei Patientein > 14 Jahre
Depolarisationsstörungen	Epsilon-Welle in den rechtspräkordialen Ableitungen (V1-V3)	Späte Potentiale im signal-averaged EKG (SAECG)
Arrhythmien	Nicht anhaltende oder anhaltende ventrikuläre Tachykardie mit Liksschenkelblock-Morphologie oder > 1000 ventrikulären Extrasystolen (VES) im Holter-EKG	> 500 VES im Holter-EKG
Familienanamnese	Nachgewiesene Krankheitsverursachende Genmutation	Familienanamnese mit plötzlichem Herztod < 35 Jahre oder AC-Diagnose bei einem Verwandten ersten Grades

Das wichtigste Therapieziel in der Behandlung der AC ist die Prävention des plötzlichen Herztodes (Pinamonti et al. 2014, Corrado et al. 2017). Körperliche Aktivität gilt als ein wesentlicher Modulator der phänotypischen Expression der AC und stellt zudem einen zentralen Auslöser potenziell lebensbedrohlicher ventrikulären Arrhythmien dar (Corrado et al. 2003, Kirchhof et al. 2006, Cruz et al. 2015). Aktuelle Leitlinien empfehlen daher, dass nicht nur manifest Erkrankte, sondern auch asymptomatische Träger einer desmosomalen Genmutation auf Leistungs- und Ausdauersport verzichten sollten (Corrado et al. 2015). Eine β-Blocker-Therapie sollte als ergänzende antiadrenerge Maßnahme bei Patienten mit arrhythmogener Kardiomyopathie erwogen werden. Diese kann das Risiko belastungsinduzierter ventrikulären Arrhythmien senken und durch Reduktion der ventrikulären Arbeitslast das Fortschreiten der Erkrankung verzögern (Sen-Chowdhry et al. 2010). Eine antiarrhythmische Therapie mit Sotalol oder Amiodaron sollte bei symptomatischen Patienten mit gehäuften ventrikulären Extrasystolen oder nicht anhaltenden ventrikulären Tachykardien in Erwägung gezogen werden. Eine pharmakologische Therapie kann zudem im Rahmen einer ICD-Implantation oder einer Katheterablation ergänzend zum Einsatz kommen (Wichter et al. 1992, Marcus et al. 2009, Corrado et al. 2015). Gemäß internationalen Leitlinien und dem Expertenkonsens (Zipes et al. 2006, Epstein et al. 2008) besteht eine Indikation zur Implantation eines implantierbaren Kardioverter-Defibrilators (ICD) bei Hochrisikopatienten mit überlebtem plötzlichem Herztod oder anhaltenden ventrikulären Arrhythmien (Empfehlungsgrad I, Evidenzstufe B). Für Patienten mit intermediärem Risiko, etwa bei ungeklärten Synkopen oder nicht anhaltenden VTs, sollte eine ICD-Implantation individuell geprüft werden (Empfehlungsgrad IIa, Evidenzstufe C). AC-Genotypen mit einem erhöhten Risiko für einen plötzlichen Herztod sollten als zusätzliche Indikation für eine prophylaktische ICD-Implantation berücksichtigt werden (Merner et al. 2008). Darüber hinaus stellt die Katheter-gestützte Radiofrequenzablation (RFA) bei ausgewählten AC-Patienten, die trotz ICD und antiarrhythmischer Medikation rezidivierende ventrikulären Tachykardien erleiden, eine therapeutische Option dar (Dalal et al. 2007, Corrado et al. 2015). Als *ultima ratio* kommt schließlich eine Herztransplantation bei Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz in Betracht, wenn ein unzureichendes Ansprechen auf medikamentösen Therapien vorliegt oder potenziell

lebensbedrohliche Arrhythmien trotz antiarrhythmischer Medikation und Katheterablation nicht suffizient kontrollierbar sind (Tedford et al. 2012).

1.6 Das AC-Tiermodell

Die Pathogenese der AC wurde in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung eines von Holthöfer, Hofe, Krusche und Kant generierten transgenen Mausmodells untersucht (Krusche, Holthöfer et al. 2011, Kant et al. 2015).

Zur Untersuchung des Beitrages der Dsg2-vermittelten Zelladhäsion zur kardialen Funktion, wurden genetisch veränderte Mäuse generiert, bei denen das Dsg2-Wildtyp-Allel durch mutierte Dsg2-Allele ersetzt wurden. Hierzu wurde ein Targeting-Konstrukt zur Erzeugung einer induzierbaren Deletion der Exone 4-6 des murinen Desmoglein2-Gens (DSG2) entwickelt. Diese Deletion unterbricht das Leseraster nicht, sondern führt zur Expression eines verkürzten Dsg2-Proteins, bei der ein funktionell relevanter Abschnitt der extrazellulären EC1 und EC2-Domänen fehlt (Krusche et al. 2011, Kant et al. 2012, Abbildung 1.1). Diese Domänen gelten als wesentlich für homo- und heterophile Interaktionen zwischen desmosomalen Cadherinen (Troyanovsky 2005, Holthöfer et al. 2007).

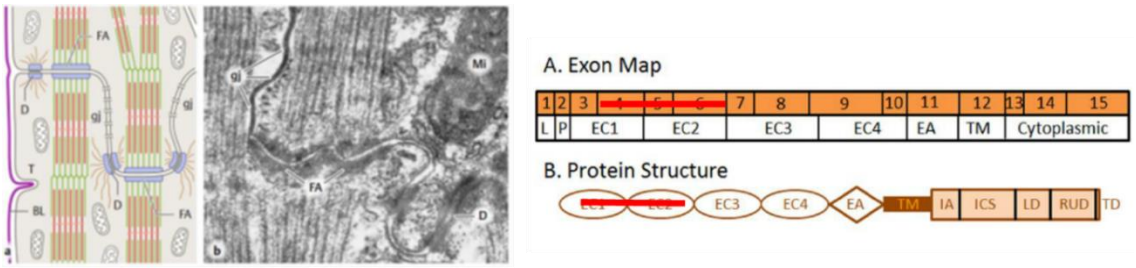


Abbildung 1.1: ***links,*** Darstellung des Glanzstreifens im Schema und im EM-Bild → **D**, Desmosom; Insertion der Desminfilamente (braun); **FA**, Fascia adhaerens: Insertion der Aktinfilamente (grün) der endständigen Sarkomere; **gj**, gap junctions; **BL** Basallamina; **T** Mündung eines T-Tubulus; EM-Bild: Mi, Mitochondrium; Vergrößerung 41000fach; *modifiziert* Lüllmann-Rauch R., Paulsen F.: Taschenlehrbuch Histologie (2012) Thieme Verlag*;* ***rechts,*** Darstellung des mutierten Dsg2-Proteins; Deletion der Exon 4-6, welche für die adhäsiven extrazellulären Domänen EC1-EC2 kodieren (roter Linie); **EA**: extracellular anchor domain, **EC**: extracellular cadherin repeats, **IA**: intracellular anchor domain, **ICS**: intracellular cadherin segment, **LD**: linker domain, **RUD**: repeat unit domain, **TD**: terminal domain, **TM**: transmembran domain

Während beim Menschen die AC autosomal dominant vererbt wird, manifestiert sich bei Mäusen der AC-Phänotyp in erster Linie bei homozygoter Mutation des Desmoglein 2-Gens (Krusche et al 2011). Heterozygote Tiere zeigen im Allgemeinen keinen auffälligen Herz-Phänotyp. Bei starken Belastungen des Herzens, wie z.B. durch exzessives Ausdauertraining, kann sich jedoch auch bei heterozygot-Dsg2 mutierten Mäusen ein AC-ähnlicher Phänotyp ausbilden (Fabritz et al. 2024).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden experimentelle Analysen mit FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- und B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen der Altersklasse 10-14 und 26-31 Wochen durchgeführt. Beide Mausmodelle basieren auf einer Mutation des endogenen Desmoglein 2-Gens (Krusche, Holthöfer et al. 2011) und rekapitulieren einen Teil der pathophysiologischen Aspekte der humanen AC-Erkrankung (Krusche et al. 2011, Kant et al. 2012, Gerçek et al. 2017, Lubos et al. 2020, Pitsch et al. 2021). Diese beiden Altersgruppen der Experimentaltiere entsprechen jeweils ~20 sowie ~30-35 Jahre alten AC-Patienten (Flurkey et al. 2007) und repräsentieren die akute Phase der Erkrankung, die bereits mit schweren Arrhythmien und plötzlichem Herztod einhergehen kann oder in welcher die chronische Krankheitsprogression zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz führen kann (Abbildung 1.2).

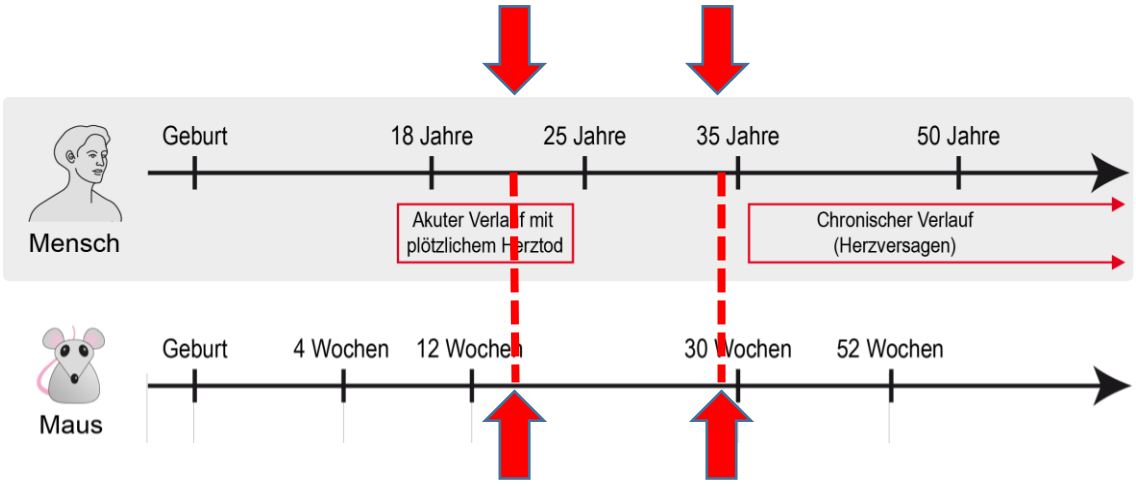


Abbildung 1.2: Darstellung der analysierten Altersklassen der FVBN Dsg2-Mäuse (rote Pfeile) und Korrelation mit dem entsprechenden Alter der AC-Patienten; modifiziert Präsentation C. Krusche

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass der genetische Hintergrund nicht nur den Phänotyp, sondern auch die Proteinexpression, Immunantwort sowie die Dauer der Aktionspotentiale maßgeblich beeinflusst. Szade et al. (2015) konnten Unterschiede in der Proteinexpression zwischen C57BL/6J-Mäusen und transgenen Mäusen, die aus der Kreuzung von C57BL/6J- mit FVB-Mäusen hervorgingen, nachweisen. So wurden beispielsweise die Serumkonzentrationen von IL-5, IL-7, LIF, MIP-2 und IP-10 bei C57BL/6J-Mäusen signifikant höher gemessen als bei C57BL/6JxFVB-Mäusen, wohingegen die Konzentration von G-CSF im Serum der C57BL/6J-Mäuse niedriger war.

Eine weitere Studie, die den Beitrag des angeborenen Immunsystems zur Herzhypertrophie, die durch ein experimentelles Adipositas-Modell induziert wurde, zeigte, dass die Genexpression von Komponenten des angeborenen Immunsystems sowie inflammatorischer Zytokine nur bei C57BL/6-Mäusen erhöht war, jedoch nicht bei FVB/N-Mäusen (Gaisler-Silva et al. 2022).

Darüber hinaus beeinflusst der genetische Hintergrund auch die Arrhythmogenese sowie die Erregungsausbreitung und -rückbildung des atrialen/ventrikulären Myokards (Obergassel et al. 2021). Ein erhöhtes Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht sowie die genetischen Hintergründe DBAC3H und FVB/N korrelierten mit einer verlängerten Aktionspotentialdauer (APD), während der C57BL/6-Hintergrund mit einer verkürzten APD assoziiert war (Waldeyer et al. 2009).

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die detaillierte Charakterisierung des kardialen Phänotyps eines genetisch veränderten Mausmodells der arrhythmogenen Kardiomyopathie (AC). Im Fokus steht eine Mutation im Desmoglein 2-Gen (DSG2), die zu strukturellen Veränderungen desmosomaler Adhäsionskontakte führt und dadurch das Myokard beinträchtigen kann.

Um die zeitliche Abfolge phänotypischer Veränderungen sowohl im Frühstadium als auch im weiteren Krankheitsverlauf der AC zu entschlüsseln und zugrundeliegende Pathomechanismen zu identifizieren, wurden zwei Altersgruppen (10-14 Wochen und 26-31 Wochen) von FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen untersucht. Als Kontrollgruppe diente eine Kohorte gesunder, gleichaltriger FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Tiere. Im Rahmen der Studie wurden insbesondere strukturelle Auffälligkeiten im Bereich der Atrien, des rechten und linken Ventrikels analysiert.

Der Fokus lag auf folgenden phänotypischen Merkmalen:

- Entzündliche Veränderungen
- Kardiomyozyten-Hypertrophie
- Kalzifizierende Läsionen
- Fibrotische Umbauprozesse

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit besteht darin, den Einfluss des genetischen Hintergrundes des verwendeten Mausmodells auf die Ausprägung der Erkrankung sowie auf den zeitlichen Verlauf der Krankheitsentwicklung zu untersuchen. Hierzu wurden die in der FVBN-Linie erhobenen Befunde mit dem bereits analysierten B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Mausmodell verglichen (Krusche et al. 2011, Kant et al. 2012, Kant et al. 2015, Gerçek et al. 2017, Lubos et al. 2020).

Mittels histologischer Analysen, immunhistochemischen Färbungen, Immunfluoreszenz-Färbungen, real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktionen (*qRT*-PCR) sowie in-situ Hybridisierungen wurde die Expression und Lokalisation von Entzündungs-Markern sowie Marker für Hypertrophie und fibrotischen Umbau analysiert, insbesondere auch in Hinblick auf die atriale Manifestation.

3 Material

In diesem Kapitel werden die verwendeten Materialien in tabellarischer Form aufgelistet.

3.0 Mausstämme

Tabelle 3.0: Untersuchte Mausstämme

Bezeichnung	Altersklasse
FVBN $Dsg2^{wt/wt}$ (Wildtyp)	10-14 Wochen 26-31 Wochen
FVBN $Dsg2^{mt/mt}$ (homozygote $Dsg2^{del\ E4\text{-}E6}$ -Träger)	10-14 Wochen 26-31 Wochen
FVBN $Dsg2^{mt/wt}$ (heterozygote $Dsg2^{del\ E4\text{-}E6}$ -Träger)	10-14 Wochen 26-31 Wochen
B6 $Dsg2^{wt/wt}$ (Wildtyp)	12-14 Wochen 26-28 Wochen
B6 $Dsg2^{mt/mt}$ (homozygote $Dsg2^{del\ E4\text{-}E6}$ -Träger)	12-14 Wochen 26-28 Wochen
B6 $Dsg2^{mt/wt}$ (heterozygote $Dsg2^{del\ E4\text{-}E6}$-Träger)	12-14 Wochen 26-28 Wochen

3.1 Geräte, Laborgebrauchsgegenstände und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.1: Laborgebrauchsgegenstände und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Anwendung
Autoklav VX-150	Systec, Wettenberg, BRD	Immunfärbungen
Clock Timer TR 118	Roth, Kalsruhe	Immunfärbungen
Dampfdrucktopf	Schott Ceram, Mainz	Immunfärbungen

Deckgläser AutomatStar 24x36 mm AutomatStar 24x60 mm Menzel-Gläser 24x60mm Stärke 1,5	 Engelbrecht Medizin- und Labortechnik, Edermünde, BRD ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, USA	Immunfärbungen
Einbettautomat 2081	Bavimed, Birkenau, BRD	Paraffinschnitte
Glasflaschen 25 ml, 1l, 2l	Schott Duran, Mainz, BRD	Puffervorbereitung
Glasküvetten, Glasschalen, Färbekasten aus Glas in verschiedenen Größen	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim, BRD	Immunfärbungen
Glasmesszylinder 25 ml, 50 ml, 100 ml	Schott Duran, Mainz, BRD	Puffervorbereitung
Heizblock Biometra TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen, BRD	qRT-PCR
Heizblock Thermoshaker TS-1000	A. Harnstein GmbH, Würzburg, BRD	Immunfärbungen, *In-situ* Hybridisierung
Histosette I Einbettungskasetten	Simport Scientific, Saint-Mathieu-de-Beloeil, Kanada	Einbettung von Gewebeproben
Hydrophobic Barrier Pen QVC0500	ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, USA	*In-situ* Hybridisierung
Inkubator für Objektträger ThermoBrite	Abbott Molecular, Abbott Par, Illinois, USA	Immunfärbungen
Kombischüttler KL2	Erdmund Bühler, Bodelshausen, BRD	Immunfärbungen, *In-situ* Hybridisierung
Kosmetiktücher Tapira Plus	GVS-Großverbraucher-spezialisten, Heidenheim, BRD	Immunfärbungen

Kreisschüttler 3005	GFL, Burgwedel, BRD	Immunfärbungen, *In-situ* Hybridiesierung
Kryotom	Techno-Med GmbH, Bielefeld, BRD	Anfertigung Kryoschnitte
Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz	Probenaufbewahrung
Kühltruhe -80°C und -20°C	ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, USA	Probenaufbewahrung
Lightcycler 96	Roche Diagnostics, Mannheim, BRD	qRT-PCR
Lightcycler 480 Sealing Foil	Roche Diagnostik, Mannheim, BRD	qRT-PCR
96-Well-Platte Lightcycler 480 Multiwell, white	Roche Diagnostics, Mannheim, BRD	qRT-PCR
Magnetrührstäbchen in verschiedeüen Größen	Brand, Wertheim, BRD	Puffervorbereitung
Magnetrührer mit Heizplatte RH basic 2	IKA-Werke, Staufen im Breisgau, BRD	Puffervorbereitung
Magnetrührer mit Heizplatte MR-3002	Heidolph, Kehlheim, BRD	Puffervorbereitung
Mikrotom HM 355S mit MX35 Premier Einweg-Mikrotomklingen mit niedrigem Profil 34° Schnittwinkel	ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, USA	Paraffin-/Kryoschnitte
Mikrowelle H-E 900E/CONV-SS	Boxford, Holland	Immunfärbungen
Objektträger Objektträger matt 76x26 mm Adhäsionsobjektträger SuperFrost Plus	 R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, BRD ThermoScientific, Waltham, USA	Immunfärbungen

Surgipath X-tra Adhesive Objektträger	Leica Microsystems, Wetzlar, BRD	
Peleusball	VWR, Darmstadt, BRD	Immunfärbungen, *In-situ* Hybridiseirung
pH-Meter 211 Microprocessor	Hanna, Kehl am Rhein, BRD	Puffervorbereitung
Pipetten ErgoOne 5 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl Glaspipetten Cellstar 5 ml, 10 ml, 25 ml	 Starlab GmbH, Hamburg, BRD Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, BRD	Pipettieren
Pipettenspitzen TipOne Graduated Filter Tips epT.I.P.S. Standard	 Starlab, Ahrensburg, BRD Eppendorf, Hamburg, BRD	 qRT-PCR Immunfärbungen
Reagenzgefäßständer in verschiedenen Größen	Brand, Wertheim, BRD	Immunfärbungen, *in-situ* Hybridisierung
Reaktionsgefäße SafeSeal Reagiergefäß 2ml Safe Lock Reagiergefäß 1,5 ml Röhre 15 ml, 50 ml PCR Tubes, Flat Cap, 0,5 ml	 Sarstedt, Nümbrecht, BRD Starlab International GmbH, Hamburg, BRD	 Immunhistochemie qRT-PCR
Roti-Liquid Barrier Marker	Carl Roth, Karlsruhe, BRD	Immunfärbungen
Spektrometer für Mikrovolumina Nano Drop 1000	ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, USA	qRT-PCR
Tissue Tek Crymold Intermediate	Sakura Finetek, USA	Anfertigung Kryoschnitte

Untersuchungs-handschuhe Peha-Soft nitrile	Hartmanngruppe Heidenheim an der Brenz, BRD	Für alle Methoden verwendet
Universal-Objektträger-Küvette	Carl Roth, Karlsruhe, BRD	Immunfärbungen
Vortexer	Heidolph REAX 2000, Schwabach, BRD	Immunfärbungen
Waagen Präzisionswaage 572 Waage CP2245S-0CE Waage U5000D	 Kern & Sohn, Balingen, BRD Sartorius, Göttingen, BRD	Puffervorbereitung
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach, BRD	Immunfärbungen
Wasserbad SW20	Julabo, Seelbach, BRD	Immunfärbungen
Zentrifugen 5417R Zentrifuge mit Kühlung PerfectSpin 24 Zentrifuge Spectrafuge Mini Centrifuge C1301 Rotanta 460R	 Eppendorf, Hamburg, BRD PEQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen Labnet Interntional, Edison, New Jersey, USA Hettich, Tuttlingen, BRD	qRT-PCR, Immunfärbungen

3.2 Mikroskope

Tabelle 3.2: Verwendete Mikroskope

Bezeichnung	Hersteller
Lichtmikroskope • Objektive - Plan-Neofluar 10x/0,30	Carl Zeiss, Jena, BRD

- Plan-Neofluar 20x/0,50 - Plan-Neofluar 40x/0,75	
Axiophot • Mikroskopkamera AxioCam ICc5 • Objektive - N-Achroplan 2,5x/0,07 - Plan-Neofluar 10x/0,30 - Plan-Neofluar 20x/0,50 - Plan-Neofluar 40x/0,75	Carl Zeiss, Jena, BRD
Axio Imager M2 B • Beleuchtungssystem Apotome.2 • Lichtquelle HXP 120C • Filtersets 38 HE, 47 HE, 50 • Mikroskopkamera AxioCam MRM • Objektive - Plan Neofluar 10x - Plan Neofluar 20x	Carl Zeiss, Jena, BRD

3.3 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 3.3: Chemikalien und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-nummer
Aceton	VWR, Darmstadt, BRD	100014
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt, BRD	101200
Anilin	Merck, Darmstadt, BRD	101261
Anilinblau	Carl Roth, Karlsruhe, BRD	4002.2
Aqua dest		
Azokarmin G	Merck, Darmstadt, BRD	1593

Bovines Serumalbumin Fraction V (BSA)	Serva, Heidelberg, BRD	11920
Chlorophorm/Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1	Carl Roth, Karlsruhe, BRD	X984.1
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt, BRD	2441000
DePeX	Serva Electrophoresis, Heidelberg, BRD	18243
Eosin G	Carl Roth, Karlsruhe, BRD	X883.2
Essigsäure 100%	Carl Roth, Karlsruhe, BRD	3738.2
Ethanol	Merck, Darmstadt, BRD	100986
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	E5134
Formaldehylösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	F-8775
Formalin 4% gepuffert pH 7,0	Merck, Darmstadt, BRD	1.04003.2500
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, BRD	3783
Glycin, ultra pure	Biomol, Hamburg, BRD	04943
Hämalaunlösung nach GILL II	Morphisto, Frankfurt am Main, BRD Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD	T865
Hoechst Kernfärbung 33342	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	H1399
Isopropanol	Merck	1096345
Kaiser's Glycerolgelatine	Merck, Darmstadt, BRD	1092420100
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, BRD	6781
Kernechtrot-Aluminiumsulfat 0,1%	Merck, Darmstadt, BRD	1.00121.0500
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt, BRD	5833
Methanol	Merck, Darmstadt, BRD	106009

Natriumchlorid (NaCl)	VWR, Darmstadt, BRD	27810
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, BRD	6340.1000
Natronlauge (NaOH) 1M	Carl Roth, Karlsruhe, BRD	6785
Orange G	Carl Roth, Karlsruhe, BRD	0318.2
Paraffin Shandon Histoplast	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	6774060
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) Dulbecco ohne Calcium und Magnesium	Biochrom	L182-01
Polyoxyethylenesorbitanmonolaurate (Tween20)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	P1379
Polyvinylalkohol 4-88 (Mowiol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	81381
Stickstoff tiefkalt, verflüssigt	Linde, Hollriegelskreuth, BRD	
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Merck, Darmstadt, BRD	P028.2
Tissue-Tek O.C.T. Compound	VWR, Darmstadt, BRD	
Trishydroxymethyl-aminomethan (Tris), ultra pure (=Tris base)	Biomol, Hamburg, BRD	08003
UltraPure Trishydroxymethyl-aminomethan (Tris) Hydrochlorid (HCl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	15506-017
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt, BRD	1072090250
Wolframatophosphorsäure -Hydrat	Merck, Darmstadt, BRD	100583
Xylol	Roth, Karlsruhe, BRD	
TRITC-gekoppeltes Weizenkeim-Agglutinin (WGA/TRITC)	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland	L5266

Hoechst	Farbwerke Hoechst, Frankfurt am Main, BRD	33342

3.4 Selbst hergestellte Puffer und Lösungen

Tabelle 3.4: Selbst hergestellten Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
0,1% Anilin-Alkohol	0,1% Anilin in 96%igem Ethanol verdünnt	Azan-Färbung
4%ige Formalinlösung zur Gewebefixierung	10,8 ml 37%ige Formaldehydlösung, ad 100 ml mit PBS	Fixierung von Gewebeproben
10%ige Formaldehydlösung	54 ml 37%ige Formaldehydlösung, ad 146 ml PBS-Waschpuffer	RNA *in-situ* Hybridisierung: Nachfixierung
5%ige Phosphorwolfram-säure	5%ige Phosphorwolframsäure in destilliertem Wasser verdünnt	Azan-Färbung
63% Ethanol mit 3% H_2O_2	180 ml 70%iger Ethanol, 20 ml 30%iges H_2O_2	Immunhistochemie: Blockierung der endogenen Peroxidasen
Anilinblau-Orange	0,5% wasserlösliches Anilinblau, 2% Orange G in dH_2O gelöst; Zugabe von 8% Eisessig (99% Essigsäure), aufkochen, abkühlen; ad doppeltes Volumen dH_2O	Azan-Färbung
Assaymix (für eine Reaktion)	2,75 µl dH_2O, 1 µl Universal Probe Library (UPL) Probes/Primermix 5 µl Mastermix	qRT-PCR

Aufsteigende Isopropanolreihe	Isopropanol mit Aqua dest verdünnt mit folgenden Zielkonzentrationen: 50%, 75%, 90%	Fixierung von Gewebeproben
Citrat Puffer 10 mMol pH 6	36 ml Citronensäure (Stammlösung A), 164 ml Trinatriumcitrat (Stammlösung B), ad 1800 dH_2O	Immunhistochemie: Epitopdemaskierung
EDTA-Puffer 1 mM pH 8	<u>Stammlösung</u> 186,12 g EDTA, einige Pellets NaOH, ad 1 l Aqua dest, wenn EDTA vollständig gelöst ist mit Natronlauge auf pH 8 titrieren <u>Gebrauchslösung</u> 2 ml Stammlösung, ad 1 l Aqua dest	Immunhistochemie: Epitopdemaskierung
Essigsaurer Alkohol	1% Eisessig (99%ige Essigsäure) in 96%igem Ethanol verdünnt	Azan-Färbung
Ethanol in verschiedenen Konzentrationen	Ethanol mit Aqua dest verdünnt mit folgenden Zielkonzentrationen (v/v): 96%, 90%, 70%, 50%, 20%	Azan-Färbung, Entparaffinierung
PBS-Waschpuffer	19,1 g PBS, ad 2 l dH_2O	Spülen
PBS mit 1,5% (w/v) BSA	0,15 g BSA, ad 10 ml PBS-	Immunhistochemie: Antikörperverdünnung
Phenol-Chlorophorm/Isoamylalkohol (Verhältnis 40:40:1)	250 µl Phenol/Chloroform (mit Isoamylalkohol) im Verhältnis 125:24:1	qRT-PCR: RNA-Isolierung

	150 µl Chloroform /Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1	
Pretreatment Solution	5 ml Pretreatment Solution, ad 495 ml dH_2O im Becherglas ansetzen	RNA in-situ Hybridisierung
Protease-Lösung	Protease QF 4 µl, ad 396 µl PBS	RNA *in-situ* Hybridisierung: Proteaseverdau
Storage Puffer	24 ml Wash Comp.2, ad 56 ml dH_2O	RNA *in-situ* Hybridisierung
Tris/Tween-Waschpuffer mit einem pH von 7,5	<u>0,5 M Tris-/Tween20 Stammlösung pH 7,5</u> 121,14 g Tris ultra pure, ad 1700 ml dH_2O, pH mit Salzsäure auf 7,5 titrieren, 9 ml Tween20 hinzufügen <u>Gebrauchslösung</u> 35 g NaCl in 1500 ml dH_2O lösen, 200 ml Stammlösung zugeben und auf 2 l mit dH_2O auffüllen	Spülen
UPL/Primermix (für 20 Reaktionen)	0,5 µl Vorwärtsprimer-Lösung (200 pmol/l), 0,5 µl Rückwärtsprimer-Lösung (200 pmol/l), 2 µl der entsprechenden UPL-Probe, 17 µl dH_2O	qRT-PCR
Waschpuffer	18 ml Wash Comp.1,5 ml Wash Comp.2, ad 1,977 l dH_2O	RNA *in-situ* Hybridisierung

3.5 Gebrauchsfertige Reagenzien und Kits

Tabelle 3.5: Gebrauchsfertige Reagenzien und Kits

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer	
Diaminobenzidin (DAB) Quanto Chromogen und Substrat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	TA-060-QHDX	Immunhistochemie
DNA-Oligonukleotide als Primer für qRT-PCR	Eurofins Scientific, Luxemburg		qRT-PCR
Fast Enzyme	ZytoMed Systems. CA, USA	ZUC 059-015	Immunhistochemie
FastStart Essential DNA Probes Master	Roche Diagnostics, Mannheim, BRD		qRT-PCR
Histofine Mousestain Kit (MAX PO Anti-Rat)	Nichirei Biosciences, Tokio, Japan	414321F	Immunhistochemie
Histofine SimpleStain MAX PO (G)	Nichirei Biosciences, Tokio, Japan	414161F	Immunhistochemie
peqGOLD DNase I Digest Kit	Peqlab, Erlangen, BRD	12-1091-01	qRT-PCR
peqGOLD Total RNA Kit	Peqlab, Erlangen, BRD	12-6834-02	qRT-PCR
Phase Lock Gel Heavy Gefäß 1,5ml	5 Prime, Hamburg, BRD	2302810	qRT-PCR

Transcriptor First Strand cDNA Synthese Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, BRD	04897030001	qRT-PCR
Universal Probe Library Probes	Roche Diagnostics, Mannheim, BRD	n. a.	qRT-PCR
ViewRNA ISH Tissue Core Kit	ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, USA	QVT0050	*In-situ* Hybridisierung
ZytoChem-Plus HRP Polymer Kit (Mouse/Rabbit)	Zytomed Systems, Berlin, BRD	POLHRP100	Immunhistochemie

3.6 Antikörper

a) Primärantikörper

Tabelle 3.6: Verwendete Primärantikörper

Antigen	Wirts-Spezies	Hersteller	Katalog-Nummer	Methode
CD 3	Kaninchen	Spring Bioscience, Pleasanton, California, USA	M3070	Immunhistochemie: Paraffinschnitte
CD11b	Ratte	eBioscience, Frankfurt am Main, BRD	14-0112	Immunhistochemie: Kryoschnitte
CD11c	Armenian Hamster	eBioscience, Frankfurt am Main, BRD	14-0114	Immunhistochemie: Kryoschnitte

CD 44	Ratte	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA	550538	Immunhistochemie: Paraffinschnitte
CD206	Ratte	BioRad, Hercules, California, USA	MCA2235T	Immunhistochemie: Kryoschnitte
Desmoglein2 (Dsg2 c-term)	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	n.a.	Immunhistochemie: Paraffinschnitte
F4/80 stimulated macrophages	Ratte	Abcam, Cambrige, GB	Ab6640	Immunhistochemie: Kryoschnitte
Tenascin C	Kaninchen	Faissner Lab., Bochum, BRD	n.a.	Immunhistochemie: Paraffinschnitte
TGF-βi	Kaninchen	Abcam, Cambrige, GB	ab169771	Immunhistochemie: Paraffinschnitte

b) Sekundärantikörper

Tabelle 3.7: Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Wirts-spezies	Hersteller	Katalog-nummer	Konjugat	Einsatz
Armenian Hamster IgG	Ziege	Jackson/ Dianova, Pennsylvania, USA	127-035-160	HRP	Immunhistochemie: Kryoschnitte

c) Normalseren

Tabelle 3.8: Verwendete Normalseren

Spezies/Antikörper	Hersteller	Katalognummer	Einsatz
Rat IgG2b	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA	559478	Immunhistochemie: Paraffinschnitte
Rabbit IgG	Santa Cruz, California, USA	Sc-2338	Immunhistochemie: Paraffinschnitte
Rat IgG 2a	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA	559579	Immunhistochemie: Kryoschnitte

3.7 Sonde für die RNA in-situ Hybridisierung

Tabelle 3.9: Sonde von Thermo Fisher Scientific, die für die RNA in-situ Hybridisierung, verwendet wurde

Ziel mRNA	Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer
Osteopontin (SPP1)	QuantiGene ViewRNA Probe Set (Type 1)	ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, USA	VB-14709-VT

3.8 Primer für die real-time quantitative PCR

Tabelle 3.10: Verwendeten Primer. Die angegebenen Effizienzen wurden mittels der im Kapitel 4.4.2 beschriebenen Methode ermittelt. F = forward, R = reverse

Ziel-cDNA	Forward-Sequenz (5'-3')	Reverse-Sequenz (5'-3')	UPL-Probe	Effizienzen
Brain natriuretic peptide (BNP)	5'-GTC AGT CGT TTG GGC TGT AAC-3'	5'-AGA CCC AGG CAG AGT CAG AA-3'	71	1,73
CD68	5'-GCT GTT CAC CTT GAC CTG CT-3'	5'-TCA CGG TTG CAA GAG AAA CA-3'	27	1,57
GDF15	5'-GAG CTA CGG GGT CGC TTC -3'	5'-GGG ACC CCA ATC TCA CCT-3'	62	1,83
Hydroxy-methyl-bilane synthase (HMBS)	5'-AAG TTC CCC CAC CTG GAA-3'	5'-GAC GAT GGC ACT GAA TTC CT-3'	42	1,89
Lgals3	5'-GCC TAC CCC AGT GCT CCT-3'	5'-GGT CAT AGG GCA CCG TCA-3'	18	1,85
TGF-β2	5'-TCT TCC GCT TGC AAA ACC-3'	5'-GTG GGA GAT GTT AAG TCT TTG GA-3'	106	1,98

3.9 Computerprogramme

Tabelle 3.11: Verwendete Computerprogramme

Name	Hersteller	Verwendung
Fiji ImageJ	Open-Source	Bildanalyse

AxioVison LE64	Carl Zeiss, Jena, BRD	Mikroskopische Aufnahmen, Bildverarbeitung
Lightcycler96 Software	Roche Diagnostics, Mannheim, BRD	Real-time qunatitative PCR
Graphpad Prism	GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA	Statistische Analysen
Zen Blue Edition	Carl Zeiss, Jena, BRD	Mikroskopische Aufnahmen, Bildverarbeitung
NanoDrop 1000 Software	ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, USA	Konzentrationsbestimmung RNA

4 Methoden

Die Gewinnung und Einbettung von Gewebeproben sowie die angewendete Methodik werden im folgenden Kapitel erläutert.

4.0 Tierhaltung, Autopsie und Gewinnung von Gewebeproben

Die beiden verwendeten Mauslinien FVBN- und B6-Mäuse wurden im Institut für Versuchstierkunde der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule (RWTH) Aachen gezüchtet. Die Versuche wurden gemäß den aktuellen Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes und der deutschen Tierschutzversuchstierverordnung sowie der EU-Vorschriften im Einklang mit den aktuellen Empfehlungen der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) und der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) durchgeführt. Die Zucht und Durchführung der Experimente wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) überprüft und genehmigt. Die Tiere wurden im S1-Laborbereich des Instituts für Molekulare und Zelluläre Anatomie (MOCA) nach der Methode der zervikalen Dislokation getötet und autopsiert. Der Thorax der Mäuse wurde eröffnet, das Herz auf makroskopisch sichtbaren Pathologien, wie Fibrose, Dilatation und Farbabweichungen untersucht und Veränderungen dokumentiert. Danach wurde das Herz entnommen, freipräpariert, gewogen und schließlich eingebettet (Paraffineinbettung oder Kryofixierung). Vor der Einbettung wurde das Gewicht der Tiere und des Herzens erfasst, um das Herzgewicht/Körpergewicht Verhältnis berechnen zu können. Für die RNA-Analysen mittels qRT-PCR wurden zunächst die Vorhöfe mit einem kleinen Teil der Herzbasis von den Ventrikeln getrennt. Danach wurden der rechte und linke Ventrikel (freie Wand und Septum interventriculare) voneinander getrennt und isoliert weiterverarbeitet. Schließlich wurden die übrigen Organe makroskopisch untersucht und eventuelle Auffälligkeiten dokumentiert.

4.1 Histologische und immunhistochemische Färbungen

4.1.0 Paraffineinbettung und Entparaffinierung

Das Myokard wurde nach der Entnahme in 4%-iges Formaldehyd in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) über Nacht unter ständiger Bewegung inkubiert. Darauffolgend wurde das Herzgewebe für eine Stunde in PBS gespült und für jeweils eine Stunde in einer aufsteigenden Isopropanol-Reihe dehydriert. Danach wurde das Gewebe in Histosette I Einbettungskasetten überführt und für eine Stunde in 100%-igem Isopropanol bei 60°C vorgewärmt. Schließlich wurden die Gewebeproben in 60°C warmen Paraffin für 2-3 Stunden inkubiert. Es erfolgte ein Wechsel in eine frische Paraffinlösung und eine über Nacht-Inkubation bei 60°C. Am Folgetag wurden die Herzpräparate in Paraffin eingebettet (Tabelle 4.0).

Tabelle 4.0: Paraffin-Einbettungsprotokoll

Lösung	**Dauer**
4% Formalin in PBS	über Nacht
PBS	1 Stunde
50% Isopropanol	1 Stunde
75% Isopropanol (Gewebestücke in die Einbettungsnetze überführen)	1 Stunde
90% Isopropanol	1 Stunde
100% Isopropanol	1 Stunde
100% Isopropanol	2 Stunden
100% Isopropanol 60°C	1 Stunde
Paraffin I 60°C	2-3 Stunden
Paraffin II 60°C	über Nacht
Einbetten	

Zwecks Festigung der Paraffinblöcke wurden diese zunächst im Kühlschrank gekühlt. Mit dem Microm Cool Cut HM 355S wurden Herzschnitte mit einer Dicke von 5 µm geschnitten. Die Gewebeschnitte wurde auf Superfrost Plus

Objektträger aufgezogen und über Nacht auf eine Präzisionsheizplatte antrocknen lassen. Vor jeder immunhistochemischen Färbung wurden die Paraffinschnitte für ca. 2 Stunde bei 60°C inkubiert. Zur Entparaffinierung (Tabelle 4.1) durchliefen die Herzschnitte Inkubationsschritte in Xylol und einer absteigenden Ethanol-Reihe, wobei die endogene Peroxidase während des Rehydratisierungsvorgang in 70%-igem Ethanol + 3% H_2O_2 blockiert wurde.

Tabelle 4.1: Protokoll Entparaffinierung der Paraffinschnitte

Lösung	**Dauer**
Xylol I	10 Minuten
Xylol II	10 Minuten
100% Ethanol	kurz spülen
100% Ethanol	kurz spülen
100% Ethanol	kurz spülen
100% Ethanol	2 Minuten
90% Ethanol	2 Minuten
70% Ethanol + 3% H_2O_2	10 Minuten
50% Ethanol	2 Minuten
20% Ethanol	2 Minuten

4.1.1 Kryo-Konservierung und Anfertigung von Kryoschnitten

Die Herzproben wurden in „Tissue-Tek Intermediate Cryomold“ mit Tissue-Tek O.C.T. Compound an der Oberfläche von flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Kryomaterial wurde schließlich bei -40°C gelagert. Herzschnitte von einer Dicke von 8-10 µm wurden wie bei der Paraffintechnik, mit dem Microm cool cut HM 355S erstellt.

4.1.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Objektträger mit den Herzschnitten wurden für 120 Minuten in einem 60°C Wärmeschrank inkubiert. Danach wurden die Herzproben in Xylol-Bädern entparaffiniert (Tabelle 4.2) und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Anschließend wurden die Präparate für 1-2 Minuten in dH_2O gewaschen und für drei Minuten in einer Hämalaun-Lösung gestellt. Nach 10-minütigem Waschen mit Leitungswasser und kurz in dH_2O, wurden die Schnitte für 10 Minuten in einer 0,5% Eosin-Lösung inkubiert. Schließlich wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Ethanolreihe rehydriert. Nach Inkubation in Xylol wurden die Schnitte mit DEPEX eingedeckelt.

Tabelle 4.2: Protokoll Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Lösung	**Dauer**
60 Wärmeschrank	1-2 Stunden
Xylol I	3 Minuten
Xylol II	3 Minuten
Xylol III	3 Minuten
100% Ethanol I	3 Minuten
100% Ethanol II	3 Minuten
90% Ethanol	3 Minuten
80% Ethanol	3 Minuten
70% Ethanol	3 Minuten
50% Ethanol	3 Minuten
dH2O	kurz
Hämalaun	3 Minuten
Leitungswasser	10 Minuten
dH2O	kurz
0,5% Eosin	10 Minuten
70% Ethanol	kurz
80% Ethanol	kurz
90% Ethanol	kurz

100% Ethanol I	3 Minuten
100% Ethanol II	3 Minuten
Xylol I	3 Minuten
Xylol II	3 Minuten
Eindeckeln mit DEPEX	

4.1.3 Azan-Färbung

Die Herzschnitte wurden mit Xylol entparaffiniert und für jeweils 3 Minuten in 100%-igem und 96%-igem Ethanol rehydriert (Tabelle 4.3). Danach erfolgte eine Nachfixierung in 0,1% Anilin-Alkohol. Anschließend wurden die Objektträger für 1-2 Minuten in 96%-iges Ethanol gestellt und für ca. 2 Minuten in dH_2O gewaschen. Die Präparate wurden mit Azokarmin im 60°C Wasserbad für 30 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem kurzem Waschen in dH_2O wurden die Herzschnitte in 0,1% Anilin-Alkohol inkubiert. Die Färbereaktion wurde dann durch essigsauren Alkohol gestoppt. Anschließend erfolgte eine erneute Nachbehandlung für ca. 10 Minuten in 5%-iger Phosphorwolframsäure und in dH_2O. Darauffolgend wurden die Schnitte in einer Anilinblau-Orange Lösung inkubiert. Diese Färbung wurde mittels drei Waschvorgänge in dH_2O und Dehydratisierung in 96%-igem sowie 100%-igem Alkohol differenziert. Schließlich wurden die Schnitte in Xylol inkubiert und mit DEPEX eingedeckelt.

Tabelle 4.3: Protokoll Azan-Färbung

Lösung	Dauer
Xylol I	3 Minuten
Xylol II	3 Minuten
Xylol III	3 Minuten
100% Alkohol	3 Minuten
96% Alkohol	3 Minuten
0,1% Anilin-Alkohol	3 Minuten
96% Alkohol	kurz
dH2O	2 Minuten
Azokarmin 60 °C im Wasserbad	30 Minuten
dH2O	kurz
dH2O	kurz
dH2O	kurz
0,1% Anilin-Alkohol	3-4 Minuten oder Sichtkontrolle
Essigsaurer Alkohol	1 Minute
5% Phosphorwolframsäure	10 Minuten
dH2O	kurz
Anilinblau-Orange Lösung	1 Minute
dH2O	kurz
dH2O	kurz
dH2O	kurz
96% Alkohol	1 Minute
100% Alkohol	2 Minuten
Xylol I	3 Minuten
Xylol II	3 Minuten
Eindeckeln mit DEPEX	

4.1.4 von Kossa-Färbung

Die Objektträger mit den Herzschnitten wurden zwei Mal für 10 Minuten in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanol-Reihe rehydriert (Tabelle 4.4).

Nach 5 Minuten waschen in dH_2O wurden die Präparate für 30 Minuten in einer 5%-igen Silbernitratlösung inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte drei Mal in dH_2O gespült und für zwei Minuten in einer Natriumkarbonatlösung inkubiert. Nach erneutem Spülen mit dH_2O wurden das Herzgewebe für 5 bis 10 Minuten in Kernechtrot gefärbt. Schließlich wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe entwässert, in Xylol inkubiert und mit DEPEX eingedeckelt.

Tabelle 4.4: Protokoll Kossa-Färbung

Lösung	**Dauer**
Xylol I	10 Minuten
Xylol II	10 Minuten
100% Ethanol	Kurz spülen
100% Ethanol	Kurz spülen
100% Ethanol	5 Minuten
100% Ethanol	5 Minuten
90% Ethanol	5 Minuten
70% Ethanol	5 Minuten
50% Ethanol	5 Minuten
dH2O	5 Minuten
Silbernitratlösung 5%-ig	30 Minuten
dH2O	3 Mal sehr gründlich spülen
Natriumkarbonatlösung	2 Minuten
dH2O	Gut wässern
Kernechtrot	5-10 Minuten
dH2O	1 Minute
70% Ethanol	kurz
80% Ethanol	kurz
90% Ethanol	kurz
100% Ethanol	3 Minuten
100% Ethanol	3 Minuten
Xylol I	3 Minuten
Xylol II	3 Minuten

Eindeckeln mit DEPEX	

4.1.5 Immunhistochemie auf Paraffinschnitten

Die Immunhistochemie ist eine Technik, die dem Nachweis und der Lokalisierung von Struktur-Proteine, Peptide und Enzyme dient. Um ein spezifisches Protein im Gewebeschnitt nachzuweisen, wird ein spezifischer Antikörper gegen das gesuchte Protein/Antigen eingesetzt. Der spezifisch gebundene Primär-Antikörper wird in einem zweiten Reaktionsschritt mit einem Zweitantikörper markiert, der mit einem Enzym (Peroxidase) gekoppelt ist. Anschließen werden die Schnitte mit einer Lösung, die ein gelöstes Peroxidase-Substrat und H_2O_2 enthält, inkubiert. Beides wird von der Peroxidase in einem unlöslichen Farbniederschlag umgesetzt, sodass die Lokalisation des Antigen-Antikörper-Komplexes sichtbar gemacht wird. Final werden die Gewebeschnitte zur Darstellung der Zellkerne mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Desmoglein 2-Immunhistochemie

Nach der Entparaffinierung wurden die Herzschnitte für 5 Minuten in PBS rehydriert. Zur Freilegung des Antigenepitops wurden die Herzschnitte in einer 10 mM Citrat-Puffer (pH 6) inkubiert und in einem Dampfdrucktopf bei maximalem Druck für 3 Minuten gekocht. Anschließend wurden die Schnitte in PBS gewaschen und zur Verhinderung unspezifischer Bindungen mit einem Blocking Reagenz für 30 Minuten unter Raumtemperatur inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden über die Nacht bei 4°C mit einem Dsg2-Antikörper (1:6000 Verdünnung in PBS + 1,5% BSA) inkubiert. Anschließend wurden die Herzschnitte zwei Mal für jeweils 5 Minuten gewaschen. Nach Waschen mit Tris/HCl-Wasch-Puffer (pH 7,5) wurden die Präparate mit einem Streptavidin-Peroxidase-Komplex für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, zweimal mit Waschpuffer und einmal mit dH_2O gespült. Schließlich wurden die Herzschnitte mit einem Detektionskit (DAB) unter Sichtkontrolle inkubiert. Nachdem die Farbentwicklung durch Spülen mit Leitungswasser beendet wurde, erfolgten die Gegenfärbung mit Hämatoxylin und das Eindeckeln mit Glycerolgelatine (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5: Protokoll Desmoglein 2 (rb88) -Immunreaktion

Reaktionsschritt	Puffer	Dauer/Temperatur
Rehydrierung	PBS	5 Minuten
Antigen retrieval	10 mM Citrat-Puffer pH 6	Dampfdrucktopf 3 Minuten bei maximalem Druck, und abkühlen lassen
Waschen	PBS	5 Minuten
Blocking	Reagen A+ (Zytomed R1)	30 Minuten bei Raumtemperatur
1. Antikörper	Desmoglein 2 (rb88) 1:6000 PBS + 1,5% BSA	Über Nacht bei 4°C
Kontrollen	Rabbit IgG (Santa Cruz) 1:6000 PBS + 1,5% BSA	Über Nacht bei 4°C
Waschen	Tris/HCl-Waschpuffer pH 7,5	2 x 5 Minuten
Streptavidin-Peroxidase Komplex	Reagent C+ (zytomed R3)	30 Minuten bei Raumtemperatur
Waschvorgang	Tris/HCl-Waschpuffer pH 7,5	2 x 5 Minuten
Waschvorgang	dH_2O	1 x 5 Minuten
Detektion	DAB	Unter Sichtkontrolle
Waschen	Leitungswasser	5 Minuten
Gegenfärbung	Hämatoxylin von Morphisto	60-90 Sekunden
Bläuen	Leitungswasser	10 Minuten
Eindeckeln	Glycerol-Gelatine	

CD44-Immunhistochemie

Nach erfolgter Entparaffinierung wurden die Objektträger mit den Herzschnitten für 5 Minuten in einer PBS-Lösung rehydriert und zur Hitzevorbehandlung in einem Citrat-Puffer (pH 6) für 40 Minuten auf 94°C in einem Wasserbad inkubiert. Darauffolgend wurden die Schnitte in dem Citrat-Puffer für 20 Minuten bei

Raumtemperatur abkühlen lassen und zwei Mal für jeweils 10 Minuten in einer PBS-Lösung rehydriert. Die Herzschnitte wurden mit einem CD44-Antikörper (rat-antibody, clone IgG2b, rt9) in einer PBS-Lösung (1:50 Verdünnung) für eine Stunde unter Raumluft inkubiert und anschließend drei Mal jeweils für fünf Minuten in PBS gewaschen. Darauffolgend wurde ein Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper (Histofine MAX PO rat) hinzugegeben (30 Minuten). Nach zweimaligem fünfminutigem Waschen in PBS und einmaligem zweiminutigem Abwaschen unter Leitungswasser wurden die Schnitte mit einem Detektionskit (DAB) inkubiert. Schließlich wurde das Herzgewebe mit Hämatoxylin gegengefärbt und mit Glycerolgelatine eingedeckelt (Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: Protokoll CD44-Immunreaktion

Reaktionsschritt	**Puffer**	**Dauer/Temperatur**
Rehydrierung	PBS	5 Minuten
Hitzevorbehandlung	Citrat-Puffer pH 6	Wasserbad 94°C, 40 Minuten
Abkühlen	Citrat-Puffer	20 Minuten bei Raumtemperatur
Waschen	PBS	2 x 10 Minuten
1. Antikörper	CD 44 1:50 in PBS (c = 62,5 ug/ml)	1 h bei Raumtemperatur
Waschvorgang	PBS	3 x 5 Minuten
Peroxydase-gekoppelter 2. Antikörper	Histofine MAX PO rat	30 Minuten bei Raumtemperatur
Waschen	PBS	2 x 5 Minuten
Waschen	dH_2O	1 x 2 Minuten
Detektion	DAB	unter Sichtkontrolle
Waschen	Leitungswasser	5 Minuten
Gegenfärbung	Hämatoxylin von (Morphisto)	60-90 Sekunden
Bläuen	Leitungswasser	10 Minuten

Eindeckeln	Glycerol-Gelatine	
Kontrollen	a) ohne AK b) Rat Non Immun IgG2b 1:400 in PBS	

CD3-Immunhistochemie

Die Gewebeschnitte wurden entparaffiniert und für fünf Minuten in einem Tris/HCl-Waschpuffer rehydriert. Zur Freilegung des Antigenepitops wurden die Herzpräparate in einem 10 mM Citrat/Puffer (pH 6) für 45 Minuten in einem Kochtopf vorbehandelt und für 15 Minuten in dem Citratpuffer abkühlen lassen. Als nächstes wurden die Herzschnitte für fünf Minuten in einem Tris/HCl-Puffer für 5 Minuten gewaschen und zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen für 5 Minuten mit Blocking reagent (aus dem ZytoChem-Plus HRP-Polymer kit) inkubiert. Danach folgte ein Waschschritt mit Tris/HCl-Waschpuffer für fünf Minuten. Der CD3-Antikörper (rb 161) wurde in einer 1:200 Verdünnung in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur dazugegeben. Darauffolgend wurden die Schnitte zwei Mal jeweils für fünf Minuten gewaschen. Anschließend wurden die Herzschnitte mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (HRP-Polymer) inkubiert und erneut zwei Mal für jeweils fünf Minuten in einer Tris/HCl-Waschpuffer-Lösung und für fünf Minuten in dH_2O gestellt. Schließlich wurde ein Detektionskit (DAB) unter Sichtkontrolle dazugegeben und die Reaktion unter Leitungswasser und dH_2O gestoppt. Die Herzschnitte wurden mit Hämatoxylin (Morphisto) gegengefärbt und mit Glycerolgelatine eingedeckelt (Tabelle 4.7).

Tabelle 4.7: Protokoll CD3-Immunreaktion

Reaktionsschritt	**Puffer**	**Dauer/Temperatur**
Rehydrierung	Tris/HCl Waschpuffer (pH 7,5)	5 Minuten
Hitzevorbehandlung	10 mM Citrat-Puffer (pH 6)	Kochen mit offenem Topf, 45 Minuten

Abkühlen	10 mM Citrat-Puffer (pH 6)	15 Minuten bei Raumtemperatur
Waschvorgang	Tris/HCl Waschpuffer (pH 7,5)	5 Minuten
Blocking	Blocking Solution (Reagent 1)	5 Minuten
Waschvorgang	Tris/HCl Waschpuffer (pH 7,5)	5 Minuten
1. Antikörper	CD3 1:200 in PBS	1 h bei Raumtemperatur
Waschvorgang	Tris/HCl Waschpuffer (pH 7,5)	2 x 5 Minuten
Peroxydase-gekoppelter 2. Antikörper	HRP-Polymer (Reagent 3)	30 Minuten bei Raumtemperatur
Waschvorgang	Tris/HCl Waschpuffer (pH 7,5)	2 x 5 Minuten
Waschvorgang	dH_2O	1 x 5 Minuten
Detektion	DAB	Unter Sichtkontrolle
Reaktionsstop	Leitungswasser	5 Minuten
Gegenfärbung	Hämatoxylin von Morphisto	60-90 Sekunden
Bläuen	Leitungswasser	10 Minuten
Eindeckeln	Glycerol-Gelatine	
Kontrollen	ohne AK	

Tenascin C-Immunhistochemie

Nach der Entparaffinierung wurden die Herzschnitte in einer PBS-Lösung für 5 Minuten rehydriert und zur Hitzevorbehandlung zwecks Freilegung des Antingenepitops für 30 Minuten mit einer 10 mM Citrat-Puffer (pH 6) Lösung inkubiert und bei 94℃ in einem Wasserbad gekocht. Danach wurden die Herzschnitte in der 10 mM Citrat-Lösung (pH 6) abkühlen lassen und für fünf Minuten in PBS gewaschen. Das Blocking Reagenz (ZytoChem-Plus HRP-

Polymer) wurde für fünf Minuten hinzugefügt, danach erfolgte ein kurzes Spülen mit PBS. Die Objektträger mit den Herzschnitten wurden mit dem Tenascin C-Antikörper (rb 226) in einer 1:2000 Verdünnung in 10% FCS (*fetal calf serum*) in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss zwei Mal für jeweils fünf Minuten in einer PBS-Lösung gewaschen. Ein Polymer, der mit den Zweitantikörpern und der Peroxidase gekoppelt ist (HRP-Polymer), wurde für 30 Minuten aufgetragen. Danach wurden die Objektträger mit PBS und dH_2O gewaschen. Anschließend wurden die Herzschnitte mit dem DAB-Detektionskit inkubiert und die Farbreaktion unter Sichtkontrolle entwickelt. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Objektträger mit Leitungswasser gespült. Danach wurden die Herzschnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt und mit Glycerolgelatine eingedeckelt (Tabelle 4.8).

Tabelle 4.8: Protokoll TNC-Immunreaktion

Reaktionsschritt	**Puffer**	**Dauer/Temperatur**
Rehydrierung	PBS	5 Minuten
Hitzevorbehandlung	10 mM Citrat-Puffer (pH 6)	94 °C Wasserbad, 30 Minuten
Abkühlen	10 mM Citrat-Puffer (pH 6)	20 Minuten bei Raumtemperatur
Waschen	PBS	5 Minuten
Blocking	Blocking Solution (Reagent 1)	5 Minuten
Waschen	PBS	5 Minuten
1. Antikörper	TNC 1:2000 in 10% FCS in PBS	1 h bei Raumtemperatur
Waschen	PBS	2 x 5 Minuten
Peroxidase-gekoppelter 2. Antikörper	HRP-Polymer (Reagent 3)	30 Minuten bei Raumtemperatur
Waschen	PBS	2 x 5 Minuten
Waschen	dH_2O	1 x 5 Minuten
Detektion	DAB	Unter Sichtkontrolle

Reaktionsstop	Leitungswasser	5 Minuten
Gegenfärbung	Hämatoxylin von Morphisto	60-90 Sekunden
Bläuen	Leitungswasser	10 Minuten
Eindeckeln	Glycerol-Gelatine	
Kontrolle	ohne 1. AK	

TGF-βi-Immunhistochemie

Nach Entparaffinierung der Atrien der Herzschnitte, wurden diese in einer PBS-Lösung für 5 Minuten gewaschen. Zur Hitzevorbehandlung wurden die Herzschnitte in einer 10 mM Tris/HCl (pH 9 Lösung) in 94°C in einem Wasserbad für 30 Minuten inkubiert und anschließen für 20 Minuten abkühlen lassen. Nach 5-minutigen Abwaschen in einer Tris/HCl-Pufferlösung, wurde eine blocking solution (ZytoChem-Plus HRP-Polymer) für 5 Minuten aufgetragen. Danach wurden die Objektträger für 5 Minuten in einer Tris/HCl-Pufferlösung gewässert. Anschließen wurden die Atrien mit einem TGFβi-Antikörper (rb 189) in einer 1:1000 und 1:2000 Verdünnung in PBS 1,5% BSA über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach zwei Mal fünfminutiger Rehydrierung in einem Tris/HCl-Puffer, wurden die Herzschnitte mit einem Peroxydase-gekoppelten Zweitantikörper (HRP-Polymer) für 30 Minuten inkubiert. Darauffolgend wurden die Objektträger zwei Mal für 5 Minuten in Tris/HCl-Puffer (pH 9) und einmal für 5 Minuten in dH_2O rehydriert. Die Herzschnitte wurden unter Sichtkontrolle mit einem DAB-Detektionskit unter Sichtkontrolle inkubiert und unter Leitungswasser abgewaschen. Schließlich wurden die Schnitte mit Hämatoxylin von Morphisto gegengefärbt und mittels Glycerolgelatine eingedeckelt (Tabelle 4.9).

Tabelle 4.9: Protokoll TGF-βi-Immunreaktion

Reaktionsschritt	**Puffer**	**Dauer/Temperatur**
Rehydrierung	PBS	5 Minuten
Hitzevorbehandlung	10 mM Tris/HCl pH 9	94℃ Wasserbad, 30 Minuten
Abkühlen	10 mM Tris/HCl pH 9	20 Minuten bei Raumtemperatur
Waschvorgang	Tris/HCl-Pufferlösung	5 Minuten
Blocking	Blocking Solution (Reagent 1)	5 Minuten
Waschvorgang	Tris/HCl-Pufferlösung	5 Minuten
1. Antikörper	TGF-βi (rb 189) 1:1000 in PBS 1,5% BSA TGF-βi (rb 189) 1:2000 in PBS 1,5% BSA	Über Nacht 4°C
Waschvorgang	Tris/HCl-Pufferlösung	2 x 5 Minuten
Peroxydase-gekoppelter 2. Antikörper	HRP-Polymer (Reagent 3)	30 Minuten bei Raumtemperatur
Waschvorgang	Tris/HCl-Pufferlösung	2 x 5 Minuten
Waschvorgang	dH_2O	1 x 5 Minuten
Detektion	DAB	Unter Sichtkontrolle
Reaktionsstop	Leitungswasser	5 Minuten
Gegenfärbung	Hämatoxylin von Morphisto	60-90 Sekunden
Bläuen	Leitungswasser	10 Minuten
Eindeckeln	Glycerol-Gelatine	
Kontrollen	ohne AK	

4.1.6 Immunhistochemie auf Kryoschnitte

Ratten-Antikörper F4/80, CD206, CD11b

Die bei -20°C gelagerten 10 µm dicken Mausherz-Kryostatschnitte wurden zunächst für 20 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und getrocknet und danach bei -20°C in Aceton für 10 Minuten fixiert. Nach fünfminütiger Rehydratisierung in PBS wurde die endogene Peroxidase mit 0,3%igem H_2O_2 in PBS für 10 Minuten im Dunkeln geblockt. Nach einem fünfminutigen Waschschritt wurden die Schnitte mit dem jeweiligen Primärantikörper (F4/80, CD 206 und CD11b) inkubiert. Nach dem Abwaschen von überschüssigem Primärantikörper wurde der Zweitantikörper und Peroxidase-gekoppelten Detektions-Polymer (Histofine MAX PO rat) für 30 Minuten auf das Hergewebe aufgetragen. Nach zwei weiteren Waschvorgänge in PBS (2 x 5 Minuten) und dH_2O (2 x 2 Minuten) erfolgte die Detektion mittels DAB Quanto Kit unter Sichtkontrolle. Die Reaktion wurde durch Abwaschen in Leitungswasser und dH_2O gestopt. Schließlich wurden die Herzschnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt und mit Glycerolgelatine eingedeckelt (Tabelle 4.10). Für die Verdünnung des jeweiligen Primärantikörpers verweisen wir auf Tabelle 4.11.

Tabelle 4.10: Protokoll F4/80-, CD206-, CD11b-Immunreaktion

Reaktionschritt	**Puffer**	**Dauer/Temperatur**
Schneiden	8-10 µm dicke Kryostatschnitte	
Antrocknen		30 Minuten
Lagerung - 20 °C		
Auftauen		20 Minuten bei Raumtemperatur
Fixierung	Aceton (-20 °C)	10 Minuten
Waschvorgang	PBS	5 Minuten
Peroxidase-Block	0,3% H_2O_2 in PBS →1:100 Verdünnung: 198 ml PBS + 2 ml H_2O_2	10 Minuten im Dunkeln

Spülen	PBS	2 x 5 Minuten
1. Antikörper	F4/80, CD 206, CD 11b	1h bei Raumtemperatur
Waschvorgang	PBS	3 x 5 Minuten
2. Antikörper	Histofine MAX PO rat	30 Minuten
Waschvorgang	PBS	2 x 5 Minuten
Waschvorgang	dH_2O	2 x 2 Minuten
Detektion	DAB	4,5 Minuten
Reaktionsstop	Leitungswasser	5 Minuten
Waschvorgang	dH_2O	
Gegenfärbung	Hämatoxylin (Roth)	60-90 Sekunden
Bläuen	Leitungswasser	10 Minuten
Eindeckeln	Glycerol-Gelatine	

Tabelle 4.11: Verdünnung der Primärantikörper und Kontrollen

Primärantikörper	**Kontrolle**
F4/80 1:100 in PBS	Ohne AK
Anti CD 206 1:800 in PBS	Rat IgG2a isotype control 1:800 in PBS
Anti CD11b 1:200 in PBS + 1,5% BSA	Ohne AK

CD11c (Armenian hamster IgG) Immunhistochemie

Die bei -20°C gelagerten 10 µm dicken Mausherz-Kryostatschnitte wurden zunächst für 20 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und getrocknet und danach bei -20°C in Aceton für 10 Minuten fixiert. Nach fünfminütiger Rehydratisierung in PBS wurde die endogene Peroxidase mit 0,3%igem H_2O_2 in PBS für 10 Minuten im Dunkeln geblockt. Die Herzschnitte wurden zwei Mal für jeweils 5 Minuten in PBS gewaschen und darauffolgend für eine Stunde unter Raumtemperatur mit einem CD11c-Antikörper (armenian hamster IgG) in einer 1:100 Verdünnung in PBS + 1,5% BSA inkubiert. Nach dreimaliger Rehydratisierung in PBS für jeweils 5 Minuten wurde ein Zweitantikörper (goat anti-armenian amster-HRP-gekoppelt) in einer 1:200 Verdünnung in PBS aufgetragen. Nach Rehydratisierungsmaßnahmen wurden die Herzschnitte mit

Hämatoxylin von Morphisto gegengefärbt und mit Glycerolgelatine eingedeckelt (Tabelle 4.12).

Tabelle 4.12: Protokoll CD11c-Immunreaktion

Reaktionsschritt	**Puffer**	**Dauer/Temperatur**
Schneiden	8-10 µm dicke Kryostatschnitte	
Antrocknen		30 Minuten
Lagerung bei -20°C		
Auftauen		20 Minuten bei Raumtemperatur
Fixierung	Aceton (-20°C)	10 Minuten
Waschvorgang	PBS	5 Minuten
Peroxidase-Block	0,3% H_2O_2 in PBS → 1:100 verdünnen: 198 ml PBS + 2ml H_2O_2	10 Minuten im Dunkeln
Waschvorgang	PBS	2 x 5 Minuten
1. Antikörper	Anti CD11c 1:100 in PBS + 1,5% BSA	1h bei Raumtemperatur
Waschvorgang	PBS	3 x 5 Minuten
2. Antikörper	Goat anti Armenian Hamster -HRP-gekoppelt (Ha Z) 1:200 in PBS	45 Minuten
Waschvorgang	PBS	2 x 5 Minuten
Waschvorgang	dH_2O	2 x 2 Minuten
Detektion	DAB	10 Minuten
Reaktionsstop	Leitungswasser	5 Minuten
Waschvorgang	dH_2O	
Gegenfärbung	Hämatoxylin (Roth)	90 Sekunden
Bläuen	Leitungswasser	10 Minuten
Eindeckeln	Glycerol-Gelatine	
Kontrollen	ohne AK	

4.1.7 Methode der Auswertung der histologischen/immunhistochemischen Färbungen

Um die Wirksamkeit der Reaktionen zu überprüfen, wurden Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt. Als Positivkontrollen wurden Paraffin- und Kryoschnitte von Multiorganblöcken mit dem jeweiligen Antikörper gefärbt. Um falsch-positive Ergebnisse durch unspezifische Bindung von Primärantikörper oder das Detektionspolymer zu erkennen, wurde bei jeder Reaktion ein Gewebeschnitt mit dem jeweiligen Puffer (z.B. PBS-Lösung) oder mit dem jeweils zur Spezies des Primärantikörpers passendem non-immune Isoantikörper inkubiert. Die histologischen und immunhistochemischen Färbungen wurden mit dem Axiophot-Mikroskop von Zeiss (10x, 20x sowie 40x Objektiv) aufgenommen und mit dem Image-J Fiji Programm bearbeitet. Die Auswertung erfolgte rein deskriptiv.

4.2 Immunfluoreszenz

Zur Darstellung der Zellmembran und des Zellkerns der Kardiomyozyten wurden die Herzmuskelzellen mit TRITC (Tetramethylrhodaminisothiocyanat)-gekoppeltem WGA (Wheat Germ Agglutinin) gefärbt. Ziel dieser Versuche war es, den Durchmesser der Herzmuskelzellen zu bestimmen, um Rückschlüsse über Remodelling Prozesse im Sinne von einer kompensatorischen Hypertrophie als Reaktion auf das mutationsbedingte Absterben von Kardiomyozyten der benachbarten Zellen zu ziehen. Nach Entparaffinierung wurden die Herzschnitte zwecks Freilegung der Antigenepitope in Citrat-Puffer (10 mM, pH 6) bei 94°C für 30 Minuten hitzevorbehandelt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte in der Citrat-Puffer Lösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt und im Anschluss in Tris/HCl-Waschpuffer (pH 7,5) für 5 Minuten rehydriert. Darauffolgend wurden die Proben mit TRITC-gekoppeltem WGA (100 µg/ml PBS) für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und im Anschluss drei Mal für jeweils 5 Minuten in Tris/HCl-Waschpuffer pH 7,5 und einmal für 5 Minuten in dH_2O gewaschen. Schließlich wurden die Zellkerne der Kardiomyozyten mit DAPI (2 µg/ml) für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln gegengefärbt. Nach wiederholten Waschschritten in PBS und dH_2O wurden die Herzschnitte mit Glycerolgelatine eingedeckelt (Tabelle 4.13).

Tabelle 4.13: Protokoll WGA/TRITC

Reaktionsschritt	**Puffer**	**Dauer/Temperatur**
Rehydrierung	Tris/Hcl-Waschpuffer (pH 7,5)	5 Minuten
Hitzevorbehandlung	Citrat-Puffer pH 6	Wasserbad 94°C für 30 Minuten
Abkühlen	Citrat-Puffer	20 Minuten bei Raumtemperatur
Waschen	Tris/HCL-Waschpuffer pH 7,5	5 Minuten

TRITC gekoppeltes WGA	100 µg/ml PBS	30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln
Waschen	Tris/HCl-Waschpuffer pH 7,5	3x 5 Minuten
Waschen	dH_2O	1x 5 Minuten
Gegenfärbung	DAPI (2 µg/ml)	30 Minuten bei Raum-temperatur im Dunkeln
Waschen	PBS	2x 5 Minuten
Waschen	dH_2O	1 x 5 Minuten
Eindeckeln	Evanol	

WGA-TRITC markierte Kardiomyozyten wurden mit dem ApoTome.2 Mikroskop von Zeiss (20x und 40x Objektiv) unter Verwendung der Axiovision Software Version 4.83 (Zeiss) aufgenommen. Es wurden drei bis sechs Ausschnitte jeweils vom rechten und linken Ventrikel sowie der Atrien aller untersuchten Tiere fotographiert. Der Durchmesser der Kardiomyozyten wurde mit dem Programm Image-J Fiji berechnet. Die Messung erfolgte, indem eine gerade Linie durch den Zellkern und den kürzesten Abstand der Zellmembran der Kardiomyozyten gezogen wurde. Die Analyse wurde ohne Kenntnis des Genotyps durchgeführt und durch eine zweite verblindete Person überprüft.

4.3 In-situ-Hybridisierung

Unter *in-situ* Hybridisierung versteht man den Nachweis von Nukleinsäuresequenzen in Schnitt- und Zellpräparaten (G. Höfler 1987, Hemmati-Brivanlou et al. 1990, Ustyantsev et al. 2025). Die mRNA-Expression von Osteopontin (SPP1) wurde durch Verwendung des invitrogen *ViewRNA ISH Tissue Core Kit* untersucht.

Die Objektträger wurden bei 60°C für 60 Minuten im Thermobrite gebacken und durch Waschen unter kräftigem Schütteln drei Mal für jeweils 5 Minuten in Xylol und zwei Mal für jeweils 5 Minuten in 100%-igem Ethanol entparaffiniert. Darauffolgend wurden die Objektträger für 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Herzschnitte drei Mal mit dem *Hydrophobic Barrier Pen* umkreist und nach jeder Umrandung trocknen lassen, beim dritten Mal für ca. 20-30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte eine Inkubation in 200 ml Pretreatment Solution für 10 Minuten bei 90-95°C und danach ein zweimaliger Waschvorgang unter kräftigem Schütteln für jeweils eine Minute in dH_2O und in PBS. Nach Abschlagen der PBS-Lösung, wurden die Gewebeschnitte mit der Protease-Lösung (Verdünnung 1:100) bedeckt und für 30 Minuten bei 40°C auf den Thermobrite inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für jeweils eine Minute in PBS unter sanfter Auf- und Abbewegung des Objekträgerhalters im Puffer, wurden die Herzschnitte mit einer 10%-igen Fomalin-Lösung für 5 Minuten nachfixiert und jeweils zwei Mal für 1 Minute in PBS unter kräftiger Auf- und Abbewegung des Objektträgerhalters im Puffer abgewaschen. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit der Sonde (Verdünnung 1:40) für 2 Stunden bei geschlossenem Deckel auf dem Thermobrite bei 40°C. Die Objektträger wurden drei Mal für jeweils zwei Minuten in einem Waschpuffer unter kräftiger Auf- und Abbewegung gestellt. Schließlich wurden die Gewebeschnitte über Nacht in dem Storage Puffer im Dunkeln inkubiert.

Nach einem dreimaligen Waschvorgang in Waschpuffer für jeweils 2 Minuten unter kräftiger Auf- und Abbewegung des Objektträgerhalters im Puffer, wurden die Herzschnitte jeweils mit 400 µl PreAmplifier Mix QT Lösung bedeckt und für 25 Minuten bei 40°C im Thermobrite inkubiert (Vorverstärkung). Danach wurde

die PreAmplifier Mix QT Lösung (Fertiglösung) abgeschlagen und die Herzschnitte erneut drei Mal für jeweils zwei Minuten im Waschpuffer unter permanenter Bewegung gewaschen. Darauffolgend wurden die Herzschnitte mit 400 µl Amplifier Mix QT Lösung bedeckt und für 15 Minuten bei 40°C im Thermobrite inkubiert (Verstärkung). Nach weiterem dreimaligem Waschen für jeweils zwei Minuten unter kräftiger Auf- und Abbewegung des Objektträgerhalters im Puffer, wurden die Herzschnitte mit der Label-Probe-1 AP-Hybridisierungslösung (Verdünnung 1:1000) für 15 Minuten bei 40°C im Thermobrite inkubiert. Schließlich wurde ein erneuter Waschvorgang durchgeführt, drei Mal für drei Minuten in Waschpuffer unter permanenter Bewegung und darauffolgend eine Inkubation mit der AP-Enhancer Lösung (Fertiglösung) für 5 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt.

Anschließend erfolgte die Farbdetektion: die Herzschnitte wurden mit dem Fast Red Substrat (5 ml Fast Red Reaction Buffer + je 80 µl der Substratlösung 1, 2 und 3) für 30 Minuten bei 40°C inkubiert und danach für eine Minute in PBS gewaschen. Das Herzgewebe wurde mit Hämatoxylin, der Zellkern mit DAPI (3 µg Höchst/ml) gegengefärbt. Schließlich wurden die Objektträger mit Gycerolgelatine eingedeckelt und die Färbungen sowohl mit dem Lichtmikroskop als auch mit dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

4.4 qRT-PCR

Die qRT-PCR (quantitative Polymerasekettenreaktion) ist eine Methode zur Quantifizierung der mRNA-Expression, nachdem diese zuvor durch eine Reverse Transkription in eine cDNA umgeschrieben worden ist (Nolan et al. 2006). Frisch entnommenes Herzgewebe wurde in einem 1,5 ml Eppendorf Gefäß mit RNase-inhibierendem und RNA-stabilisierendem Puffer (*RNA Lysis Buffer T aus peqGOLD MicroSpin Total RNA Kit*) überführt und homogenisiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis und bis zur weiteren Aufbereitung bei - 80°C gelagert. Zur Aufreinigung der RNA wurden 400 µl des Herzhomogenates mit 250 µl Phenol-Chloroform und 150 µl Chloroform-Isoamylalkohol in einem 1,5 ml Phaselock Eppendorf Gefäß vermischt und für ca. 90 Sekunden bei 1500xg zentrifugiert.

4.4.0 RNA-Isolierung

Die sich in der wässerigen Phase befindende RNA wurde nach den Angaben des Herstellers peqGOLD MicroSpin Total RNA-Kit weiter aufgereinigt. Die Proben wurden mit 295 µl Wasser sowie 5 µl Proteinase K gemischt und für 10 Minuten bei 55°C inkubiert. Der Ansatz wurde unter Raumtemperatur bei 10000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine DNA Removing Column in einem Collection Tube pipettiert und bei Raumtemperatur für eine Minute bei 10000xg zentrifugiert. Die DNA Removing Column wurde danach verworfen und das Eluat in ein 1,5 ml Eppendorf/Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Eluat mit 200 µl 70%-igem Ethanol gemischt, auf eine PerfectBind RNA Säule überführt und für eine Minute bei Raumtemperatur mit 10000xg zentrifugiert. Darauffolgend wurde die PerfectBind RNA Säule erneut auf einem 2,0 ml Collection Tube gesetzt und mit 500 µl RNA Wash Puffer I inkubiert. Die Säule wurde erneut für eine Minute bei 10000xg zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde verworfen.

Im Anschluss wurden 75 µl DNase Reaktionsmix (73,5 µl DNAse I Digestion Buffer + 1,5 µl DNAse I) auf die Silicamembran der PerfectBind RNA Säule gegeben, für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Säule auf einem neuem Tube gesetzt. Darauffolgend wurden 400 µl RNA Wash Puffers I hinzugegeben, die Säule wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und

für 5 Minuten bei 10000xg zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde wieder verworfen. Schließlich erfolgten zwei weitere Waschschritte: die Säule wurde mit 500 µl RNA Wash Puffer II inkubiert und für 1 Minuten bei 10000xg zentrifugiert. Nach Wiederholung des Waschvorganges, wurde die PerfectBind RNA Säule im selben Tube bei 10000xg für zwei Minuten zentrifugiert. Als letzter Schritt wurde die Säule in ein neues RNAse-freies 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt, mit 20 µl RNAse-freiem H_2O inkubiert und für 1 Minute bei 6000xg bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Eluat enthält die aufgereinigte RNA. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde ein Spektrometer für Mikrovolumina (Nanodrop 1000) verwendet.

4.4.1 cDNA-Synthese

Die Synthese komplementärer DNA erfolgte mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion. Die cDNA wurde mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit für RT-PCR aus der RNA hergestellt. Als Primer wurden die im genannten Kit enthaltenen Oligo-Desoxythymidin-Nukleotide (Oligo-dT-Nukleotide) verwendet. 1 µg gesamt RNA wurde mit den Oligo dT-Nukleotiden inkubiert, die erhaltene Mischung für 10 Minuten bei 65°C denaturiert und anschließen auf Eis überführt.

Wir setzten gleichzeitig den Master-Mix wie unten angegeben an:

Tabelle 4.14: Master Mix

Reagenz	**1x Ansatz**
5x reaction buffer (vial 2)	4 µl
RNase Inhibitor (vial 3)	0,5 µl
Deoxynucleotid Mix (vial 4)	2 µl
Reverse Transcriptase (vial 1)	0,5 µl

Zu jedem RNA-Oligo-dt-Primer-Gemisch wurden 7 µl Master-Mix hinzugegeben, für 60 Minuten bei 50°C und anschließen für 5 Minuten bei 85°C inkubiert (Reverse-Transkriptase-Reaktion). Schließlich wurden die Proben auf Eis abgekühlt.

4.4.2 Durchführung und Auswertung der qRT-PCR

Die qRT-PCR ermöglicht eine Quantifizierung der amplifizierten DNA-Stränge anhand von Fluoreszenzsignalen. Für die Analysen wurde eine TaqMan-Sonde aus der Universal Probe Library (UPL) mit dem LightCycler Taq Man Master Kit eingesetzt. Vor Durchführung der qRT-PCRs erfolgte eine Effizienztestung der HMBS-, LGALS-, GDF15-, TGF-β2-, CD68-, BNP-PCR-Reaktionen. Dafür wurde die cDNA von den Proben in einem cDNA-Pool unverdünnt, in einer Verdünnungsreihe 1:3, 1:9, 1:27, 1:81 mit dem für jedes Primerpaar erstellten Reaktionsmix amplifiziert. Die Effizienzwerte wurden mithilfe des Lightcycler 96-Software berechnet und ergeben sich aus den resultierenden Regressionsgraden.

Tabelle 4.15: Effizienzen

Ziel cDNA	**Effizienzen**
BNP	1,73
CD 68	1,57
GDF 15	1,83
HMBS	1,89
LGALS 3	1,85
TGF-β2	1,98

Für die Quantifizierung der mRNA wurde ein Reaktionsmix angesetzt, bestehend aus einem Forward- und Reverse-Primer sowie den entsprechenden Fluorescein-markierten UPL-Sonden (spezifische Universal Probe Library).

Zunächst erfolgte eine Denaturierung der cDNA-Stränge für 10 Sekunden bei 95°C. Der Forward- und Reverse-Primer lagerten sich an die zu amplifizierenden DNA-Stränge an, die UPL-Probe (TaqMan-Sonde) setzte sich zwischen die Primer. Es folgten 45 Amplifikationszyklen (30 Sekunden bei 60°C). Dabei wurde durch die Polymerase-Aktivität die UPL-Probe abgespalten. Nach jedem Amplifikationszyklus wurde die durch Abbau der UPL-Probe freigesetzte Fluoreszenz gemessen und durch das Lightcycler 96 System dokumentiert. Die Menge des Fluoreszenzsignals ist proportional zur Menge der amplifizierten cDNA. Als Referenz wurde das Housekeeping Gen Hydroxymethylbilane

Synthase (HMBS) verwendet. Dabei handelt es sich, wie in Vorexperimente nachgewiesen, um ein unreguliertes Gen, welches stets in gleicher Expressionsstärke vorliegt. Als Negativkontrolle wurde anstelle der entsprechenden cDNA, Wasser oder RNA verwendet. Die Auswertung der Lightcycler 96-Läufe erfolgte mittels der LightCycler®96 SoftwareVersion 1.1.0.1320© 2011 Roche Diagnostics International Ltd. Die Effizienz der jeweiligen Primer wurde in Relation zur Effizienz des Housekeeping Gens (HMBS) gesetzt. Insbesondere wurde mithilfe der Lightcycler 96 Software der Quotient zwischen Expression des untersuchten Gens und des HMBS unter Berücksichtigung der zuvor erfassten Primereffizienzen berechnet und die Ergebnisse in „fold-change“ statistisch ausgewertet.

4.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der durchgeführten Versuche sowie die Erstellung der Graphen erfolgten mit der Software *GraphPad Prism*. Zur Überprüfung der Normalverteilung innerhalb der Untersuchungsgruppen wurden der D’Agostino & Pearson-Omnibus Normalitätstest angewendet. Da die Daten keine Normalverteilung aufwiesen, wurde für den Vergleich zweier unabhängiger Gruppen der Mann-Whitney-Test eingesetzt. Vergleiche wurden durchgeführt zwischen a) den Atrien der FVBN $Dsg2^{mt/mt}$- versus FVBN $Dsg2^{wt/wt}$-Mäuse, b) den rechten Ventrikeln der FVBN $Dsg2^{mt/mt}$- versus FVBN $Dsg2^{wt/wt}$- Mäuse sowie c) den linken Ventrikeln der FVBN $Dsg2^{mt/mt}$- versus FVBN $Dsg2^{wt/wt}$-Mäuse in den jeweiligen Altersgruppen. In einer weiteren Analyse wurden die Atrien, der rechte Ventrikel und der linke Ventrikel der B6 $Dsg2^{mt/mt}$- mit denen der B6 $Dsg2^{wt/wt}$- Mäuse verglichen. Ergebnisse mit einem p-Wert $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant eingestuft. Die Darstellung der p-Werte in den Abbildungen erfolgte wie folgt: $p < 0,05$ = *, $p < 0,01$ = **.

5 Ergebnisse

5.1 Makroskopie der murinen AC-Herzen

Ein makroskopischer Herz-Phänotyp der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse konnte bereits in der Altersgruppe 10-14 Wochen beobachtet werden. FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Herzen zeigten eine Dilatation v.a. des linken Atriums und des rechten Ventrikels sowie weißliche Verfärbung im Bereich der Herzoberfläche und des Septums, als Folge des Kardiomyozytenverlustes (Abbildungen 5.0 und 5.1). Eine lokale Fibrosierung des Herzmuskels konnte insbesondere in der Altersklasse der 26-31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse beobachtet werden. Dabei variierte der Fibrosierungsgrad von einzelnen fibrotischen Spots und 5%-iger Fibrose im Bereich des Truncus pulmonalis bis zu einer Fläche von 25% fibrosiertem Myokard im Bereich der rechtsventrikulären Wand. Um objektivierbare Aussagen über das variable Erscheinungsbild der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Herzen treffen zu können, wurde ein Makro-Score bestehend aus den Parametern *Dilatation, Farbveränderung der Kammerwände* und *Fibrose der Kammerwände*, ermittelt. Die unterschiedliche Ausprägung dieser makroskopischen Veränderungen wurde anhand von einer Punkteskala abgeschätzt (Tabelle 5.0). Für jede Herzkammer wurde ein Score berechnet und zu einem Gesamt-Makro-Score aufaddiert (Bsp: FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus 737 **rechtes Atrium**: Dilatation = 0, Farbveränderung = 0, Fibrose = 0; **linkes Atrium**: Dilatation = 3, Farbveränderung = 2, Fibrose = 0, **rechter Ventrikel**: Dilatation = 2, Farbveränderung = 2, Fibrose = 1; **linker Ventrikel**: Dilatation = 0, Farbveränderung = 0, Fibrose = 0 → **Gesamt-Makro-Score: 10**). FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Mäuse (n = 15) und Dsg2$^{wt/mt}$-Mäuse (n = 8) zeigten keine makroskopischen Auffälligkeiten (Score = 0). Bei den 10-14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen überwogen phänotypische Veränderungen im Sinne einer Dilatation der Herzwand und Abblassung der Herzoberfläche als Folge des Absterbens von Kardiomyozyten. Der Score variierte zwischen 3 und 11 (Mittelwert 8,2 ± SD 3,11). Dabei zeigten alle Mäuse (n = 5) eine mittelstarke bis extrem starke Dilatation des linken Atriums und eine leichte bis starke Dilatation des rechten Ventrikels mit fokaler oder kompletter Farbveränderung der rechtsventrikulären Wand. Bei zwei von fünf Herzen bestand eine biatriale Beteiligung. In zwei von fünf FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Herzen konnte eine im Bereich des

Truncus pulmonalis beginnende Fibrosierung (2-5% Fibrose) beobachtet werden. In der Altersklasse der 26-31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse (n = 16) überwogen Remodelling-Prozesse im Sinne eines fibrotischen Umbaus mit teilweise oder vollständigen Ersatz des atrialen/ventrikulären Myokards durch Bindegewebe. Der Score variierte zwischen 1 und 19 (Mittelwert 7,8 ± 5,06). Bei drei von sechszehn FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen waren nur minimale morphologische Veränderungen zu detektieren (eins davon weitestgehend unauffällig), während wiederum drei von sechszehn Herzen eine ausgeprägte Dilatation aller vier Kammern (biatriale und biventrikuläre Beteiligung) zeigten. Bei acht von sechszehn FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen konnte ein fibrotischer Umbau des Myokards, der von einzelnen Fibrose-Spots bis zu einer großflächigen Durchsetzung des Myokards durch Bindegewebe, beobachtet werden. In zwei Fällen war das atriale Myokard vollständig fibrosiert. Zusammenfassend wiesen FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Herzen bereits auf makroskopischer Ebene eine sehr heterogene phänotypische Ausprägung auf. Der variable Herzphänotyp reichte von einer leichten Dilatation und Farbveränderung des rechten Ventrikels bis zu einer biventrikulären und biatrialen Beteiligung mit unterschiedlichem Fibrosierungsgrad. Auf mikroskopischer Ebene zeigten Tiere mit einem makroskopischen Phänotyp, Läsionen, die in den nachfolgenden Kapiteln näher erläutert werden.

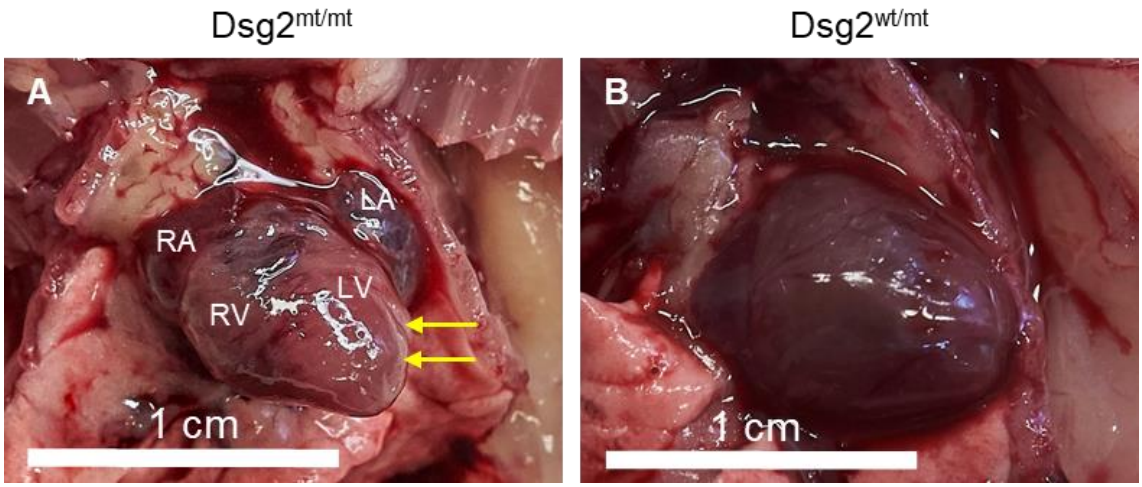


Abbildung 5.0: Makroskopische Darstellung der Herzen einer FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (A) und einer FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus (B). **A**: Dilatation des linken Atriums (LA) und weißliche Verfärbung als Folge des Kardiomyozytenverlustes (gelbe Pfeile); B: Herz einer gesunden wildtypischen Kontrollmaus; RA: rechtes Atrium; RV: rechter Ventrikel, LA: linkes Atrium; LV: linker Ventrikel; Maßstab 1 cm.

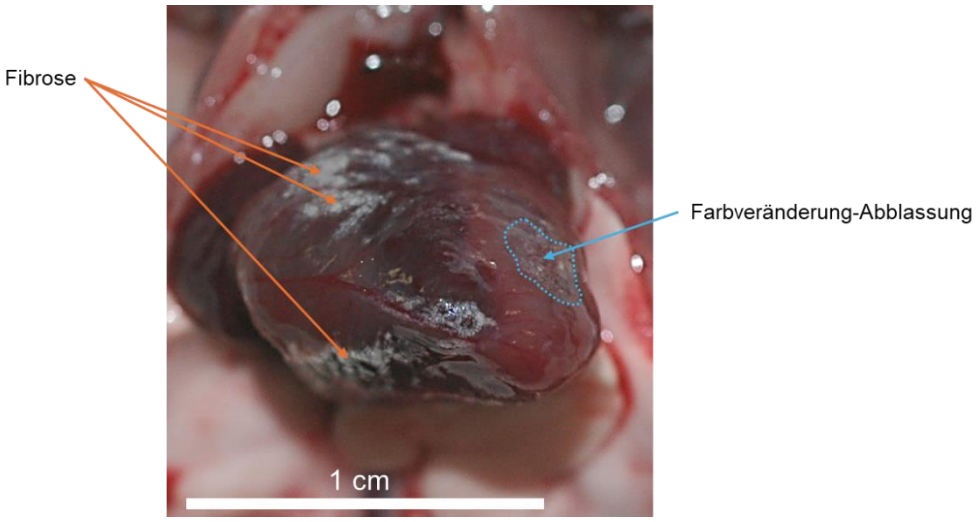


Abbildung 5.1: Makroskopische Darstellung des Herzens einer FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus: Fibrosierung der Ventrikelwand und Farbveränderung/Abblassung als Folge des Kardiomyozytenverlustes; Maßstab 1 cm

Tabelle 5.0: Makro-Score Kriterien (Dilatation, Farbveränderung und Fibrose)

	0 Punkte	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte	4 Punkte	5 Punkte
Dilatation	keine	Leicht	mittel	stark	extrem stark	
Farbveränderung	keine	Stellen	ganzes Atrium/ ganzer Ventrikel			
Fibrose	keine	1-5%	6-10%	11-20%	21-30%	> 30 %

5.2 Mikroskopie der murinen AC-Herzen

5.2.0 Mikroskopischer Aufbau der Atrien- und Ventrikelwände von FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Kontrollmäusen

Um den kardialen Phänotyp der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse zu charakterisieren und Rückschlüsse über histologische Veränderungen ziehen zu können, untersuchten wir das Herzgewebe von Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse und wildtypischen Kontrolltieren der Altersklasse 10-14 und 26-31 Wochen. Das Myokard bildet die stärkste Wandschicht des Herzens und besteht aus quergestreiften Herzmuskelzellen mit einem oder zwei zentral gelegenen und ovalen Zellkernen. Zartes Bindegewebe gliedert das Myokard in Bündel von Muskelzellen und beherbergt reichlich Blutkapillaren. Mikroskopisch betrachtet verlaufen die Kardiomyozyten in unterschiedlichen Schnittrichtungen, die auf einer komplizierten räumlichen Anordnung der Muskelzellbündel in steilen und weniger steilen Schraubentouren zurückzuführen ist. Die Atrien der FVBN-Mäuse unterscheiden sich morphologisch von der Ventrikelwand durch eine a.e. in Septen organisierte Struktur, die dem trabekulierten Verlauf der Mm. pectinati geschuldet ist. Die Wand des rechten Ventrikels ist schmaler als die des linken Ventrikels, zu dem auch das kräftige Septum interventriculare gerechnet wird. In Abbildung 5.2 ist das in Septen organisierte Myokard eines Atriums einer 27 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus dargestellt. Vereinzelt sind durch Endothel ausgekleidete Kapillaren mit Erythrozyten im Gefäßlumen angeschnitten. Das Myokard des rechten (A, B) und linken (C, D) Ventrikels eines 27 Wochen alten Kontrolltiers ist in 5.3 abgebildet: die Kardiomyozyten sind sowohl längs als auch quer angeschnitten und durch Kollagenfasern in Bündeln organisiert. Die Zellkerne sind rund, plump und zentral gelegen (Abbildung 5.4).

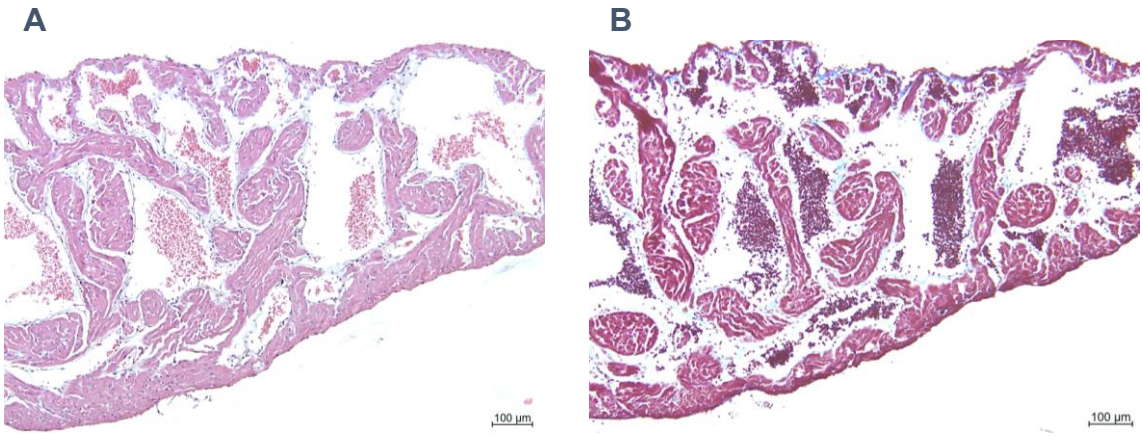


Abbildung 5.2: Mikroskopische Darstellung des Atriums einer 27 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus (**A**: HE-Färbung, **B**: Azan-Färbung). Das atriale Myokard ist in Septen organisiert. Die Musculi pectinati sind durch eine feine Bindegewebsschicht umhüllt. Maßstab 100 µm.

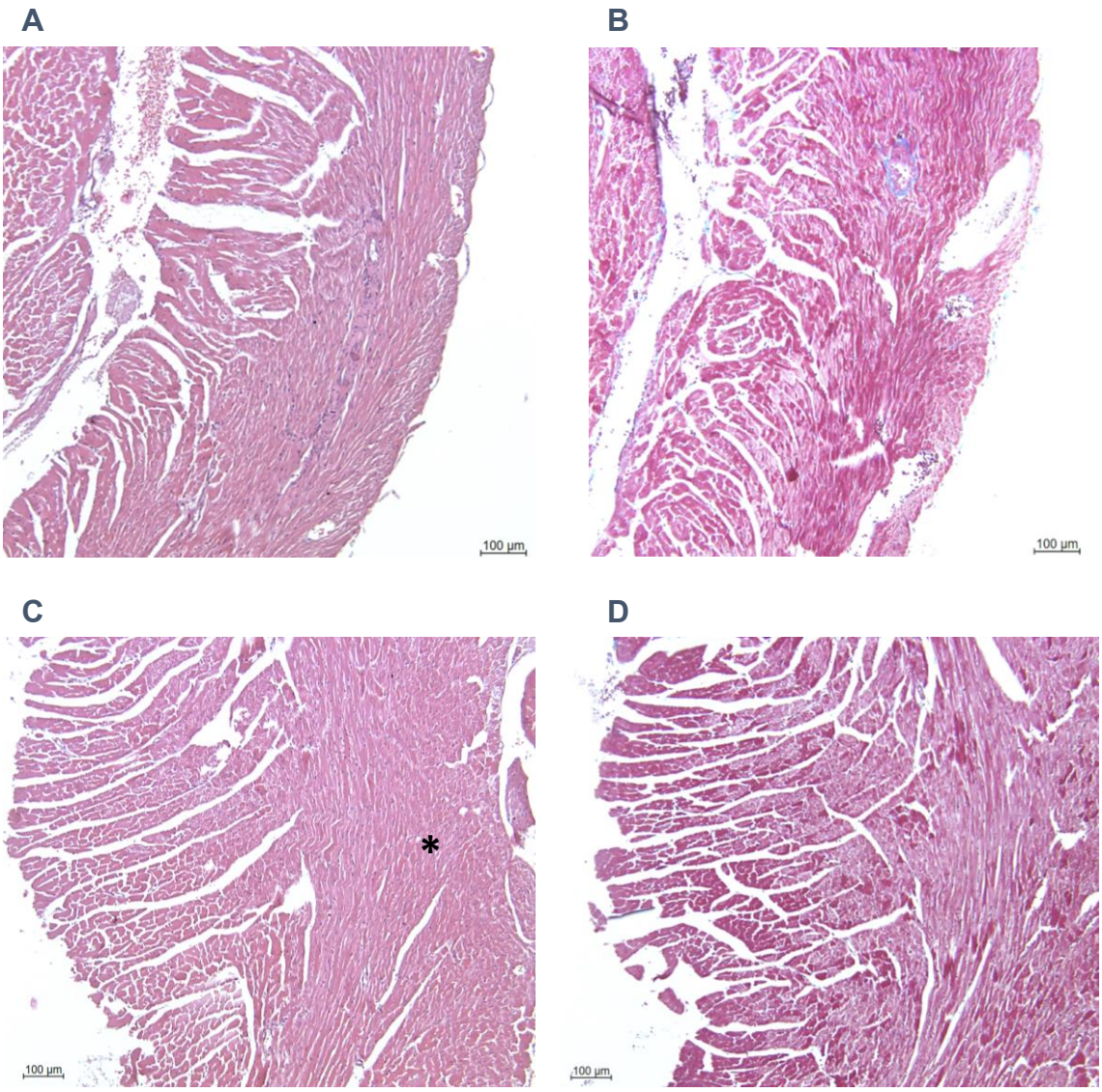


Abbildung 5.3: Mikroskopische Darstellung der Ventrikelwände einer 27 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus → **A, B**: rechter Ventrikel (**A**: HE-Färbung, **B**: Azan-Färbung); **C, D**: linker Ventrikel (**C**: HE-Färbung, **D**: Azan-Färbung). Die Kardiomyozyten sind quer, schräg und längs angeschnitten. Mit dem Zeichen * wird das Septum interventriculare, welches dem linken Ventrikel zugerechnet wird, markiert. Maßstab 100 µm.

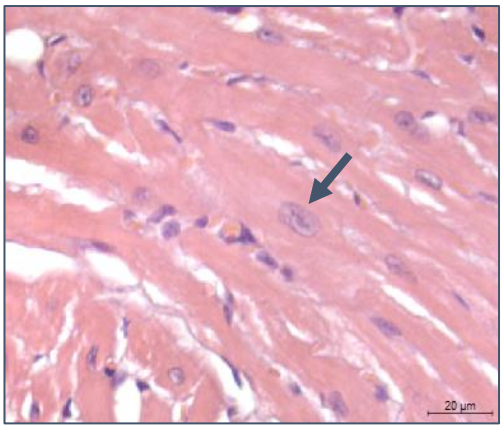


Abbildung 5.4: Vergrößerung aus dem rechten Ventrikel einer 30 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus (HE-Färbung); die Zellkerne (blauer Pfeil) sind oval und im Zentrum des Kardiomyozyten lokalisiert; Maßstab 20 µm.

5.2.1 Verminderung der Desmoglein 2-Färbung an den Glanzstreifen der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse

Um die Pathophysiologie der AC und den Einfluss der adhäsiven extrazellulären Domänen auf die Herzfunktion zu untersuchen, wurden Mausstämme mit einem mutierten Dsg2-Gen etabliert, dem die Exone 4-6, welche für Teile der EC1-EC2-Domänen kodieren, fehlen (Krusche et al. 2011, Kant et al. 2012, Einleitung, Kapitel 1.6). Ebenso kommt in menschlichen AC oder DCM-Herzen eine Deletion von Teilen der EC1-EC2-Domänen des DSG2/DSC2-Proteins vor (Basso et al. 2006, Sen-Chowdhry et al. 2007, Awad et al. 2008, Posch et al. 2008). Wir führten immunhistochemische Reaktionen mit einem polyklonalen anti-Dsg2-Antikörper aus dem Kaninchen auf Paraffinschnitte durch. Das Dsg2-Protein ließ sich im Bereich der Glanzstreifen der wildtypischen Tiere kräftig anfärben. Die Kardiomyozyten haften im Bereich der Glanzstreifen aneinander (Abbildung 5.5). Die Anzahl der Dsg2-positiven Glanzstreifen der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse erschient wiederum rarefiziert zu sein (Abbildung 5.6).

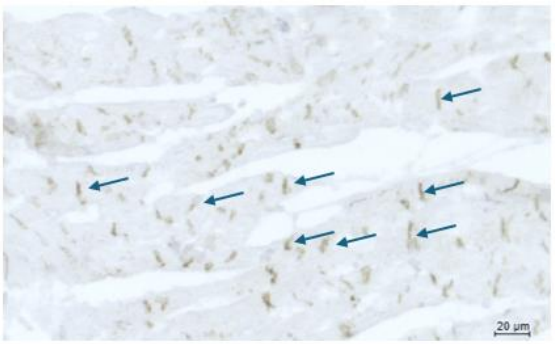


Abbildung 5.5: Immunhistochemische Färbung mit einem Anti-Dsg2-Antikörper (Wildtyp): rechter Ventrikel einer 27 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$ Maus; Treppen-artige Anordnung der Glanzstreifen (blaue Pfeile), welche der Zell-Zell-Verbindung der benachbarter Kardiomyozyten dienen; Maßstab 20 µm.

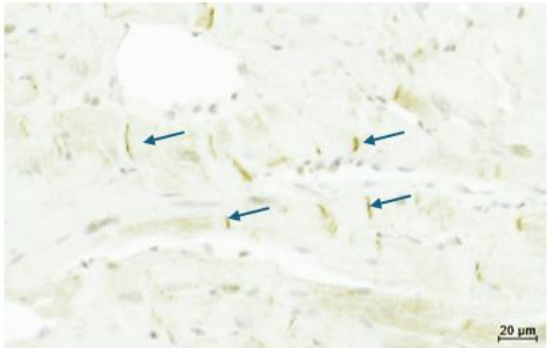


Abbildung 5.6: Immunhistochemische Färbung mit einem Anti-Dsg2-Antikörper (Mutante): linker Ventrikel einer 28 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus; verminderte Dsg2-Immunreaktivität aufgrund von weniger mutiertem Desmoglein 2-Protein an den Glanzstreifen und Strukturveränderung des Kammermyokards; Maßstab 20 µm.

5.2.2 Kardiomyozytenverlust, Inflammation und Dilatation der Herzkammern der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse: histologische Färbungen (HE, Azan)

FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse mit einem makroskopischen Phänotyp zeigen auf histologischer Ebene Läsionen, die vor allem das linke Atrium sowie den rechten Ventrikel betreffen und überwiegend subepikardial, im Bereich der Papillarmuskeln oder septal lokalisiert sind. Die akute/offene Phase der AC, welche durch FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse der Altersklasse 10-14 Wochen abgebildet wird, ist durch das Auftreten von Myokardläsionen und einer Dilatation der Herzkammer gekennzeichnet. Das Myokard im Läsionsbereich ist makroskopisch farbverändert. Absterbende Kardiomyozyten lassen sich stark eosinophil anfärben, sind teilweise kernlos oder präsentieren einen kondensierten Zellkern. Abbildung 5.7 zeigt beispielhaft eine subepikardiale Läsion mit kernlosen hyperämischen Kardiomyozyten. Neben nekrotischen Herzmuskelzellen befinden sich aufgelockerte Areale ohne Kardiomyozyten (Abbildungen 5.8, 5.9, 5.10). Eine Verschmälerung und Ausdünnung der Myokardwand ist Folge des Kardiomyozytenverlustes. Die atriale Wand einer 14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus in Abbildung 5.9 ist dilatiert, die Myokardstruktur aufgelockert. Die abgestorbenen Kardiomyozyten werden durch Bindegewebsstraßen ersetzt. Zum Teil imponieren in den durch Fibrose durchsetzen Arealen noch vitale Kardiomyozyten (Abbildung 5.11). Die ersten Immunzellen, dessen Charakterisierung im nächsten Kapitel erfolgen wird, wandern im Bereich der frisch entstandenen Läsionen ein. Im Verlauf bildet sich im Läsionsbereich ein zellreiches Infiltrat, bestehend aus Immunzellen, Zelldebris und apoptotischen/nekrotischen Zellen. Mit zunehmendem Alter nimmt die Ausprägung der Herzkammerdilatation und die Reorganisation mit zum Teil vollständigem Ersatz der atrialen/ventrikulären Wand durch Bindegewebe (Ersatzfibrose) zu. Das Atrium einer 27-Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus in Abbildung 5.12 ist stark dilatiert und stellenweise bis auf wenige µm ausgedünnt. Vereinzelt kommen apoptotische Kardiomyozyten zur Darstellung. In einer benachbarten Stelle zeigt sich ein aufgelockertes Myokard-freies Areal, während großenteils der Atrienwand durch Bindegewebe ersetzt wird.

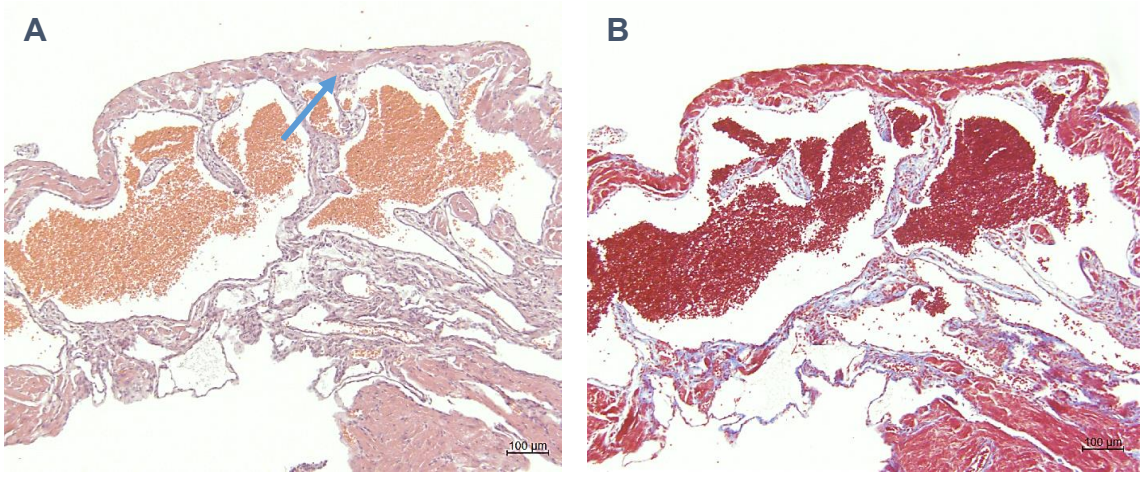


Abbildung 5.7: Subepikardiale Läsion mit kernlosen Kardiomyozyten (hellblauer Pfeil) im Atrium einer 10 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus. **A**: HE-Färbung, **B**: Azan-Färbung. In der Umgebung ist eine bereits etablierte Fibrosierung des Myokards (B, blaue Färbung) zu finden. Maßstab 100 µm

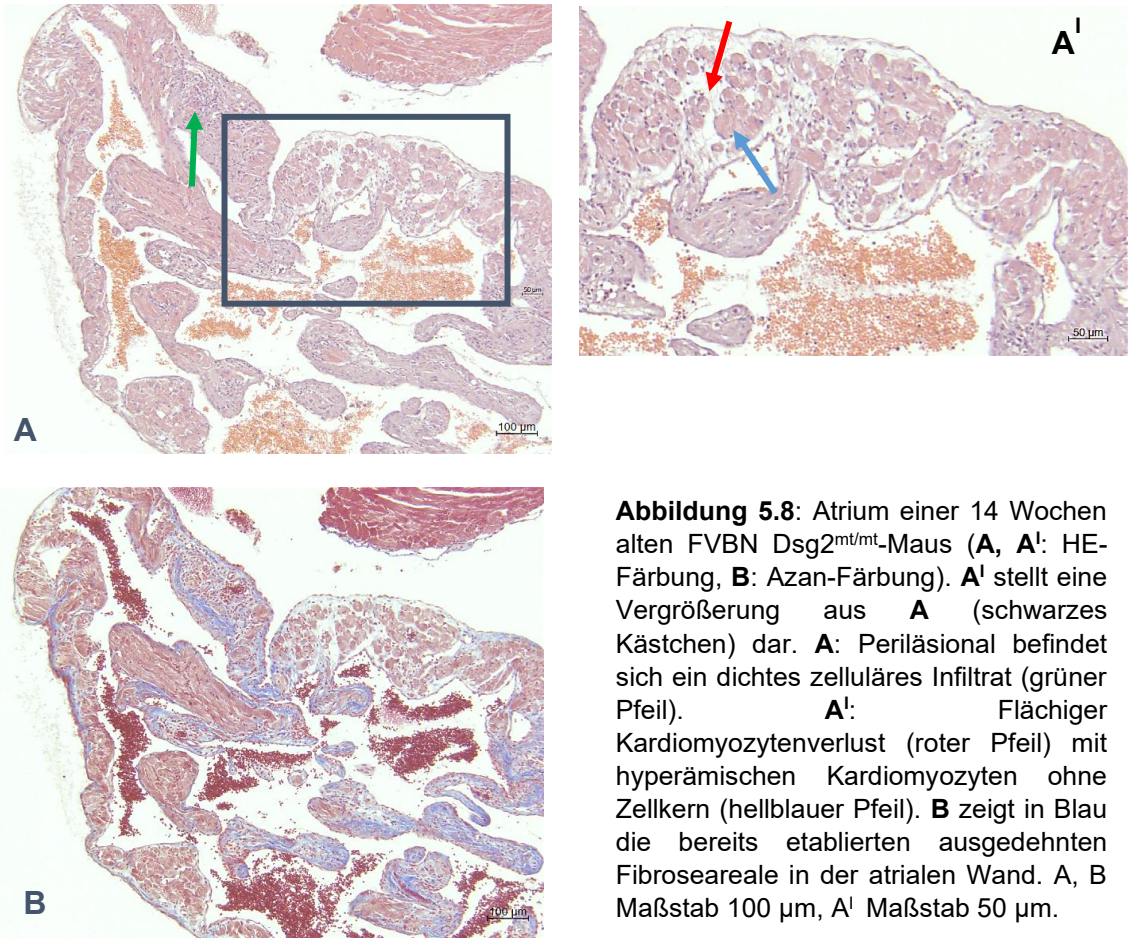


Abbildung 5.8: Atrium einer 14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**A, A^{I}**: HE-Färbung, **B**: Azan-Färbung). **A^{I}** stellt eine Vergrößerung aus **A** (schwarzes Kästchen) dar. **A**: Periläsional befindet sich ein dichtes zelluläres Infiltrat (grüner Pfeil). **A^{I}**: Flächiger Kardiomyozytenverlust (roter Pfeil) mit hyperämischen Kardiomyozyten ohne Zellkern (hellblauer Pfeil). **B** zeigt in Blau die bereits etablierten ausgedehnten Fibroseareale in der atrialen Wand. A, B Maßstab 100 µm, A^{I} Maßstab 50 µm.

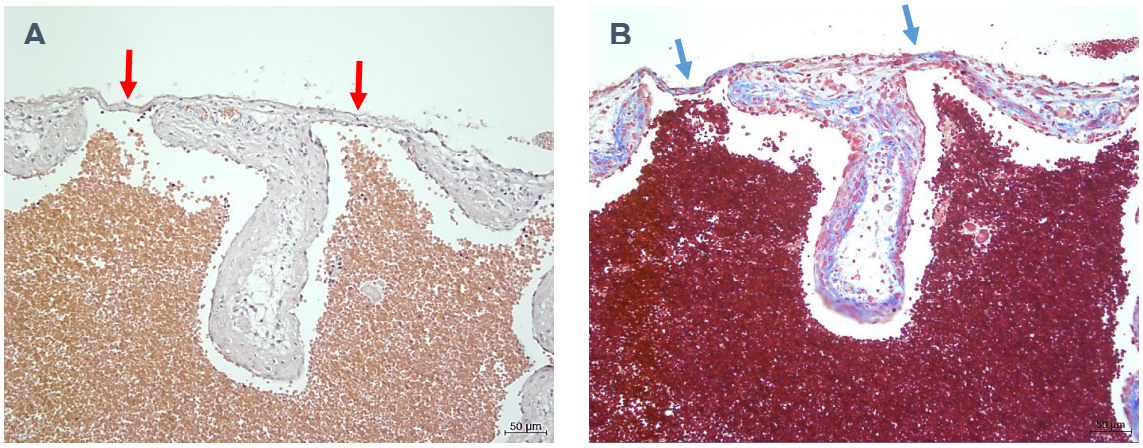


Abbildung 5.9: Ausschnitt aus dem Atrium einer 14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**A**: HE-Färbung, **B**: Azan-Färbung). Die atriale Wand ist an zwei Stellen (roter Pfeil) stark ausgedünnt. Abgestorbene Kardiomyozyten werden durch Bindegewebe (hellblauer Pfeil) ersetzt. Maßstab 50 µm.

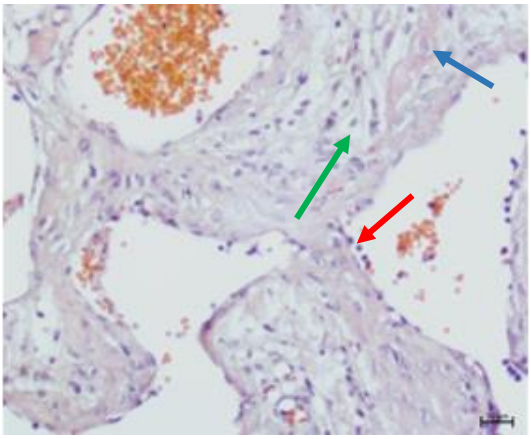


Abbildung 5.10: Ausschnitt aus dem Atrium einer 14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (HE-Färbung). Herzmuskelzellen mit vergrößertem Zellkern und aufgelockertem Chromatin (hellblauer Pfeil) befinden sich in direkter Nachbarschaft zu Arealen mit Kardiomyozytenverlust (grüner Pfeil). Periläsional wandern die ersten Immunzellen ein (roter Pfeil); Maßstab 20 µm.

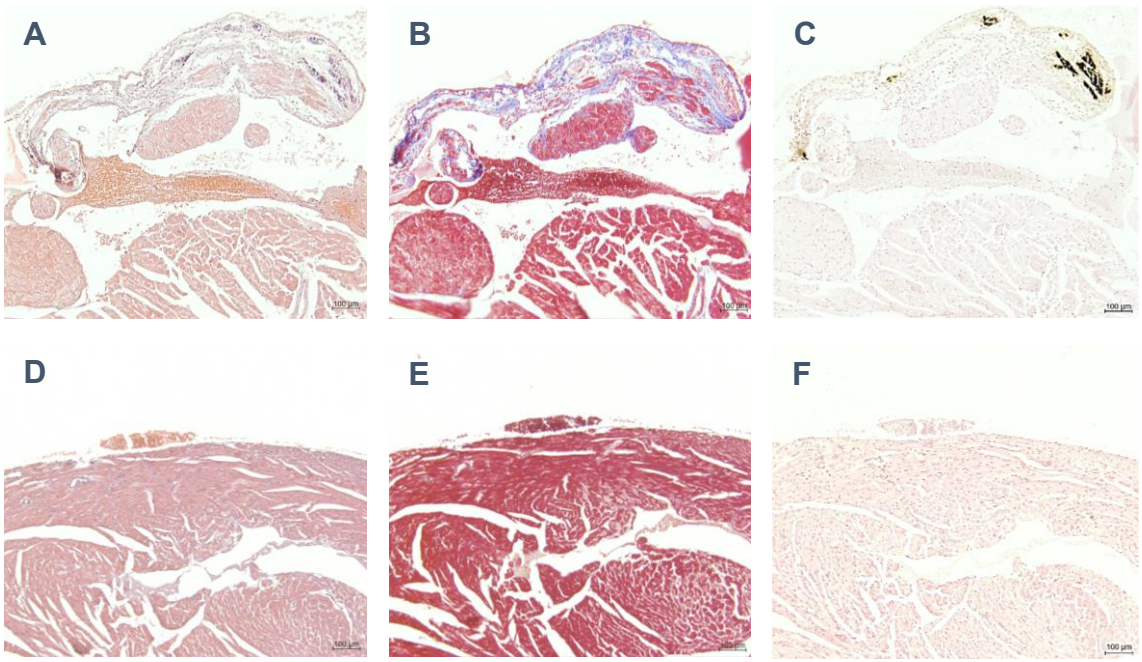


Abbildung 5.11: **A, B, C**: Rechter Ventrikel einer 14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**A**: HE-Färbung, **B**: Azan-Färbung, **C**: Kossa-Färbung); der rechte Ventrikel ist dilatiert und fibrotisch umgebaut. Inmitten befinden sich vereinzelte vitale Kardiomyozyten; **C**: Kalzifizierende Läsion im Bereich des rechten Ventrikels (Kossa-Färbung, schwarzes Areal). Maßstab 100 µm. **D, E, F**: Rechter Ventrikel einer 12 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus als Kontrolle (**D**: HE-Färbung, **E**: Azan-Färbung, **F:** Kossa-Färbung). Kräftige und in Bündeln organisierte Muskelschichten formen die Ventrikelwand. Maßstab 100 µm.

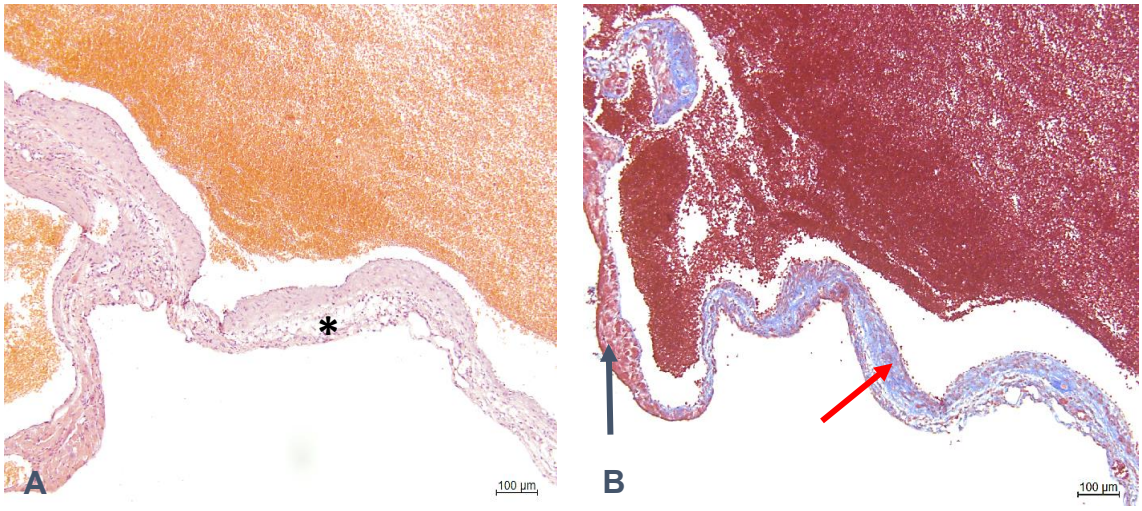


Abbildung 5.12: Atrium einer 27 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**A**: HE-Färbung, **B**: Azan-Färbung). Die atriale Wand ist massiv dilatiert und durch Bindegewebe ersetzt (Ersatzfibrose; roter Pfeil). Neben hyperämischen Kardiomyozyten (blauer Pfeil) befinden sich fibrosierte Areale ohne Kardiomyozyten (* in A und roter Pfeil in B); Maßstab 100 µm

5.2.3 Fibrotische Läsionen: histologische Färbungen (HE, Azan)

Die Krankheitsprogression ist durch ein Remodelling der myokardialen Struktur und Ersatz der abgestorbenen Kardiomyozyten durch Bindegewebe charakterisiert, wobei in der chronischen Phase der Erkrankung sowohl fibrotische nicht kalzifizierende Läsionen als auch Läsionen mit kalzifizierten Kardiomyozyten (Kapitel 5.2.4) vorkommen. In fibrotischen Läsionen werden nekrotische Kardiomyozyten vollständig durch Immunzellen phagozytiert und abgebaut, sodass nur endomysiales und perimysiales Bindegewebe verbleibt. Organisierte nicht kalzifizierende Läsionen sind sowohl durch eine interstitielle Bindegewebsvermehrung (interstitielle Fibrose) als auch durch eine Ersatzfibrose gekennzeichnet. Bindegewebige Läsionen fielen bereits in den 10-14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen auf, wobei vor allem die Atrien dieser Mäuse von einer interstitiellen Bindegewebsvermehrung und Ersatzfibrose betroffen waren (Abbildung 5.13). Eine flächenhafte Fibrosierung des Myokards fand sich vor allem in den 26-31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen. Der rechte Ventrikel einer 28 Wochen alten Maus (Abbildung 5.14 A, B) weist eine geringe Bindegewebsinfiltration im Läsionsbereich auf. Ebenso wird eine Läsion im Bereich des linken Ventrikels derselben Maus durch Bindegewebssepten umgeben (Abbildung 5.14 C, D). Der rechte Ventrikel einer 31 und 29 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (Abbildung 5.15) ist beispielweise weitgehend fibrotisch ummauert, wobei inmitten vereinzelte vitale Kardiomyozyten zur Darstellung kommen.

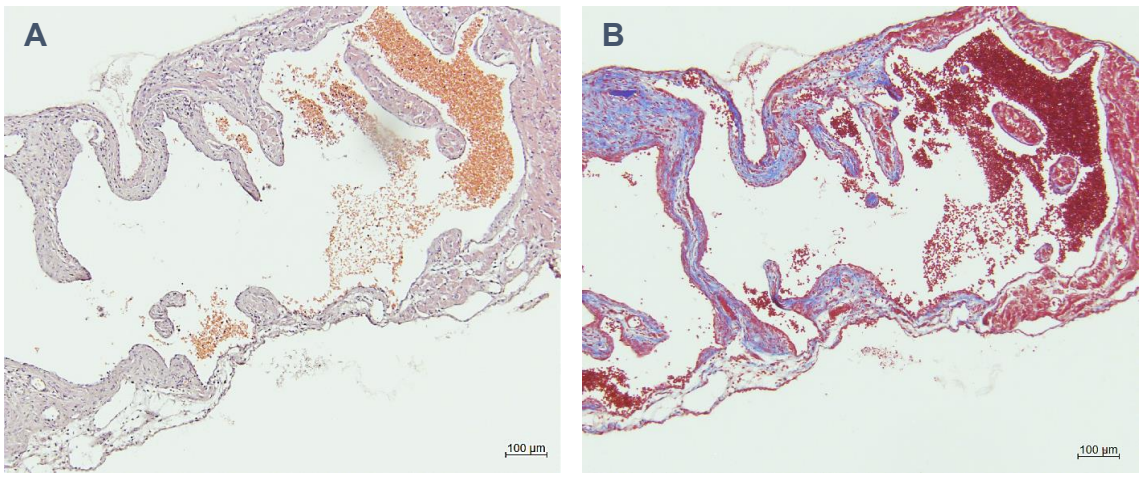


Abbildung 5.13: Atrium einer 14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**A**: HE-Färbung, **B**: Azan-Färbung). Die Atrien der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse sind stärker betroffen als die Ventrikel und weisen bereits in jungem Alter Umbauprozesse im Sinne einer flächenhaften Fibrosierung des Myokards auf. Maßstab 100 µm.

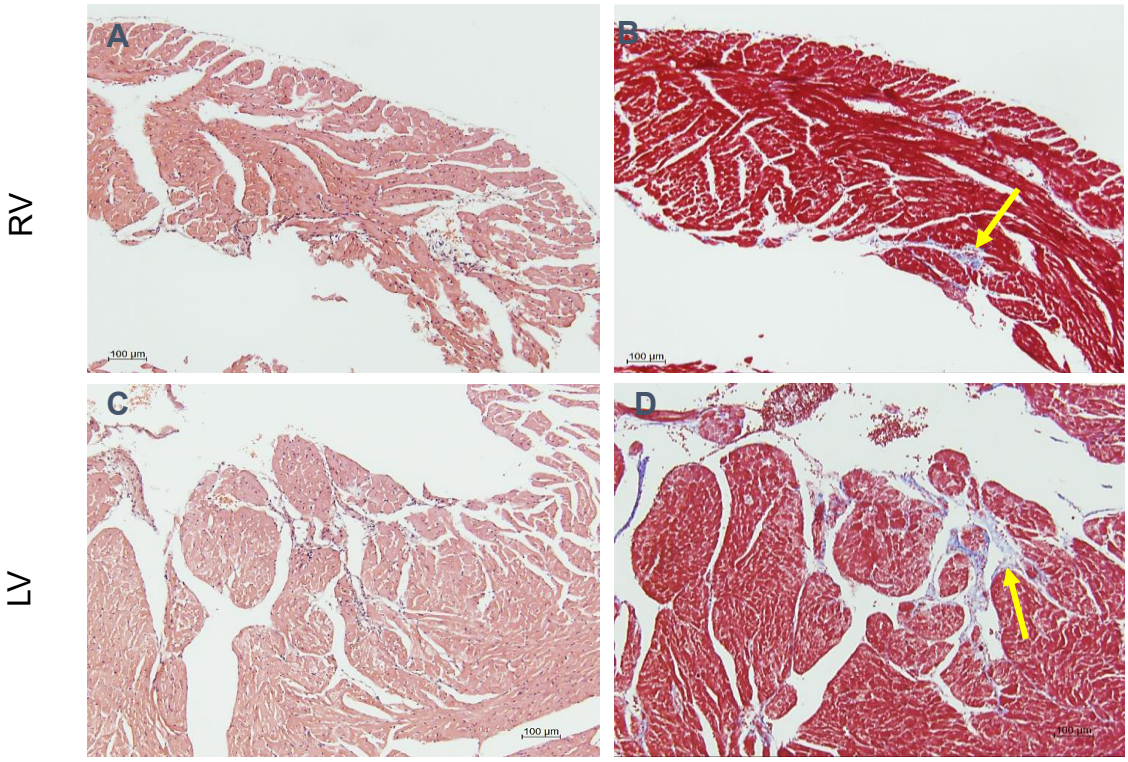


Abbildung 5.14: Histologischer Phänotyp einer repräsentativen 28 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus. Rechter (**A, B**) und linker (**C, D**) Ventrikel (**A, C**: HE-Färbung, **B, D**: Azan-Färbung). Umgebautes Myokard mit leicht verbreiterten bindegewebigen Septen (gelbe Pfeile). Maßstab 100 µm.

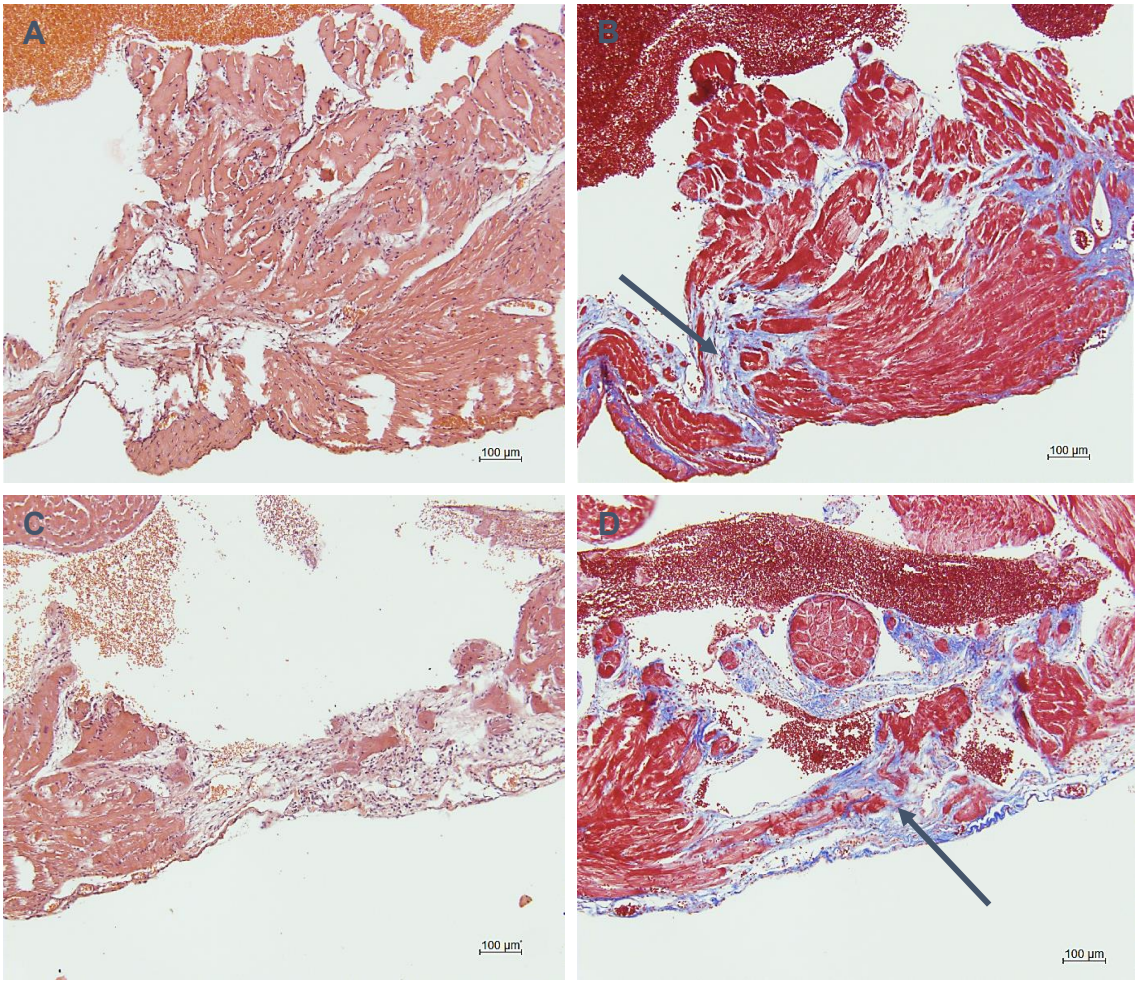


Abbildung 5.15: Morphologie des rechten Ventrikels einer 31 Wochen (**A, B**) und 29 Wochen (**C, D**) alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**A, C**: HE-Färbung, **B, D**: Azan-Färbung). Der rechte Ventrikel ist fibrotisch umgebaut (blaue Pfeile). In den Läsionen imponieren noch vereinzelte vitale Kardiomyozyten. Maßstab 100 µm.

5.2.4 Kalzifizierende Läsionen: Histologie (Kossa), In-situ-Hybridisierung (Osteopontin)

Kalzifizierende Läsionen entstehen, wenn nekrotisierende Kardiomyozyten nicht durch Immunzellen phagozytiert und abgebaut werden (Nance et al. 2015). Abgestorbene Kardiomyozyten lagern Calcium ein und kommen in der von Kossa-Färbung fleckig schwarz zur Darstellung. Silberionen der Silbernitrat-Lösung reagieren mit den Carbonat- und Phosphationen in den gespeicherten Kalkablagerungen, verdrängen die Kalziumionen und bilden einen stabilen schwarzen Niederschlag, welcher lichtmikroskopisch ausgewertet werden kann. Durch Gegenfärbung mit Kernrot lassen sich die Zellkerne rot und das Zytoplasma gelb/rosa anfärben.

Im Myokard der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse kamen Läsionen mit kalzifizierten Kardiomyozyten vor allem im ventrikulären Myokard, aber gelegentlich auch in den Atrien vor. Insbesondere fielen diese Läsionen in drei Ventrikeln und einem Atrium der 26-31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse (n= 16) auf. Abbildung 5.16 zeigt eine Läsion mit kalzifizierten Kardiomyozyten im Bereich des Atriums einer 27 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus. In der HE- und Azan-Färbung kommt eine begleitende reaktive Bindegewebsvermehrung zur Darstellung.

Osteopontin (OPN) oder synonym SPP1 (Secreted Phosphoprotein 1) ist ein phosphoryliertes Glykophosphoprotein, was vor allem von reparativen Makrophagen exprimiert und sezerniert wird und eine wesentliche regulatorische Funktion im Rahmen von Remodelling-Prozessen nach Myokardinfarkten spielt (Shirakawa & Sano 2021). SPP1+ Immunzellen sind an der Bildung von Kalzifikationen beteiligt. Osteopontin wird von Makrophagen u.a. in atherosklerotischen Kalkablagerungen exprimiert, was die Plaque-Formation und den Verkalkungsprozess fördert (Zhao et al. 2024). Der genaue Pathomechanismus ist noch nicht geklärt. Folgende Hypothesen wurden aufgestellt:

a) Osteopontin beeinflusst die Migration von Endothelzellen über den αvβ3-Liganden und steuert somit der Formation von Gefäßverkalkungen bei
b) Osteopontin löst eine Gefäßentzündung durch Aktivierung von Makrophagen und Zytokine aus, welche wiederum die Verkalkung/Bildung von atherosklerotischen Plaques fördert (Icer & Gezmen-Karadag 2018).

Durch *in situ* Hybridisierungsversuche konnten wir die mRNA-Expression von Osteropontin in kalzifizierten Arealen des Herzmuskels nachweisen. Abbildung 5.17 zeigt beispielhaft eine großflächige Kalzifikation im Bereich des rechten Ventrikels einer 31-Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus, welche SPP1+ Immunzellen besitzt (Abbildung 5.17 D).

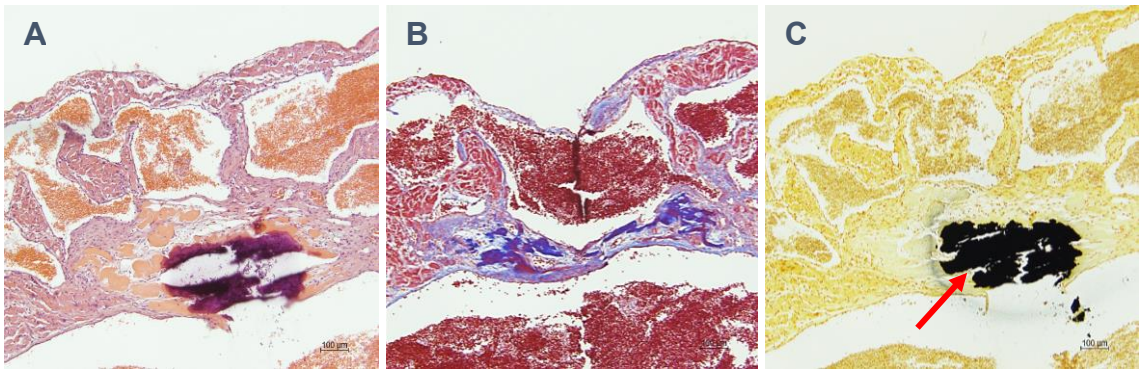


Abbildung 5.16: Kalzifikation im Bereich des Atriums einer 27-Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ Maus (**A**: HE-Färbung, **B**: Azan-Färbung, **C**: von Kossa-Färbung). Die kalzifizierende Läsion kommt in der von Kossa-Färbung schwarz zur Darstellung (roter Pfeil). Maßstab 100 µm.

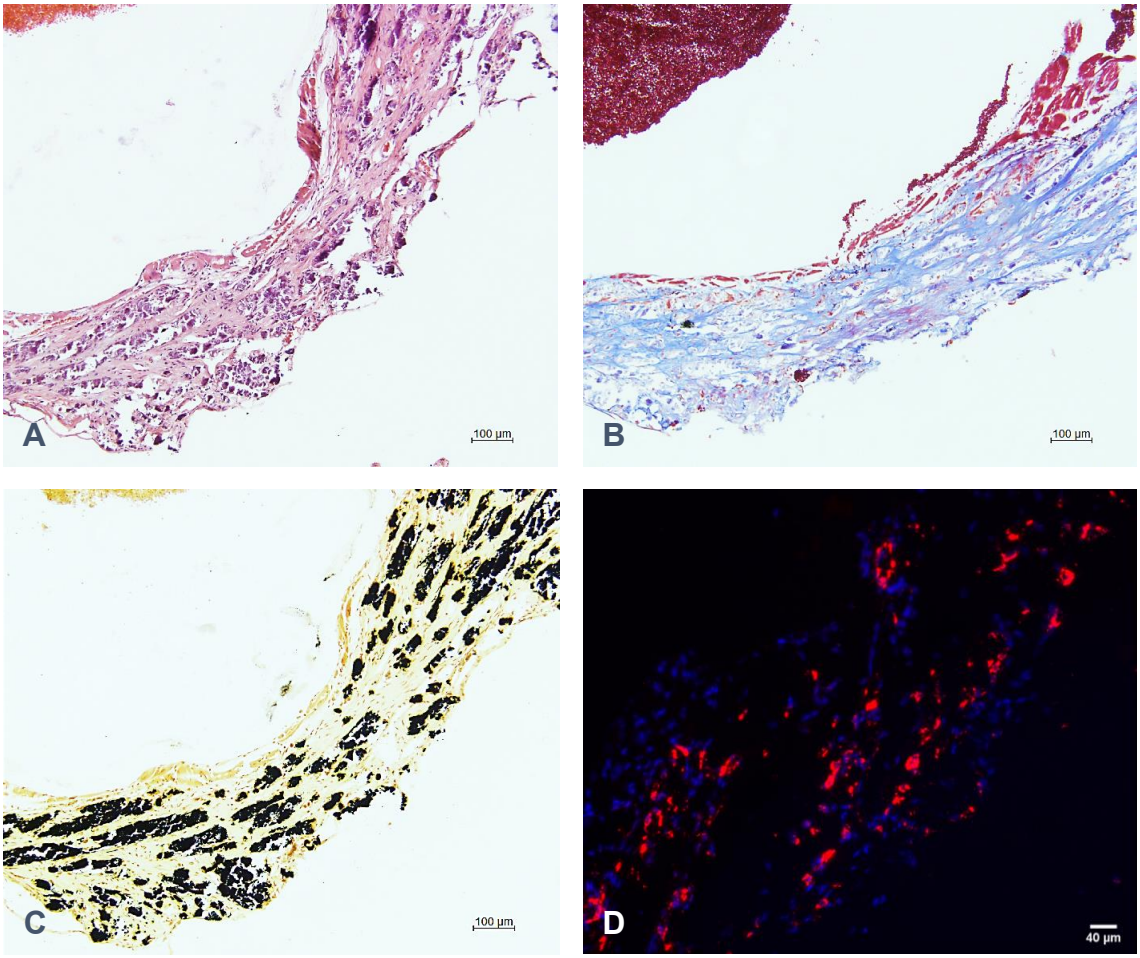


Abbildung 5.17: Kalzifikation im Bereich des rechten Ventrikels einer 31 Wochen alten Dsg2$^{mt/mt}$-Maus **A**: HE-Färbung, **B**: AZAN-Färbung, **C**: die von Kossa-Färbung zeigt die Kalzifizierung (schwarze Areale), **D**: In situ Hybridisierung: Osteopontin/SPP1 mRNA Expression (rote Fluoreszenz) im Bereich der kalzifizierten Läsion; A, B, C: Maßstab 100 µm; D: Maßstab 40 µm.

5.3 Immunfluoreszenz-Färbung der Zellmembranen mit WGA-TRITC zur Analyse einer Kardiomyozyten-Hypertrophie

Die Hypertrophie von Kardiomyozyten ist eine Reaktion auf intrinsischen und/oder extrinsischen mechanischen Stress zwecks Aufrechterhaltung einer global normalen systolischen Pumpfunktion. Eine physiologische Hypertrophie tritt während der Entwicklung und des Herzwachstums auf. Eine reaktive, reversible Hypertrophie wird während der Schwangerschaft und beim Ausdauertraining beobachtet (Umar et al. 2012, George et al. 2012). Im Gegensatz dazu wird eine pathologische Herzhypertrophie durch eine Volumen- und Drucküberlastung ausgelöst und tritt auch in der akuten/offenen und fortgeschrittenen Phase der AC als Folge des Kardiomyozytenverlustes und des kardialen Remodelling auf (Haddad et al. 2008, Seidman C.E. & Seidman J.G 2011, Parvari & Levitas 2012, Gerçek et al. 2017). Um eine pathologische Hypertrophie periläsionaler Kardiomyozyten in der akuten und chronischen Phase der AC im murinen Tiermodell zu untersuchen, färbten wir die Zellmembranen des Myokards der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- und Dsg2$^{wt/wt}$-Mäuse der Altersklasse 10-14 und 26-31 Wochen mit TRITC (Tetramethylrhodaminisothiocyanat)-gekoppeltem WGA (wheat germ agglutinin) an und die Zellkerne mit DAPI. Mit dem Image-J Fiji Programm wurden die Kardiomyozytendurchmesser ausgemessen. Dabei wurde eine gerade Linie durch den Zellkern und den kürzesten Abstand der Zellmembran der Kardiomyozyten gezogen. Die Analyse wurde ohne Kenntnis des Phänotyps durchgeführt und durch eine zweite verbildete Person überprüft. Der Mittelwert der Kardiomyozyten-Durchmesser der Atrien der 10-14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Mäuse betrug 8,9 ± 0,6 µm. Im Gegensatz dazu, konnten wir eine ausgeprägte Variabilität des atrialen Kardiomyozyten-Durchmesser der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse beobachten: einerseits zeigten sich stark hypertrophierte Kardiomyozyten mit einem maximalen Durchmesser von 21,98 µm, andererseits befanden sich im Läsionsbereich atrophe Kardiomyozyten mit dem kleinsten Durchmesser von 5,39 µm. Der Mittelwert der atrialen Durchmesser der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse der Altersklasse 10-14 Wochen lag bei 9,9 ± 2,1 µm (Abbildung 5.18). Der Mittelwert der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse war im Vergleich zu dem der FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Mäusen der Altersklasse 10-14 Wochen nicht signifikant erhöht,

wobei eine starke Varianz der Kardiomyozytenmittelwerte der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse auffiel (Abbildung 5.19: unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0,4762).

Ebenso stellten wir eine ausgeprägte Variabilität des atrialen Kardiomyozytendurchmessers der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse in der Altersgruppe 27-31 Wochen fest. Der atriale Durchmesser der FVBN Dsg2$^{wt/wt}$- und Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse betrug in der Altersklasse 27-30 Wochen jeweils 10,2 ±1,0 und 9,9 (± 2,2 µm. Periläsional zeigten sich sowohl kompensatorisch hypertrophierte als auch bereits atrophe Kardiomyozten (Abbildung 5.20). Der Mittelwert der Kardiomyozytendurchmesser im Bereich der Atrien der 27-31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse war im Vergleich zu den FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Mäusen nicht signifikant erhöht (unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0,7302, Abbildung 5.21).

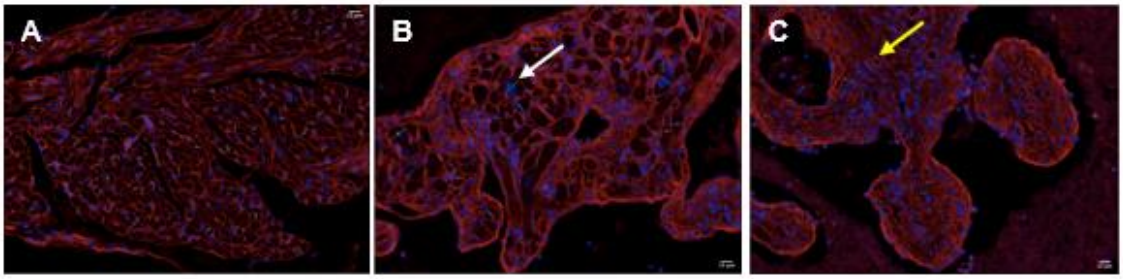


Abbildung 5.18: Atrium einer 12 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$ (**A**) und einer 14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**B**, **C**); WGA-TRITC-Immunfluoreszenz und DAPI-Kernfärbung. **A**: atriale Kardiomyozytendurchmesser eines wildtypischen Kontrolltieres. **B, C**: neben periläsional lokalisierte hypertrophe Kardiomyozyten (weißer Pfeil), befinden sich bereits atrophe Kardiomyozyten (gelber Pfeil) in durch Fibrose durchsetzen Arealen. Maßstab 15 µm.

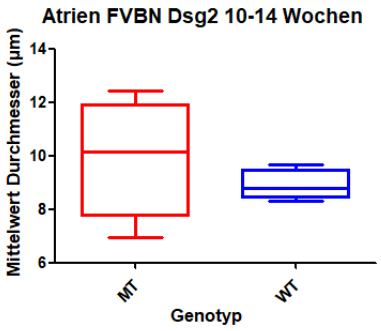


Abbildung 5.19: Mittelwerte der atrialen Kardiomyozyten-Durchmesser der 10-14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ (MT)- und der FVBN Dsg2$^{wt/wt}$ (WT)-Mäuse: unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0,4762.

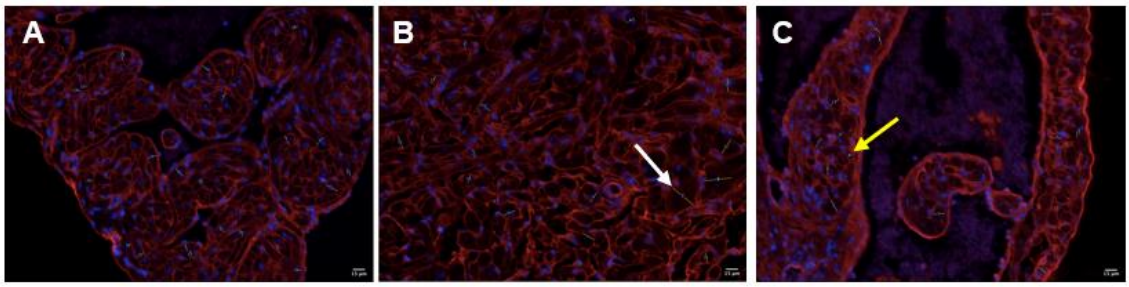


Abbildung 5.20: Atrium einer 29 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus (**A**) und einer 27 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**B**, **C**); WGA-TRITC-Immunfluoreszenz und DAPI-Kernfärbung. **A**: atriale Kardiomyozytendurchmesser eines wildtypischen Kontrolltieres. **B, C**: neben periläsional lokalisierten, hypertrophen Kardiomyozyten (weißer Pfeil) befinden sich bereits atrophe Kardiomyozyten (gelber Pfeil). Maßstab 15 µm.

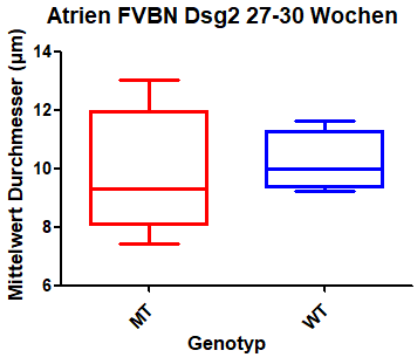


Abbildung 5.21: Mittelwerte der atrialen Kardiomyozyten-Durchmesser der 27-31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ (MT)-Mäuse und FVBN Dsg2$^{wt/wt}$ (WT)-Mäuse: unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0,7302.

Um den kardialen Phänotyp der Atrien der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ mit dem vorherigen B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Mausmodell zu vergleichen, untersuchten wir die Atrien von B6 Dsg2$^{mt/mt}$- und Dsg2$^{wt/wt}$ Mäusen der Altersklasse 12-14 und 26-28 Wochen (n = 13). In der Altersklasse 12-14 Wochen, zeigten zwei von drei B6 Dsg2$^{mt/mt}$ Mäusen (n=3) geringe phänotypische atriale Veränderungen und nur eine der drei wies eine leichte Bindegewebsvermehrung auf. Ein weiteres Atrium einer B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Maus zeigte keine morphologischen Auffälligkeiten. Der atriale Kardiomyozyten-Durchmesser der B6 Dsg2$^{wt/wt}$-Mäuse der Altersklasse 12-14 Wochen betrug 7,0 ± 0,3 µm. Der mittlere atriale Kardiomyozyten-Durchmesser der B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse der Altersklasse 12-14 Wochen lag bei 8,9 ± 1,8 µm (Abbildung 5.22; unpaired Mann Whitney T-Test; p-Wert: 0,1429). Somit konnte eine Tendenz zu erhöhten atrialen Kardiomyozyten-Durchmesser beobachtet werden (Abbildung 5.23). In der Altersklasse der 26-28 Wochen alten B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse konnte ebenso nur eine geringe Affektion des atrialen Myokards

nachgewiesen werden. Eine von vier B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Maus der Altersklasse 26-28 Wochen zeigte eine beginnende Fibrosierung der atrialen Wand. Der mittlere Kardiomyozyten-Durchmesser der Atrien der B6 Dsg2$^{wt/wt}$-Mäuse der Altersklasse 26-28 Wochen lag bei 6,7 ±1,0 µm versus 11,4 ± 1,9 µm bei den B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen (Abbildung 5.24; unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0,0286, Abbildung 5.25) und war damit signifikant erhöht.

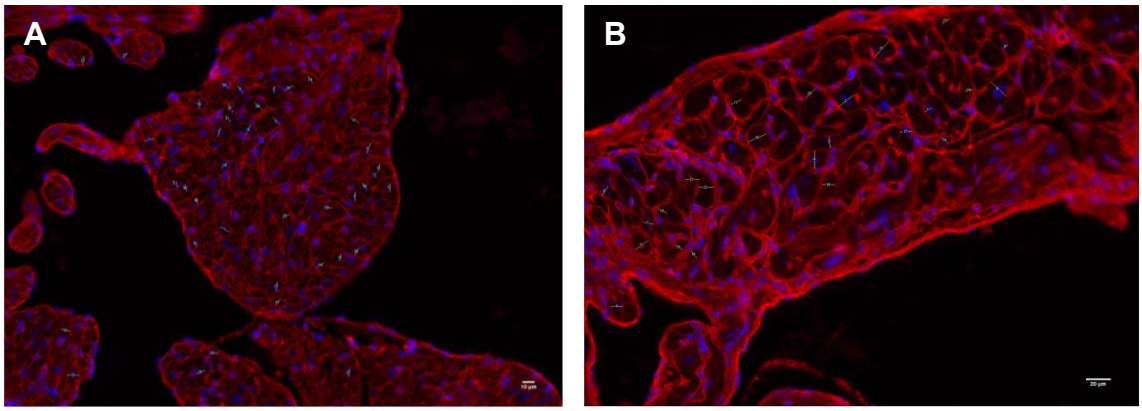


Abbildung 5.22: Atrium einer 12 Wochen alten B6 Dsg2$^{wt/wt}$- (**A**) und einer 14 Wochen alten B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**B**); WGA-TRITC-Immunfluoreszenz-Färbung und DAPI-Kernfärbung. **A**: atriale Kardiomyozytendurchmesser eines wildtypischen Kontrolltieres. Maßstab 10 µm; **B**: hypertrophe Kardiomyozyten im Bereich des Atriums einer B6 Dsg2-Mutante. Maßstab 20 µm.

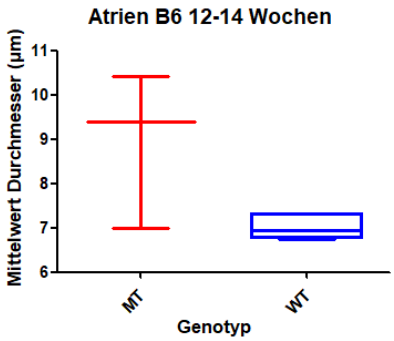


Abbildung 5.23: Mittelwerte der atrialen Kardiomyozyten-Durchmesser der B6 Dsg2$^{mt/mt}$ (MT)- versus B6 Dsg2$^{wt/wt}$-(WT) Mäuse 12-14 Wochen: unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0,1429.

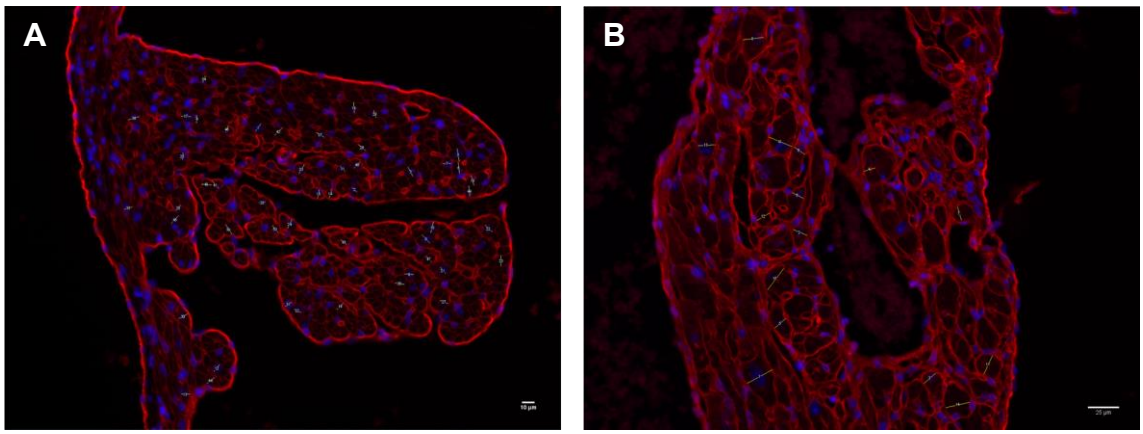


Abbildung 5.24: Atrium einer 26 Wochen alten B6 Dsg2$^{wt/wt}$-Maus(**A**) und einer 28 Wochen alten B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**B**); WGA-TRITC-Immunfluoreszenz (Zellmembran und Interstitium) und DAPI-Kernfärbung. **A**: atriale Kardiomyozytendurchmesser eines wildtypischen Kontrolltieres. Maßstab 10 µm; **B**: hypertrophe Kardiomyozyten im Bereich des Atriums einer B6 Dsg2-Mutante. Maßstab 25 µm.

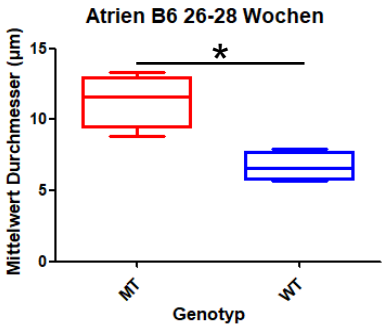


Abbildung 5.25: Mittelwerte atrialer Kardiomyozyten-Durchmesser der B6 Dsg2$^{mt/mt}$ (MT)- versus B6 Dsg2$^{wt/wt}$ (WT)-Mäuse 26-28 Wochen: unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0,0286

Unsere Beobachtungen ermöglichen folgende Schlussfolgerungen: das atriale Myokard der B6 Dsg2$^{mt/mt}$ ist weniger affektiert als das der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse, sodass die ersten dem kardialen Stress durch Kompensationsmechanismen i.S. einer Hypertrophie atrialer Kardiomyozyten entgegenwirken. Im Gegensatz dazu kann das atrialen Myokard der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse den ausgesetzten Veränderungen nur zum Teil durch Kompensationsmechanismen i.S. einer Kardiomyozyten-Hypertrophie Widerstand bieten, und es kommt bereits bei einigen Mäusen in der jüngeren Altersklasse zu einer Vernarbung des atrialen Myokards mit Atrophie der umliegenden Kardiomyozyten. Die ausgeprägte atriale Beeinträchtigung unterscheidet die FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- von den B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen. Diese

Beobachtungen lassen einen starken Einfluss des genetischen Backgrounds auf den kardialen Phänotyp vermuten (siehe Diskussionsteil).

Messungen der Kardiomyozytendurchmesser führten wir auch im Bereich der Ventrikel der FVBN Dsg2$^{wt/wt}$- und Dsg2$^{mt/mt}$- Mäusen der Altersklasse 10-14 Wochen durch. Der Kardiomyozyten-Durchmesser des rechten Ventrikels der FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Mäuse betrug 13,1 ± 0,6 µm. Hingegen fallen im Bereich des rechten Ventrikels der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ hypertrophe Kardiomyozyten mit einem maximalen Durchmesser von 30,38 µm auf (Abbildung 5.26). Der Kardiomyozyten-Durchmesser des rechten Ventrikels der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse der Altersklasse 10-14 Wochen lag bei 15,7 ± 0,8 µm. Es bestand ein Trend zu einer statistischen Signifikanz (unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0,0571, Abbildung 5.27 A). Ein Vergleich der einzelnen gemessen Kardiomyozyten-Durchmesser der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- versus FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Mäuse des rechten Ventrikels ergab einen statistisch relevanten Unterschied (unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: <0,0001, Abbildung 5.27 B).

Der Kardiomyozyten-Durchmesser des linken Ventrikels der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse der jüngeren Altersklasse betrug 17,9 ± 1,2 µm. Der maximale Kardiomyozyten-Durchmesser lag bei 37,84 µm. Im Gegensatz dazu konnte bei den wildtypischen Kontrolltieren ein Durchmesser-Mittelwert von 15,9 ± 1,3 µm berechnet werden. Abbildung 5.28 zeigt beispielhaft hypertrophe Kardiomyozyten in direkter Nachbarschaft zur einer fibrotisch umgebauten Läsion im Bereich des Papillarmuskels einer 10 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus. Der Kardiomyozyten-Durchmesser des linken Ventrikels der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen war im Vergleich zu den FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Mäusen nicht signifikant erhöht, aber es zeigte sich auch eine Tendenz zu erhöhten Werten (unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0,1143 Abbildung 5.29 A). Der Vergleich der einzelnen gemessenen Kardiomyozyten-Durchmesser zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen (unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: <0,0001, Abbildung 5.29 B).

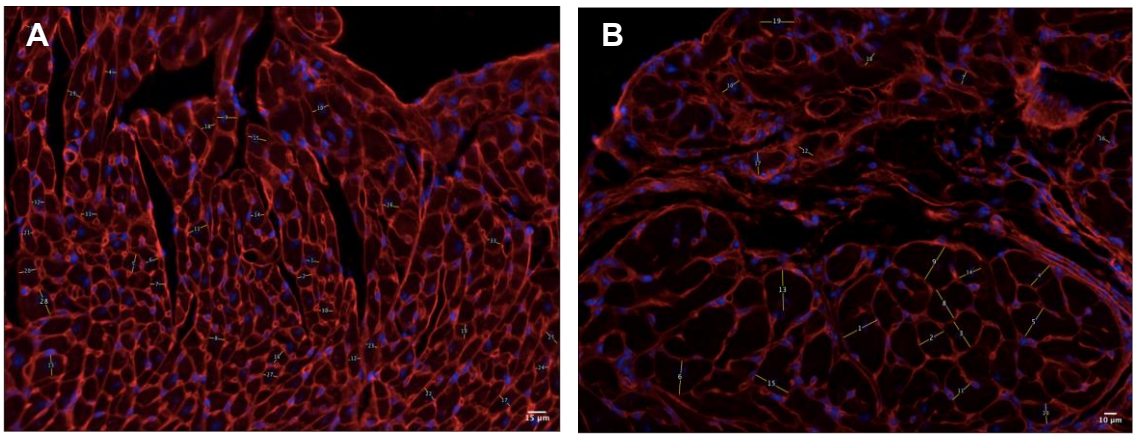


Abbildung 5.26: Rechter Ventrikel einer repräsentativen 13 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$- (**A**) und einer 12 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**B**); WGA-TRITC-Immunfluoreszenz und DAPI-Kernfärbung. **A**: rechtsventrikuläre Kardiomyozytendurchmesser eines wildtypischen Kontrolltieres. Maßstab 15 µm **B**: hypertrophe Kardiomyozyten im Bereich des rechten Ventrikels einer FVBN Dsg2-Mutante. Maßstab 10 µm.

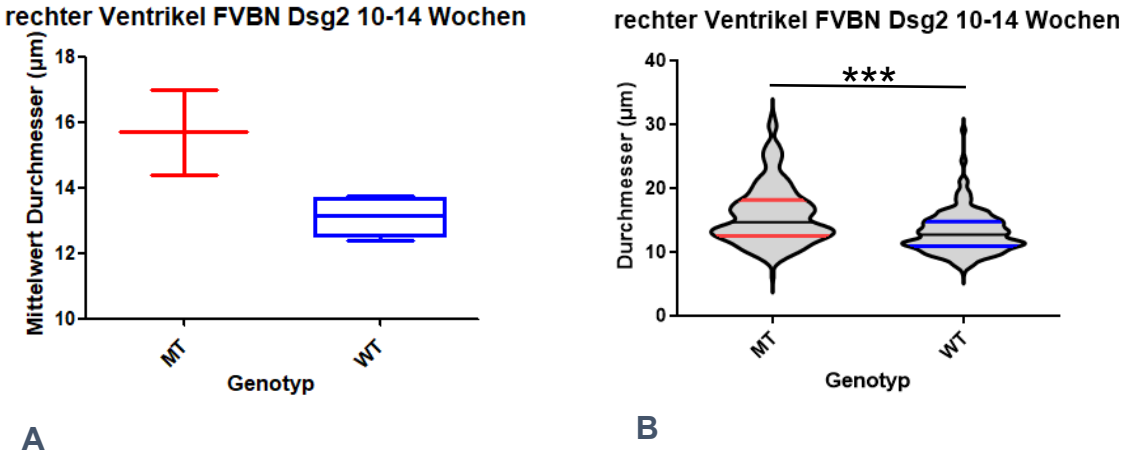


Abbildung 5.27: **A**: Mittelwerte der Kardiomyozytendurchmesser des rechten Ventrikels von 10 bis 14 Wochen alten FVBN-Dsg2$^{mt/mt}$ (MT)- und FVBN-Dsg2$^{wt/wt}$ (WT)-Mäusen: unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0,0571; **B**: Kardiomyozyten-Durchmesser der einzelnen gemessenen Kardiomyozyten der rechten Ventrikel der 10-14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- und FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Mäuse: unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: <0,0001.

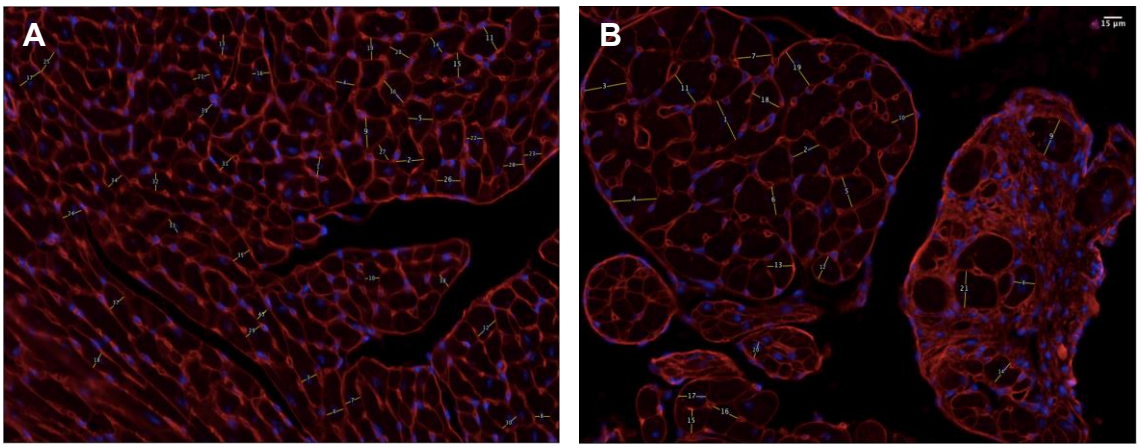
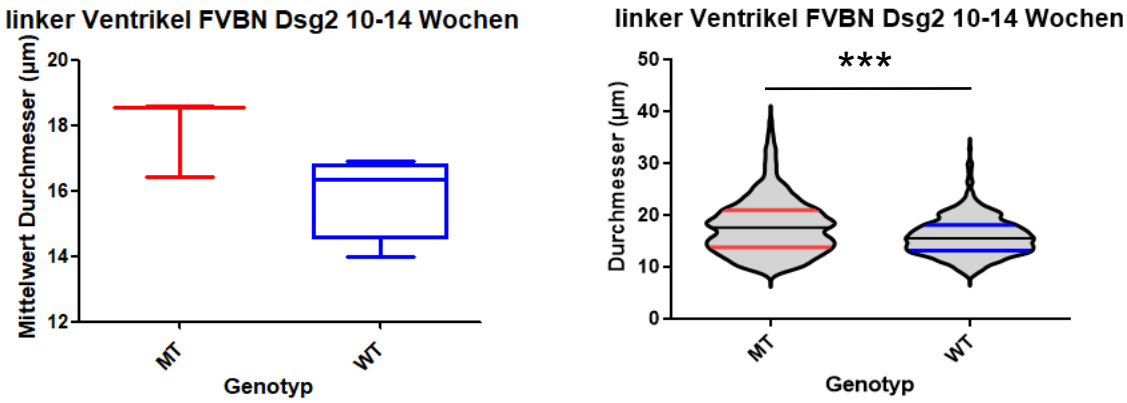


Abbildung 5.28: Linker Ventrikel einer 12 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$- (**A**) und einer 10 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**B**); WGA-TRITC-Immunfluoreszenz und DAPI-Kernfärbung. **A**: linksventrikuläre Kardiomyozytendurchmesser eines wildtypischen Kontrolltiers. **B**: hypertrophe Kardiomyozyten im Bereich des linken Ventrikels einer FVBN Dsg2-Mutante. Maßstab 15 µm.



Die

Abbildung 5.29: **A**: Mittelwerte der Kardiomyozyten-Durchmesser des linken Ventrikels von 10-14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-(MT) versus FVBN Dsg2$^{wt/wt}$- (WT) Mäusen: unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0,1143; **B**: Kardiomyozyten-Durchmesser der linken Ventrikel der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- versus FVBN Dsg2$^{wt/wt}$ 10-14 Wochen: unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: <0,0001.

Die Kardiomyozyten-Hypertrophie schreitet in der chronischen Krankheitsphase weiter voran. Der Mittelwert der Kardiomyozyten-Durchmesser des rechten Ventrikels der 26-31 Wochen alten FVBN Dsg2 betrug 12,8 ± 1,2 µm bei den Dsg2$^{wt/wt}$- und 17,6 ± 3,9 µm bei den FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen. Zum Teil konnten wir extrem hypertrophierte Kardiomyozyten mit einem Durchmesser > 30 µm (z.B. 32,782 µm) detektieren (Abbildung 5.30). Der Vergleich zwischen den

Mittelwert der Kardiomyozytendurchmesser der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- und der FVBN Dsg2$^{wt/wt}$ -Mäuse ergab trotz einer Tendenz zu erhöhten Durchmessern bei den mutierten Mäusen keinen signifikanten Unterschied (unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0,0952, Abbildung 5.31 A). Ein Vergleich der einzelnen Kardiomyozyten-Durchmesser zeigte wiederum einen signifikanten Unterschied, mit deutlich größeren Kardiomyozytendurchmesser im Bereich des rechten Ventrikels der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse (unpaired Mann-Whitney T-test; p-Wert: < 0,0001, Abbildung 5.31 B). Der Durchmesser-Mittelwert des linken Ventrikels der wildtypischen FVBN Dsg2 Mäuse lag bei 14,9 ± 0,8 µm. Im Gegensatz dazu betrug der Mittelwert-Durchmesser des linken Ventrikels der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse 17,8 ± 1,7 µm. Der höchste Kardiomyozyten-Durchmesser lag bei 36,1 µm (Abbildung 5.32). Der Mittelwert der Kardiomyozytendurchmesser der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse war im Vergleich zu den FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Mäuse signifikant erhöht (unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0,0476, Abbildung 5.33 A). Ebenso bestand ein signifikanter Unterschied beim Vergleich der einzelnen Kardiomyozyten-Durchmesser der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse mit der wildtypischen Kontrollgruppe (Mann-Whitney T-Test; p-Wert < 0,0001, Abbildung 5.33 B).

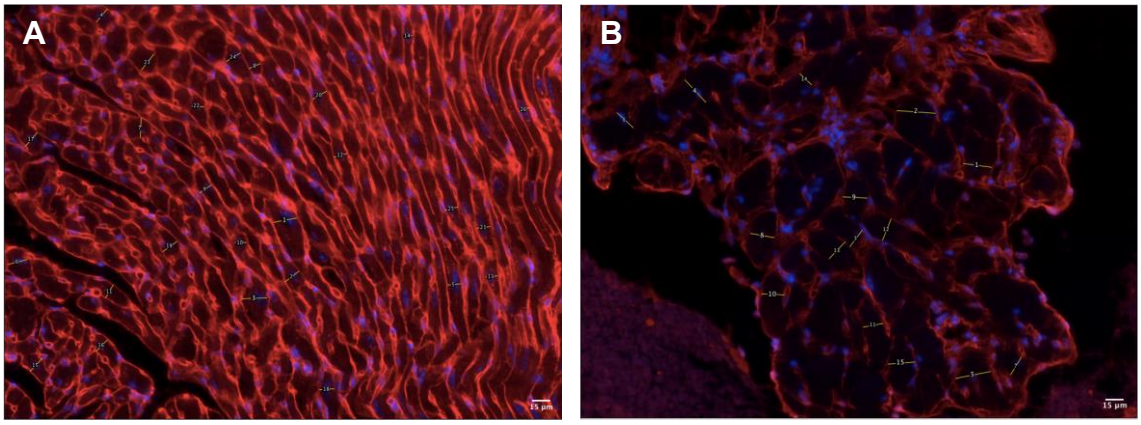


Abbildung 5.30: Rechter Ventrikel einer 27 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$- (**A**) und einer 31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**B**); WGA-TRITC-Immunfluoreszenz und DAPI Gegenfärbung. **A**: rechtsventrikuläre Kardiomyozytendurchmesser eines wildtypischen Kontrolltieres. **B**: hypertrophe Kardiomyozyten im Bereich des rechten Ventrikels einer FVBN Dsg2-Mutante. Maßstab 15 µm.

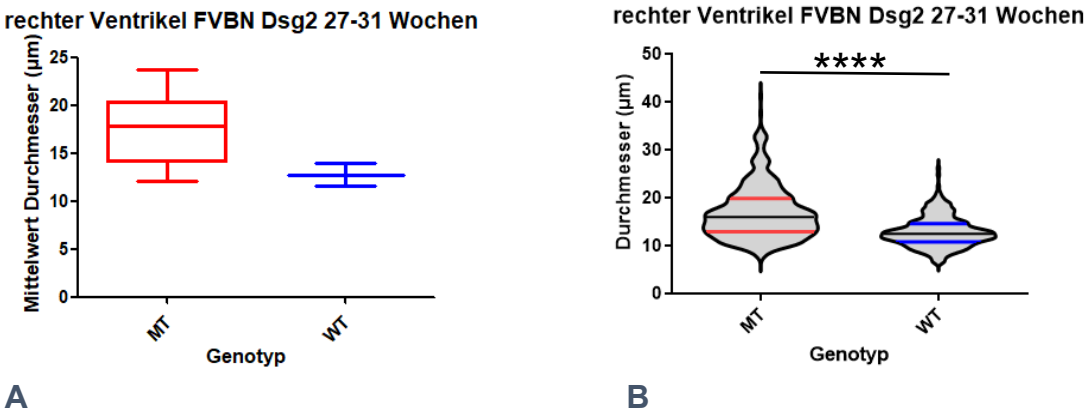


Abbildung 5.31 A: Mittelwerte Kardiomyozyten-Durchmesser des rechten Ventrikels der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ (MT) - versus FVBN Dsg2$^{wt/wt}$ (WT) –Mäuse 27-31 Wochen: unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0,0952; **B**: Kardiomyozyten-Durchmesser der rechten Ventrikel der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- versus FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Mäuse 27-31 Wochen: unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: <0,0001.

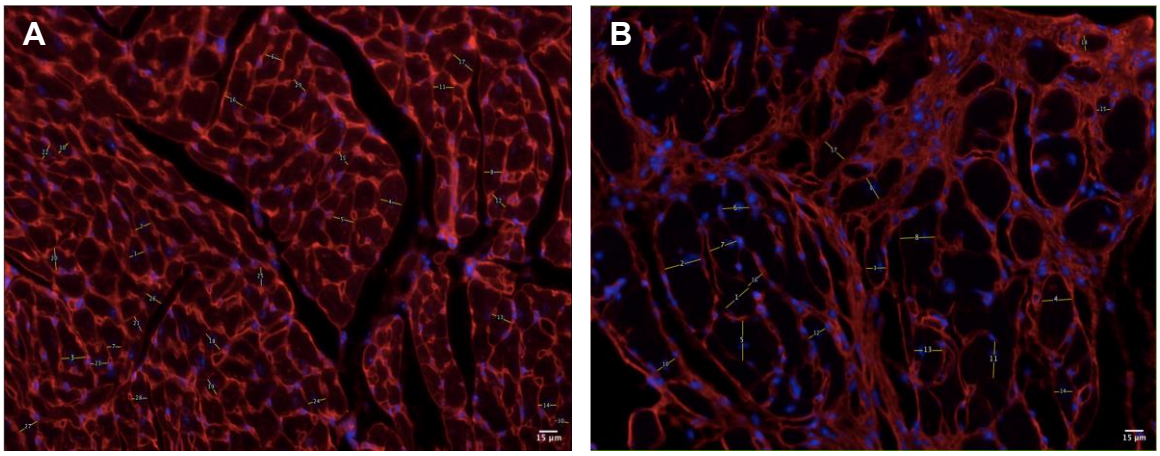


Abbildung 5.32: Linker Ventrikel einer 30 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$- (**A**) und einer 31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**B**); WGA-TRITC-Immunfluoreszenz (rot) und DAPI-Kernfärbung (blau). **A**: linksventrikuläre Kardiomyozytendurchmesser eines wildtypischen Kontrolltiers. **B**: hypertrophe Kardiomyozyten im Bereich des linken Ventrikels einer FVBN Dsg2-Mutante. Maßstab 15 µm.

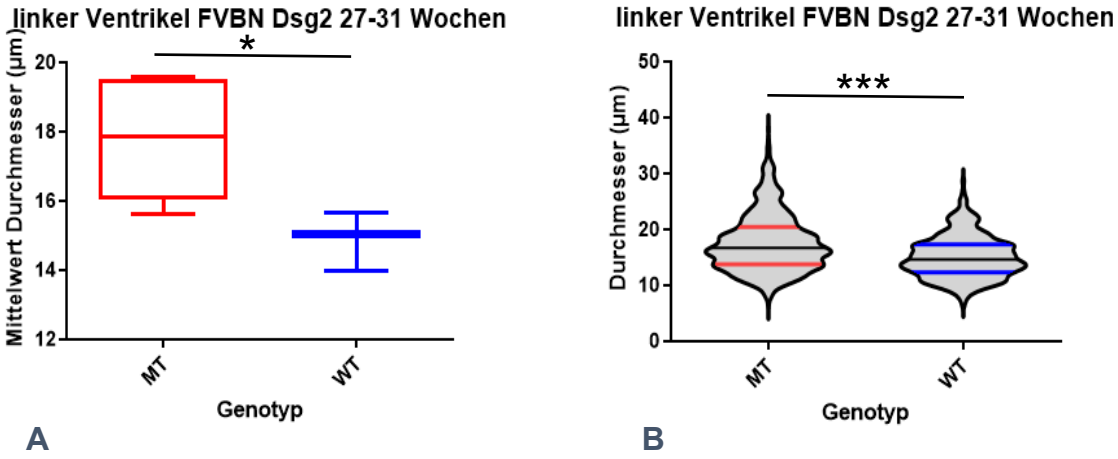


Abbildung 5.33: **A**: Mittelwerte Kardiomyozyten-Durchmesser des linken Ventrikels von FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ (MT)- versus FVBN Dsg2$^{wt/wt}$ (WT)-Mäusen im Alter von 27-31 Wochen: unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0,0476; **B**: Kardiomyozyten-Durchmesser der linken Ventrikel der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- versus FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Mäuse im Alter von 27-31 Wochen: unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: <0,0001

5.4 Analyse der kardialen mRNA-Expression der 29-31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der qRT-PCR-Analysen dargestellt. Mithilfe der qRT-PCR wurde die kardiale mRNA-Expression im linken und rechten Ventrikel der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- und Dsg2$^{wt/wt}$-Mäuse der Altersklasse 29-31 Wochen bestimmt. Wir untersuchten die mRNA-Expression der kardialen Stress- und Hypertrophiemarker B-Typ natriuretisches Peptid (BNP), Galektin-3 (Lgals3) und Growth and differentiation factor 15 (GDF15).

5.4.0 BNP mRNA-Expression

BNP/NT-pro BNP ist ein kardialer Stressmarker und wird im klinischen Alltag als Goldstandard-Biomarker in der Diagnostik der Herzinsuffizienz und des akuten Koronarsyndroms verwendet. Der wichtigste Stimulus für die kardiale Sekretion von BNP/NT-pro BNP ist die Dehnung der Kardiomyozyten. Diese korreliert mit dem resultierenden Anstieg der Peptidkonzentration im Plasma. Darüber hinaus wird die Freisetzung von BNP auch durch Hormonaktivierung (Katecholamine, Angiotensin II, Endothelin) sowie durch Hypoxie ausgelöst. Im Normalzustand ist die kardiale Sekretion und Plasmakonzentration von NT-proBNP sehr niedrig. Durch Dehnung der ventrikulären Kardiomyozyten, z.B. bei einer Herzinsuffizienz oder durch lokalisierte Herzmuskelzelldehnung, Gewebehypoxie nach einem Myokardinfarkt, wird die Produktion und Sekretion von BNP aktiviert (Hall 2005). Mittels qRT-PCR wurde die mRNA-Expression von BNP im linken und rechten Ventrikel der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- mit den FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Mäusen verglichen. Die BNP mRNA-Expression im rechten Ventrikel der 29-31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse war im Vergleich zu den gleichaltrigen FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Mäusen signifikant erhöht (unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0,0411, Abbildung 5.34 A). Die BNP-Expression im linken Ventrikel zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Genotypen (unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0,5887, Abbildung 5.34 B).

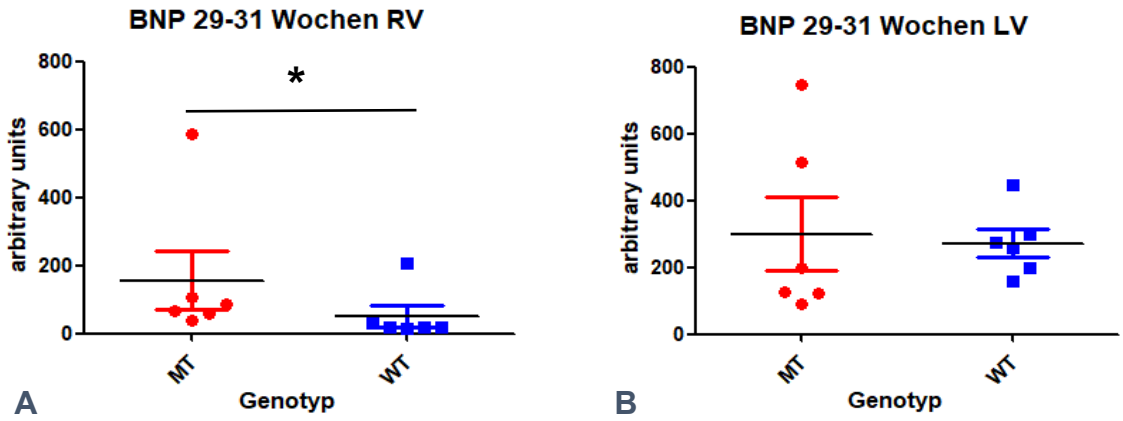


Abbildung 5.34: **A-B**: BNP-mRNA-Expression in 29-31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ (MT)- und FVBN Dsg2$^{wt/wt}$ (WT)-Mäusen. **A**: rechter Ventrikel (RV), unpaired Mann-Whitney T-Test: p-Wert = 0,0411. **B**: linker Ventrikel (LV), unpaired Mann-Whitney T-Test: p-Wert = 0,5887.

5.4.1 Galektin-3 (Lgals3) mRNA-Expression

Lgals3 ist ein beta-Galaktosid bindendes Protein, welches hauptsächlich intrazellulär von entzündlichen Zellen wie Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Mastzellen sowie Fibroblasten exprimiert wird und in vielen Prozessen wie z.B. Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zelladhäsion, Apoptose Inflammation und Tumorgenese eine Rolle spielt (Kim et al. 1999, Radosavljevic et al. 2012). Eine Hochregulation von Lgals3 wird u.a. im Rahmen von Gewebeumbau-Prozessen bei einer Kardiomyozyten-Hypertrophie beobachtet (Sharma et al. 2004, Liu et al. 2009). Vorherige Studien haben gezeigt, dass die Expression von Galektin 3 insbesondere bei Ratten, die im kurzfristigen Verlauf eine kardiale Dekompensation entwickeln, erhöht ist (Sharma et al. 2004). Somit kann Lgals 3 als prognostischer Marker für die Entstehung einer Herzinsuffizienz und ggf. als Prädiktor für die Langzeitmortalität bei Patienten mit akuter Herzinsuffizienz betrachtet werden (de Boer et al. 2009, Sherwi et al. 2012). Eine Überexpression von Lgals3 führt zur Aktivierung des TGF-beta/Smad3-Signalwegs, welcher eine Aktivierung und Proliferation kardialer Fibroblasten induziert, die wiederum zu einer übermäßigen Sekretion von Kollagen Typ I und daraus resultierender ventrikulärer Dysfunktion führt (Lala et al. 2018). Um Rückschlüsse über die kardiale mRNA-Expression von Lgals3 bei FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen zu ziehen, führten wir qRT-PCRs durch (Abbildung 5.35). Die

rechtsventrikuläre Lgals3 mRNA-Expression der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse war im Vergleich zu der wildtypischen Kontrollgruppe signifikant erhöht (unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0,0222). Die linksventrikuläre Lgals3 mRNA-Expression zeigte wiederum keine statistisch signifikante Erhöhung (unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0,1690).

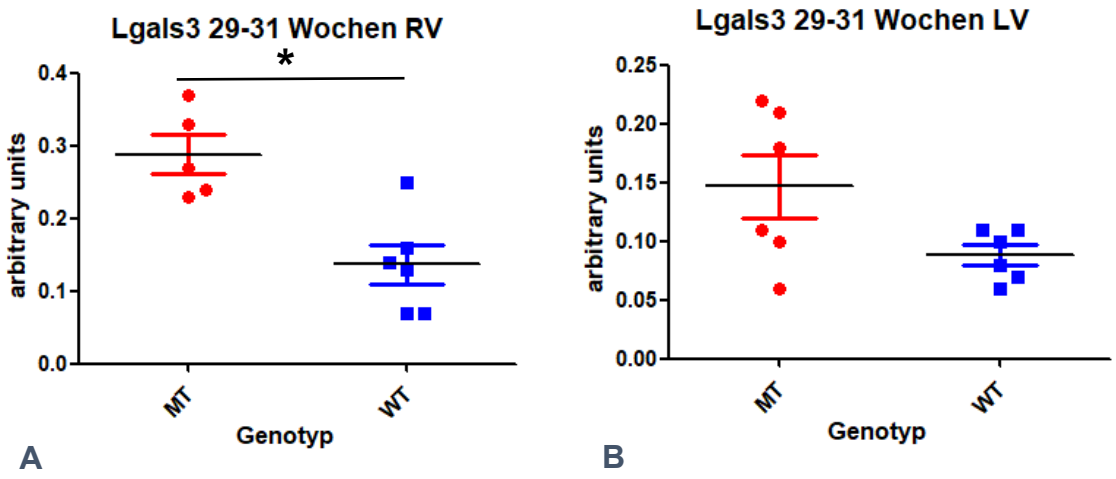
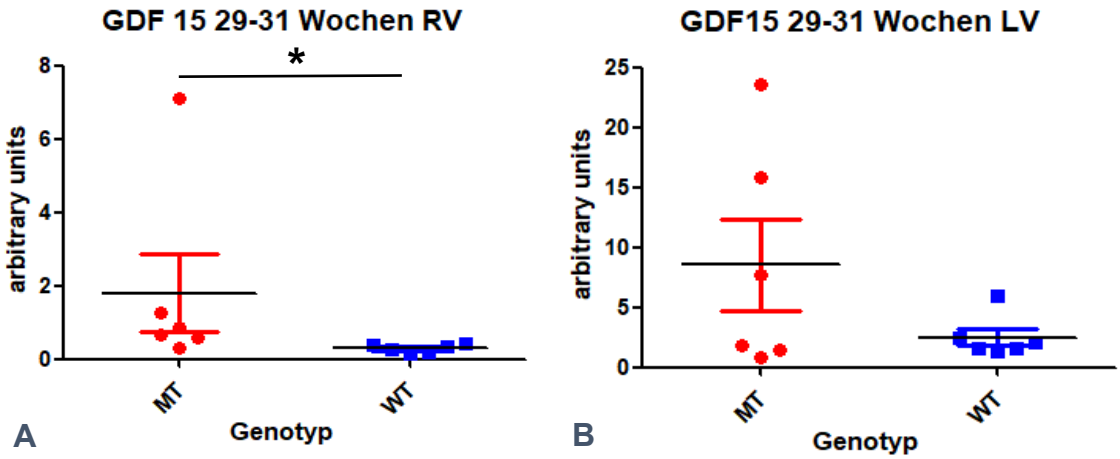


Abbildung 5.35: **A-B**: Lgals3-mRNA-Expression in 29-31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ (MT)- und FVBN Dsg2$^{wt/wt}$ (WT)-Mäusen. **A**: rechter Ventrikel (RV), unpaired Mann-Whitney T-Test: p-Wert = 0,0222. **B**: linker Ventrikel (LV), unpaired Mann-Whitney T-Test: p-Wert = 0,1690.

5.4.2 GDF15 mRNA-Expression

GDF15 ist ein Zytokin der TGF-β Superfamilie, welches u.a. nach zellulärem Stress, mechanischer Dehnung und im Rahmen entzündlicher Prozesse hochreguliert wird. Vorherige Studien an einem Rattenmodell haben gezeigt, dass GDF15 nach einem akuten Myokardinfarkt überexprimiert wird (Rochette et al. 2021). GDF 15 ist ein Marker für Herzversagen beim Menschen und hat antihypertrophe und kardioprotektive Wirkungen (Chow et al. 2017). Die mRNA-Expression von GDF 15 im rechten Ventrikel der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse war im Vergleich zu den FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Mäuse signifikant erhöht (unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0,0152, Abbildung 5.36 A). Die linksventrikuläre GDF 15 mRNA-Expression zeigte im Gegensatz dazu keinen signifikanten Unterschied (unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0,5887, Abbildung 5.36 B).



Eine Untersuchung der Proteinexpression in der Altersklasse 10-14 Wochen

Abbildung 5.36: **A-B**: GDF15 mRNA-Expression in 29-31 Wochen alten FVBN $Dsg2^{mt/mt}$ (MT)- und FVBN $Dsg2^{wt/wt}$ (WT) Herzen **A**: rechter Ventrikel (RV), unpaired Mann-Whitney T-Test: p-Wert = 0,0152. **B**: linker Ventrikel (LV), unpaired Mann-Whitney T-Test: p-Wert = 0,5887.

wurde im Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt und sollte zukünftig ergänzt werden, um Rückschlüsse über die Krankheitsentwicklung auf molekularer Ebene ziehen zu können.

5.5 Histologischer und immunhistochemischer Nachweis von Immunzellen in der akuten Phase der AC

5.5.0 Histologische Färbungen

Der Kardiomyozyten-Verlust ist das pathogene Ereignis, welches eine Entzündungsreaktion in Dsg2$^{mt/mt}$ Mäusen auslöst, wobei die Inflammation einen zusätzlichen Treiber der AC-Progression darstellt (Basso C. et al. 1996, Campian M.E. 2010, Lubos et al. 2020). Um die kardiale Entzündungsreaktion in den FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen systematisch in Bezug auf die verschiedenen Krankheitsstadien zu untersuchen, führten wir HE-, Azan- und Kossa-Übersichtsfärbungen durch. Zur weiteren Charakterisierung und Differenzierung der einwandernden Immunzellen in der akuten (10-14 Wochen) und chronischen progressiven Phase (26-31 Wochen), führten wir immunhistochemische Reaktionen auf Paraffinschnitten mit Antikörpern gegen CD3 und CD44 und auf Kryoschnitten mit Antikörpern gegen F4/80, CD206, CD11b und CD11c durch. Während im gesunden und *remote*-Myokard der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse der Altersklasse 10-14 Wochen ein Entzündungsinfiltrat fehlte, fanden sich im Bereich von frischen Läsionen Immunzellen. Ab Woche 14 fielen größere und organisierte Läsionen mit einem ausgeprägten zellulären Infiltrat aus Immunzellen, abgestorbenen Kardiomyozyten und Zelldebris auf. Diese Läsionen werden durch Immunzellstraßen umfasst. Eine makroskopisch auffällige 14 Wochen alte FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus zeigt fibrotisch umgebaute Läsionen im Atrium und im rechten Ventrikel, welche durch eine periläsionale Ansammlung von Immunzellen charakterisiert sind (Abbildung 5.37, 5.38). In der Altersklasse der 26-31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse besteht die periläsionale Durchsetzung des Herzgewebes durch Immunzellen fort. Die Anzahl an Entzündungszellennimmt allerdings zu Gunsten von Reparaturmechanismen im Sinne einer Fibrosierung des Myokards und Narbenbildung im Läsionsbereich ab. Während im Bereich von fibrotischen Läsionen mit nekrotischen und kalzifizierenden Kardiomyozyten ein dichtes Immunzellinfiltrat vorkommt, sind nicht kalzifizierende Läsionen durch eine nur spärliche Ansammlung an Immunzellen charakterisiert (Kant et al. 2012). Eine bereits fibrotisch umgebaute Läsion im Bereich des rechten Ventrikels einer 31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus ist durch ein periläsionales zelluläres Infiltrat ummauert (Abbildung 5.39). Ähnlich kommt in Abbildung 5.40 ein perivaskulär lokalisiertes Entzündungsinfiltrat in einem fibrotisch durchsetzen Papillarmuskel im Bereich des linken Ventrikels einer 31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus vor.

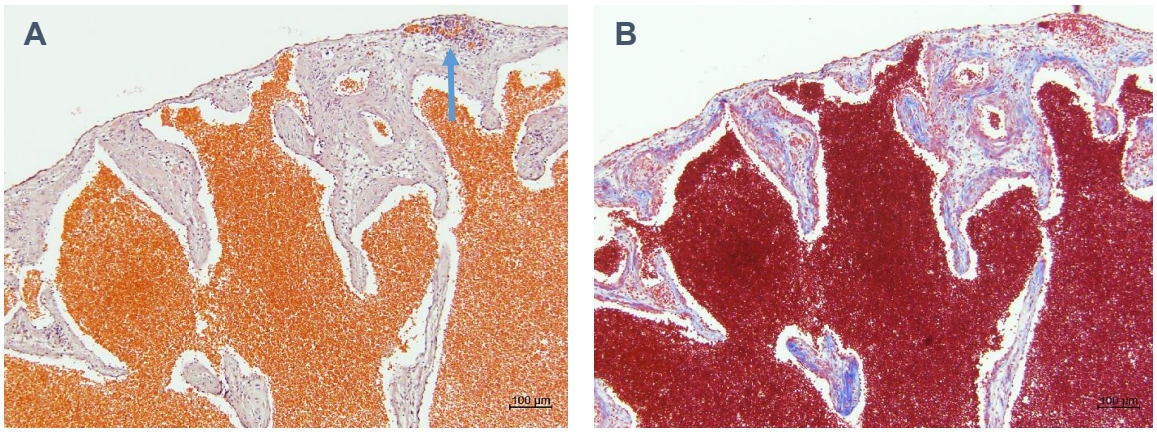


Abbildung 5.37: Atrium einer 14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**A**: HE-Färbung; **B**: Azan-Färbung). Dichtes Infiltrat im Bereich einer bereits fibrotisch umgebauten Läsion (hellblauer Pfeil). **A, B** Maßstab 100 µm

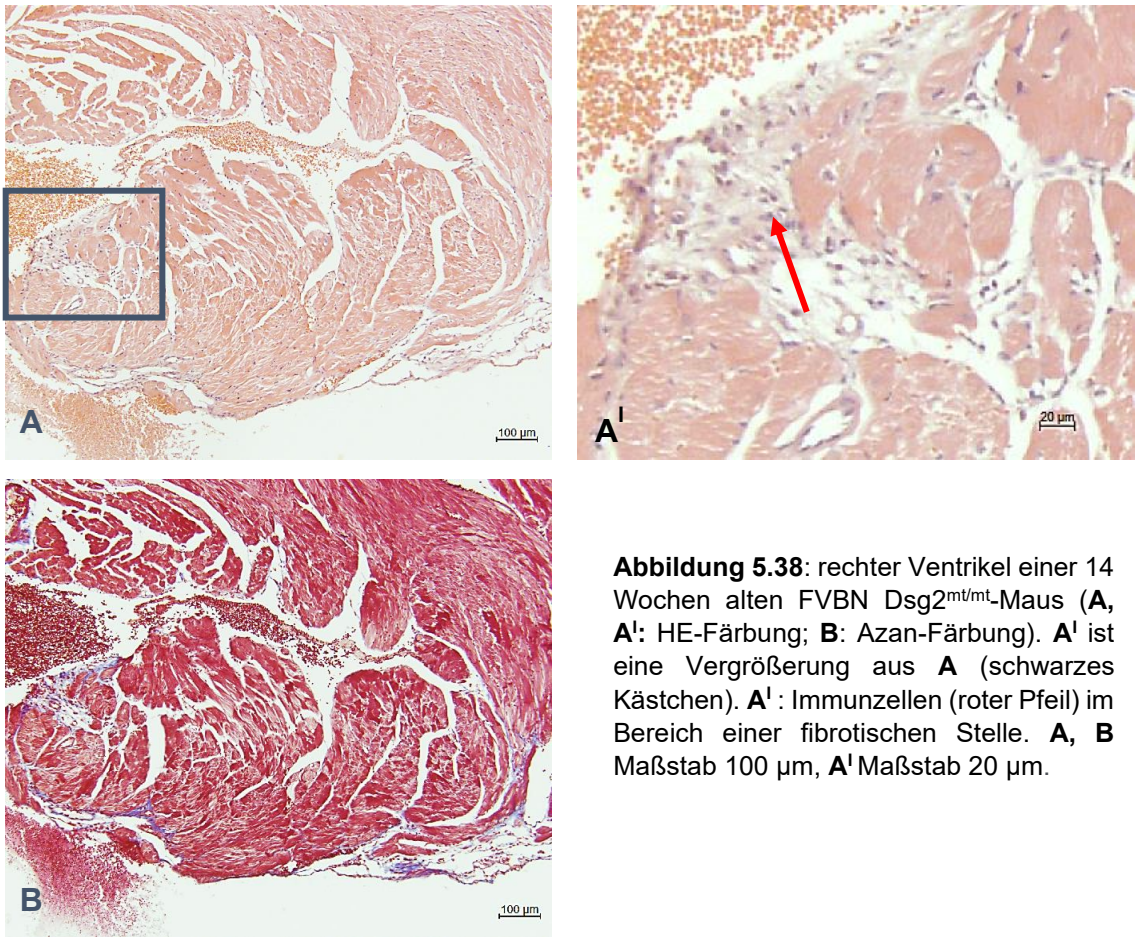


Abbildung 5.38: rechter Ventrikel einer 14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**A, A'**: HE-Färbung; **B**: Azan-Färbung). **A'** ist eine Vergrößerung aus **A** (schwarzes Kästchen). **A'** : Immunzellen (roter Pfeil) im Bereich einer fibrotischen Stelle. **A, B** Maßstab 100 µm, **A'** Maßstab 20 µm.

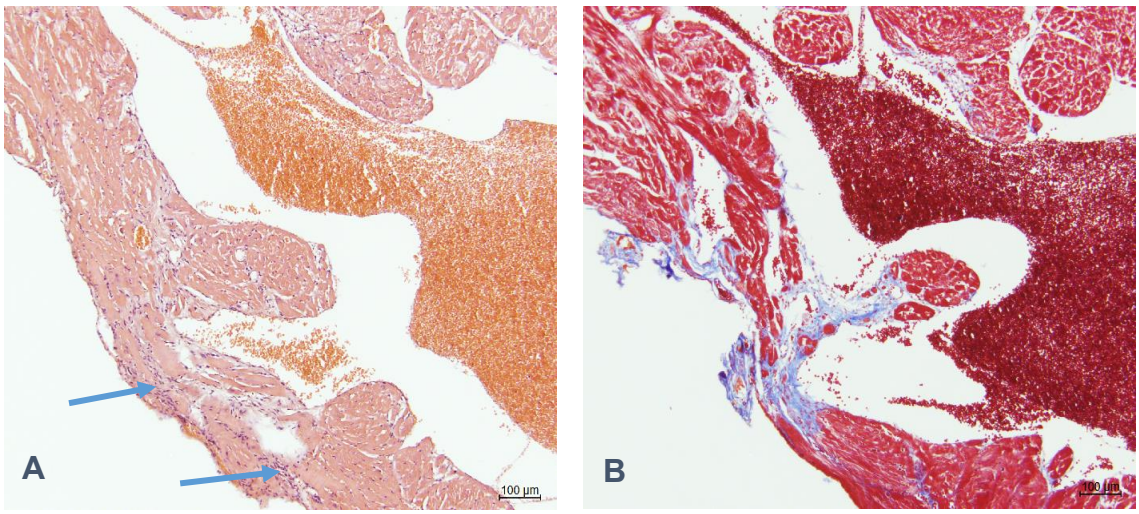


Abbildung 5.39: Rechter Ventrikel einer 31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**A**: HE-Färbung; **B**: Azan-Färbung). Dichtes Immunzellinfiltrat an im Bereich einer bereits fibrotisch umgebauten Läsion (**A**, hellblaue Pfeile). **A, B** Maßstab 100 µm

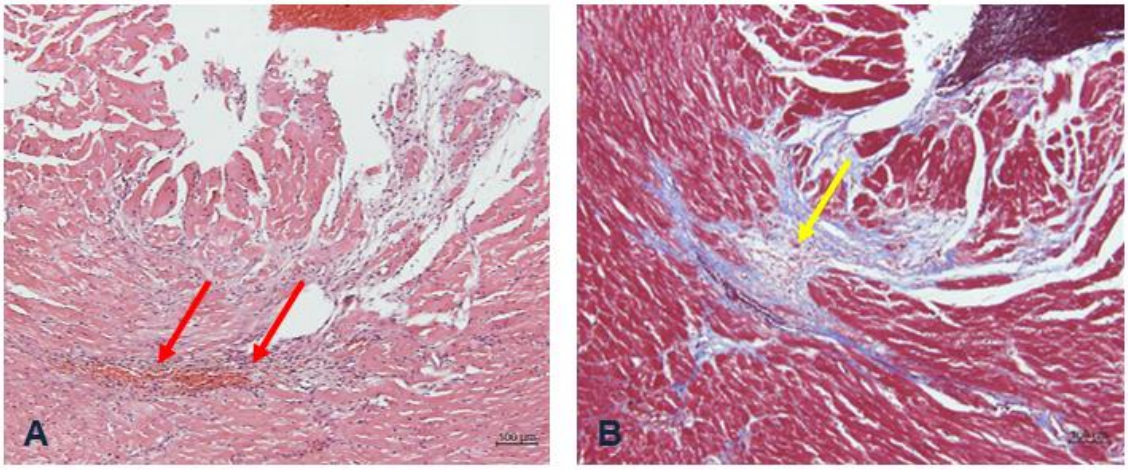


Abbildung 5.40: linker Ventrikel einer 31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ Maus (**A:** HE-Färbung; **B**: Azan-Färbung). Dichtes Ansammlung vonn Immunzellen im Gefäßlumen und perivaskulär (rote Pfeile) in direkter Nachbarschaft zu einem bereits durch Bindegewebe durchsetzen Papillarmuskel (gelber Pfeil) **A, B** Maßstab 100 µm.

5.5.1 Lokalisation von CD44-positive Immunzellen

CD44 (cluster of differentiation 44) ist ein Zelladhäsionsmolekül, welches auf der Oberfläche von Immunzellen exprimiert wird und als Pan-Leukozyten-Marker betrachtet werden kann. CD44 ist für die Vermittlung der Adhäsion an Hyaluronan, ein Glykosaminoglykan der extrazellulären Matrix, verantwortlich und spielt eine wesentliche Rolle in der Extravasation aktivierter Leukozyten im

Rahmen von Entzündungsprozessen (Siegelman et al. 1999). Darüber hinaus ist das CD44-Oberflächenmolekül u.a. in Prozessen wie Embryogenese, Prothymocyten-Migration und Tumorgenese involviert (Borland et al. 1998). Wir führten immunhistochemische Reaktionen mit einem rat anti-CD44-Antikörper durch und werteten diese qualitativ aus. Im Myokard der 10-14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse zeigte sich ein Infiltrat von CD44+ Zellen im Läsionsbereich. Auch in Läsions-freien Bereichen waren vereinzelte CD44+ Zellen zu finden. Eine besonders große Anzahl an CD44+ Zellen befand sich im Bereich der Atrien der 10-14 aber auch der 26-31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Herzen (Abbildungen 5.41, 5.42). Im ventrikulären Myokard der 27-31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse kam ebenso, wenn auch in einem deutlich reduzierten Ausmaß, eine periläsionale Leukozyteninfiltration (CD44+ Zellen) zur Darstellung (Abbildung 5.43). Neben kalzifizierenden Läsionen ließen sich wenige CD44+ Zellen anfärben (Abbildung 5.44). FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Mäuse beider Altersklassen wiesen vereinzelte CD44+ Zellen auf. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine Infiltration durch CD 44+ Zellen eine wichtige Rolle in der akuten Läsionsbildung der AC spielt.

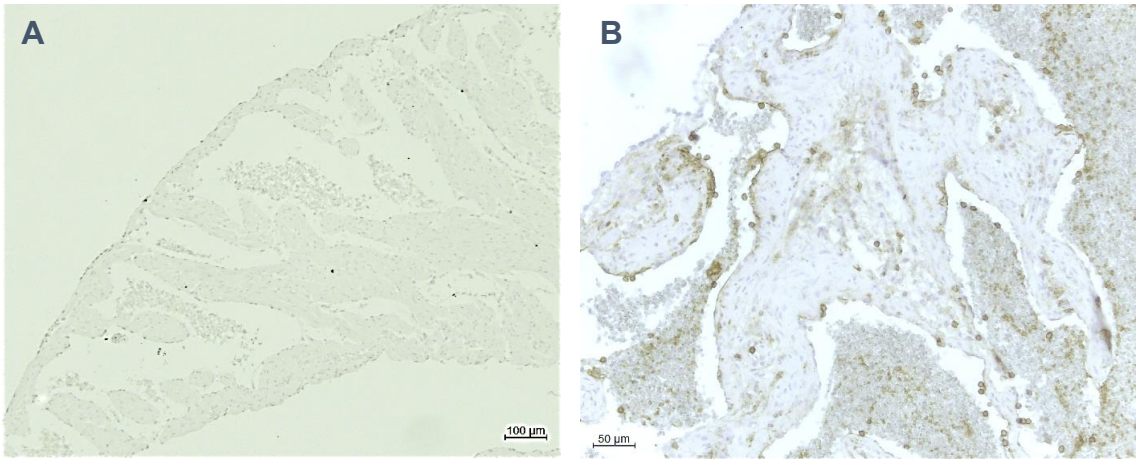


Abbildung 5.41: Lokalisation von CD44+ Immunzellen im Atrium einer repräsentativen 12 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus (**A**) und einer 14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**B**). **A**: Das Atrium des wildtypischen Kontrolltieres zeigt kaum CD44+ Zellen. **B**: dichtes Immunzellinfiltrat (CD 44+Zellen) im Bereich der läsionsdurchzogenen atrialen Wand. **A**: Maßstab 100 µm, **B**: Maßstab 50 µm.

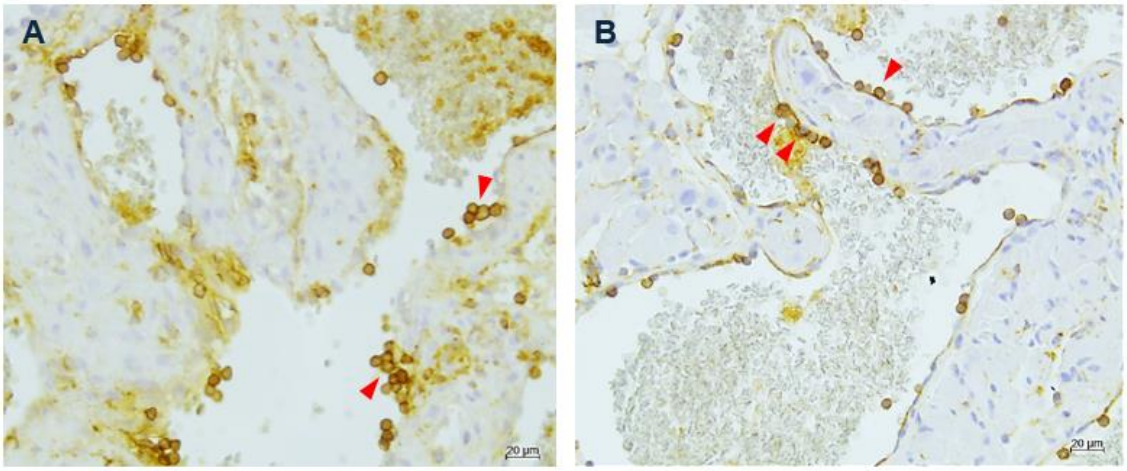


Abbildung 5.42: CD 44 positive Zellen im Atrium einer 14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- (**A**) und einer 27 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**B**). Die Atrien der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ Mäuse sind stark betroffen. Ansammlung von CD44+ Immunzellen entlang einer Läsion (Pfeilspitzen). **A, B**: Maßstab 20 µm.

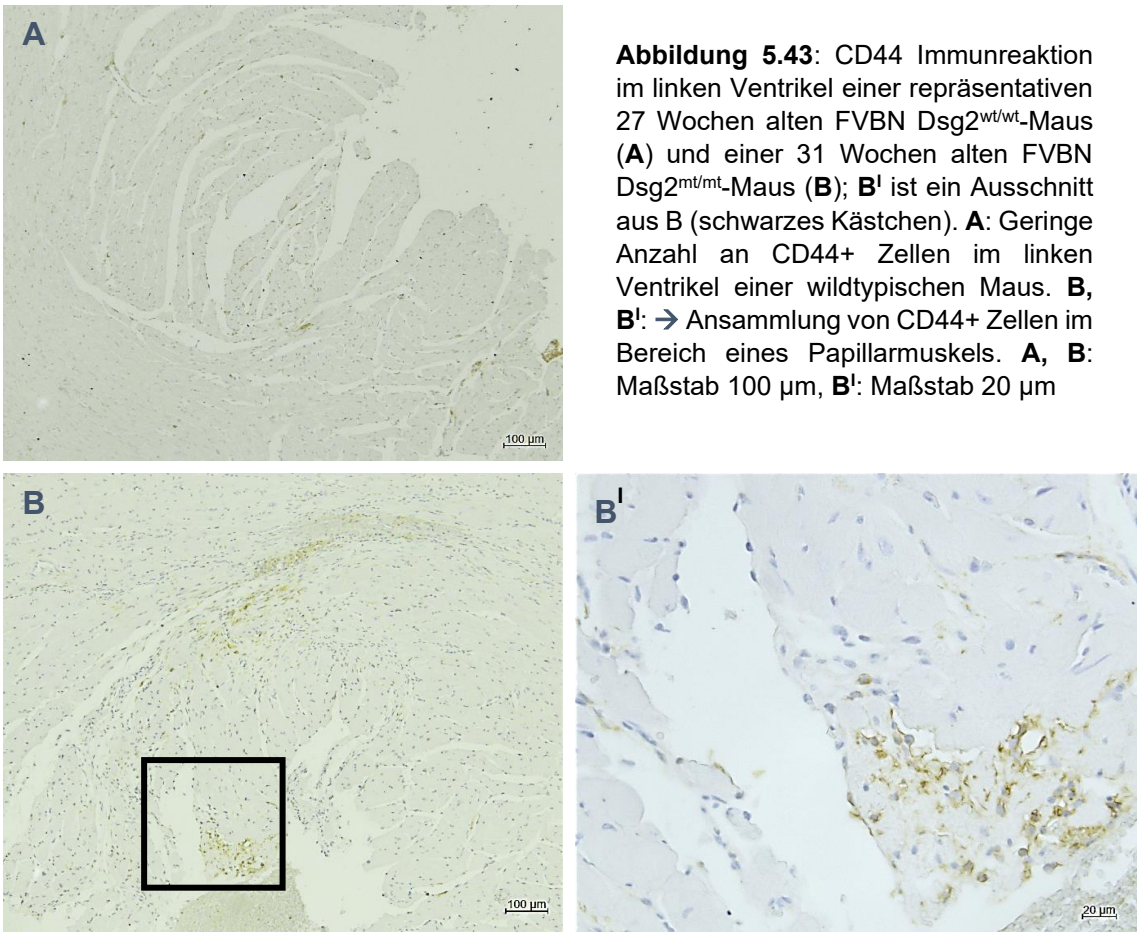


Abbildung 5.43: CD44 Immunreaktion im linken Ventrikel einer repräsentativen 27 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus (**A**) und einer 31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**B**); **B^{I}** ist ein Ausschnitt aus B (schwarzes Kästchen). **A**: Geringe Anzahl an CD44+ Zellen im linken Ventrikel einer wildtypischen Maus. **B, B^{I}**: → Ansammlung von CD44+ Zellen im Bereich eines Papillarmuskels. **A, B**: Maßstab 100 µm, **B^{I}**: Maßstab 20 µm

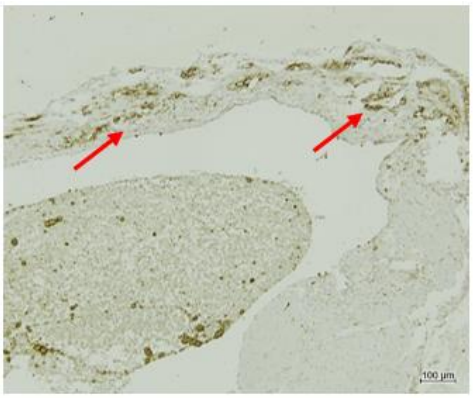


Abbildung 5.44: CD44+ Immunzellen im rechten Ventrikel einer 14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus im Bereich einer Kalzifikation (rote Pfeilel). Maßstab 100 µm.

5.5.2 Lokalisation von CD3-positive Immunzellen

CD3 ist in Oberflächenmolekül, welches auf reife T-Lymphozyten exprimiert wird und mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) als CD3-TCR-Komplex eine wesentliche Rolle in der Antigen Erkennung und Auslösung einer Immunantwort spielt (Rojo et al. 2008). CD3 kann als Marker für reife T-Lymphozyten betrachtet werden. Wir führten immunhistochemische Reaktionen mit einem rabbit anti-CD3-Antikörper durch und werteten die Ergebnisse qualitativ aus.

CD3+ Zellen waren nur selten im Myokard vertreten. In der Altersklasse der 10-14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse konnten vereinzelte CD3+ Zellen vor allem im atrialen Myokard beobachtet werden. Im Gegensatz dazu, befanden sich im Bereich reifer Narben (Alterskasse 27-31 Wochen) nur wenige T-Lymphozyten. Ebenso kamen im Gewebe gesunder Kontrolltieren kaum CD3+ Zellen vor (Abbildung 5.45).

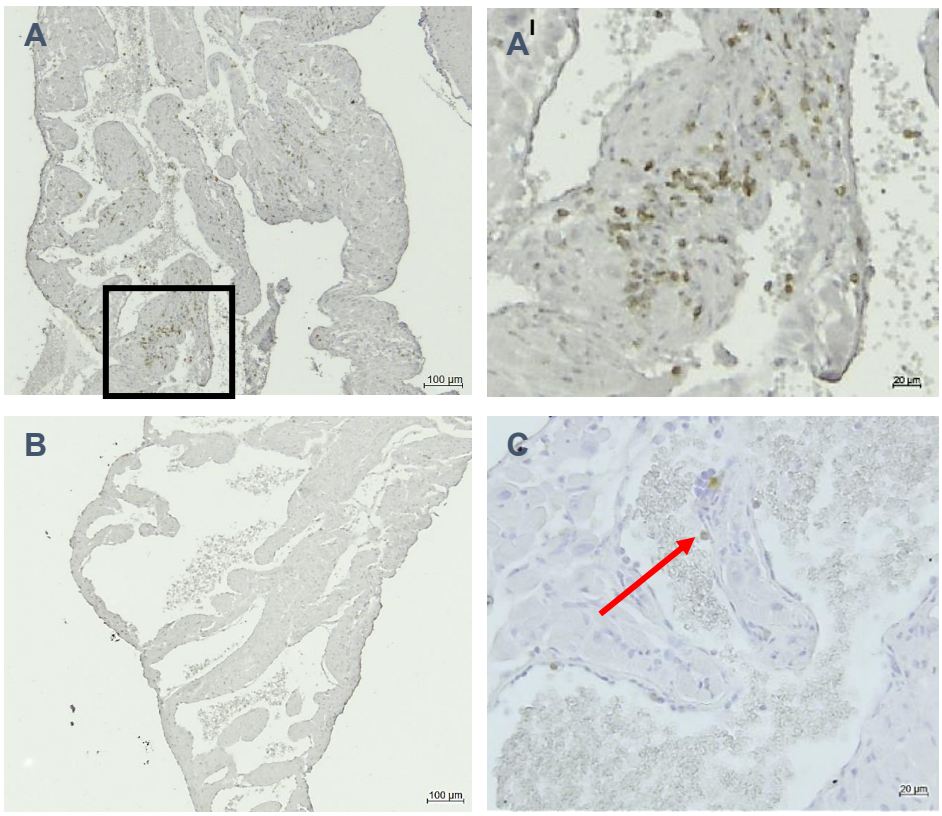


Abbildung 5.45: CD 3 positive Zellen im Atrium einer repräsentativen 14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**A, A^{I}**), einer 12 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus (**B**) und einer 27 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**C**). **A**: Ansammlung an CD3+ Immunzellen im Bereich einer frischen Läsion; **A^{I}** stellt eine Vergrößerung aus **A** dar (schwarzes Kästchen). **B**: keine CD3+ Zellen im Atrium eines wildtypischen Kontrolltieres. **C**: vereinzelte CD3+ Immunzellen im Bereich einer älteren Mutante (roter Pfeil). **A, B**: Maßstab 100 µm. A^{I}, C: Maßstab 20 µm.

5.5.3 Lokalisation von F4/80-positive Immunzellen

F4/80 ist ein Zelloberflächen-Glykoprotein, das zur Familie der EGF-TM7-Proteine gehört, welche wiederum eine Untergruppe innerhalb der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) bilden. Der F4/80-Rezeptor wird ausschließlich auf der Oberfläche von murinen Makrophagen exprimiert und dient als Marker für reife Gewebe-spezifische Makrophagen (van den Berg & Kraal 2005). Die genaue Funktion ist unklar, rezente Studie habe jedoch bewiesen, dass das F4/80-Molekül eine wichtige Rolle in der Antigen-spezifischen Toleranzinduktion spielt. Insbesondere wird vermutet, dass das F4/80-Glykoprotein in der Expression von Antigen-spezifischen regulatorischen CD8+ T-Zellen, die für die periphere Immuntoleranz verantwortlich sind, involviert

ist (Lin et al 2010). Vorherige Studien an murinen Dsg2$^{mt/mt}$-Herzen (Lubos et al. 2020) haben gezeigt, dass in der chronischen Phase der AC-Erkrankung, neutrophile Granulozyten und T-Zellen durch Makrophagen ersetzt werden und insbesondere F4/80+ und CD11b+ Zellen die Mehrheit an entzündlichen Zellen in Bereich von organisierten Läsionen ausmachen. Wir führten immunhistochemische Reaktionen mit dem F4/80-Antikörper auf Kryoschnitten durch, um die Makrophageninfiltration in FVBN Dsg2$^{wt/wt}$- und Dsg2$^{mt/mt}$- Mäusen der Altersklasse 27-31 Wochen darzustellen. F4/80+ Zellen kamen sowohl im Bereich rein fibrotischen Läsionen als auch im Bereich von Läsionen mit nekrotischen und kalzifizierten Kardiomyozyten vor. Abbildung 5.46 zeigt beispielhaft den rechten (A) und linken (B) Ventrikel einer 30 Wochen alte FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus im Vergleich zum rechten (A^{I}) und linken (B^{I}) Ventrikel einer 30 Wochen alte FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus. Im rechten Ventrikel der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus kommt eine Infiltration durch F4/80+ Makrophagen im Läsionsbereich zur Darstellung. Ebenso lassen sich F4/80+ Makrophagen im Bereich einer kalzifizierenden Läsion im linken Ventrikel der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus anfärben. Vereinzelte gewebespezifische F4/80+ Makrophagen sind auch im Myokard der wildtypischen Kontrolltieren zu finden.

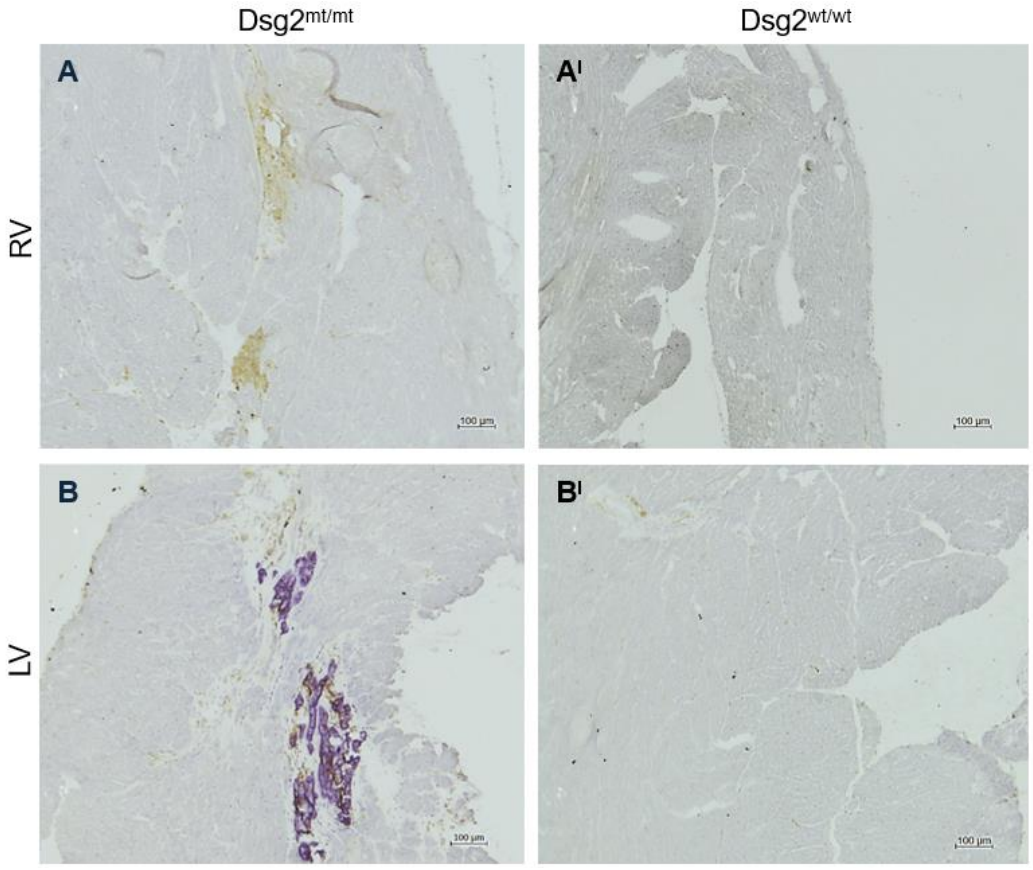


Abbildung 5.46: Nachweis von F4/80+ Makrophagen im rechten (**A, A^{I}**) und linken Ventrikel (**B, B^{I}**) einer repräsentativen 30 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**A, B**) und einer 30 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus (**A^{I}, B^{I}**). **A**: Vereinzelte F4/80+ Gewebe-spezifische Makrophagen im rechten Ventrikel einer FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus. **B**: Ansammlung an F4/80+ Makrophagen im Bereich von einer Läsion mit Kalzifikation (dunkelblau/lila angefärbte Areale) im linken Ventrikel einer FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus. **A^{I}, B^{I}** stellen jeweils den rechten und linken Ventrikel einer FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus dar. Maßstab 100 µm.

5.5.4 Lokalisation von CD 206-positive Immunzellen

CD206, auch als Mannose-Rezeptor (MR) bezeichnet, gehört zur Familie der C-Typ-Lektine (CLEC) und wird hauptsächlich von Makrophagen, unreifen dendritischen Zellen (DC) und Endothelzellen exprimiert. Der CD206-Rezeptor bindet selektiv glykosylierte Liganden und spielt eine wesentliche Rolle in der Antigen-Erkennung, -Internalisierung (Endozytose) und -Präsentation (East & Isacke 2002). CD206-gebundene Antigene werden in Endosomen internalisiert, von einem lysosomalen Abbau bewahrt und auf MHC-1-Komplexe präsentiert. Darüber hinaus wird dem CD206-Rezeptor eine Funktion in der Regulation der Makrophagenmigration zugeschrieben, da CD206-defiziente Makrophagen aus dem Knochenmark, eine verstärkte Migration aufweisen.

Zudem wird über den CD206-Rezeptor die Aktivität anderer Immunzellen reguliert. Insbesondere löst der Membran-gebundene CD206-Rezeptor eine Immuntoleranz zytotoxischer CD8+ T-Zellen aus, während das lösliche CD206-Molekül eine Makrophagen-induzierte Inflammationsreaktion stimuliert, beides durch Hemmung von CD45 (van der Zande et al. 2021). Kryoschnitte von 27-31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- und Dsg2$^{wt/wt}$-Mäusen wurden mit einem CD206 (rat)-Antikörper inkubiert und die Immunreaktion qualitativ ausgewertet. CD206+ Zellen ließen sich sowohl im Bereich des rechten und linken Ventrikels von FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- als auch im Myokard von FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Mäusen anfärben. Während CD206+ Zellen diffus im Myokard der wildtypischen Kontrolltieren vorkamen, zeigte sich bei den FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mausen eine Ansammlung an CD206+ Zellen im Läsionsbereich (Abbildung 5.47).

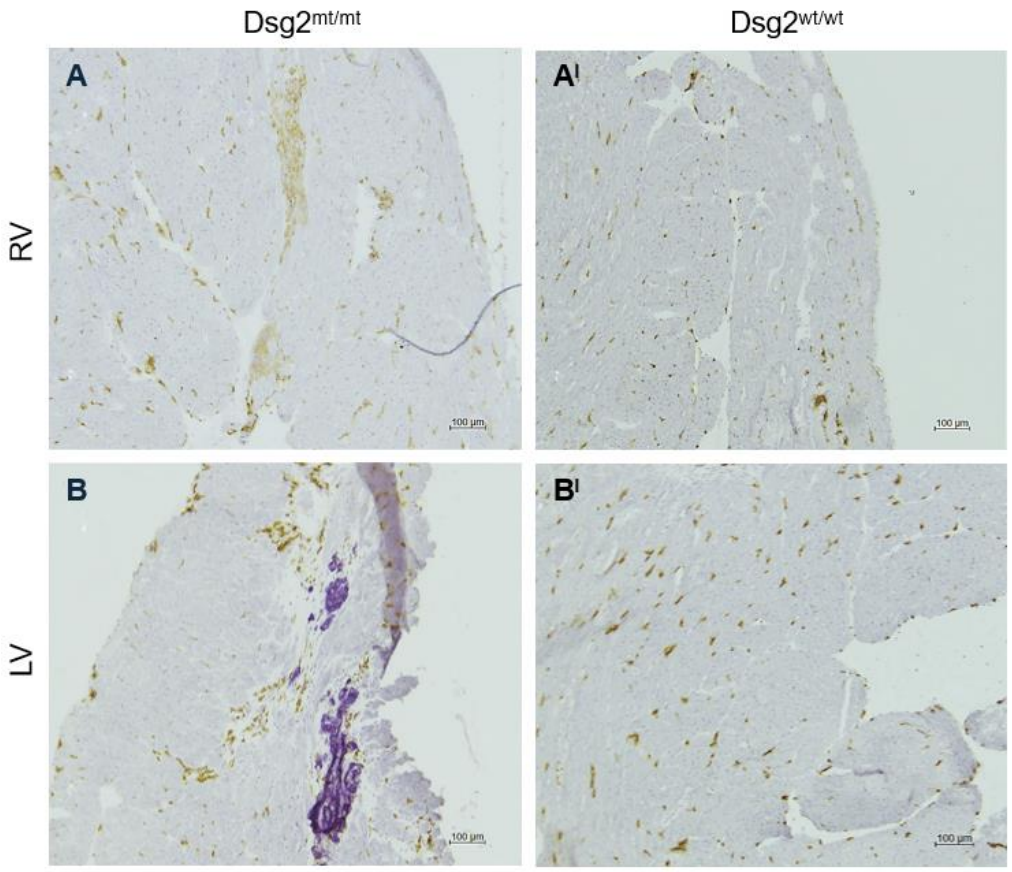


Abbildung 5.47: Lokalisierung von CD206+ Zellen im rechten (**A, A^{I}**) und linken Ventrikel (**B, B^{I}**) einer repräsentativen 30 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- (**A, B**) und einer 30 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus (**A^{I}, B^{I}**). **A:** CD206+ Immunzellen kommen im rechten Ventrikel einer FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ vor. **B**: CD206+ Immunzellen sind in der Nähe einer Läsion mit kalzifizierten Kardiomyozyten im linken Ventrikel einer FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus angesammelt. **A^{I}, B^{I}** stellen jeweils den rechten und linken Ventrikel einer FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus dar. CD206+ Zellen kommen diffus im gesamten Myokard vor. Maßstab 100 µm.

5.5.5 Lokalisation von CD11b- und CD11c-positive Immunzellen

CD11b (Integrin αM) ist ein Zelladhäsionsmolekül aus der Familie der Integrine, welches auf Zellen der myeloischen Linie wie Monozyten/Makrophagen, neutrophile und basophile Granulozyten sowie lymphoiden Zellen wie NK-Zellen und peritoneale B-1-Zellen exprimiert wird. αM (CD11b) und β-2 (CD18) bilden zusammen den Mac-1-Komplex (Makrophagen-1-Antigen), welcher verschiedene Liganden, darunter ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102) und Fibrinogen bindet. In zirkulierenden Leukozyten wird MAC-1 normalerweise in einer inaktiven Form exprimiert und durch Chemokinsignale aktiviert, wobei eine Leukozyten-Adhäsion an Endothelzellen vermittelt wird. MAC-1, auch als Komplementrezeptor 3 (CR3) bekannt, bindet iC3b und fördert die Phagozytose von opsonisierten Bakterien (Tanaka 2016). CD11c (cluster of differentation 11c, p150) ist ebenso ein Zelladhäsionsmolekül aus der Integrinsuperfamilie, welches hauptsächlich auf dendritische Zellen, aber auch Makrophagen/Monoyzten, NK- und Haar-Zellen exprimiert wird. CD11c spielt, wie CD11b, eine wesentliche Rolle in der Leukozytenadhäsion, durch Bindung an verschiedenen Liganden, wie u.a. ICAM-1 (Berin & Mayer 2013).

Wir führten immunhistochemische Reaktion mit CD11b und CD11c auf Kryoschnitten vom Herzgewebe der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- und Dsg2$^{wt/wt}$-Mäusen der Altersklasse 27-31 Wochen durch und werteten die Ergebnisse qualitativ aus. Wie bereits vorher erwähnt machen CD11b+ Zellen zusammen mit F4/80+ Makrophagen den Hauptanteil an Immunzellen im Myokard der 27-31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ Mäuse aus, während sich CD11c+ dendritische Zellen weniger anfärben ließen. CD11b- und auch CD11c-positiven Zellen werden im Bereich einer Läsion im rechten Ventrikel und einer Läsion mit kalzifizierenden Kardiomyozyten im linken Ventrikel einer 30 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus gefunden (Abbildung 5.48, 5.49). Bemerkenswert ist, dass die Anzahl der Immunzellen im strukturell nicht beeinträchtigten Myokard der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse nicht vom Myokard der wildtypischen Kontrolltiere abweicht.

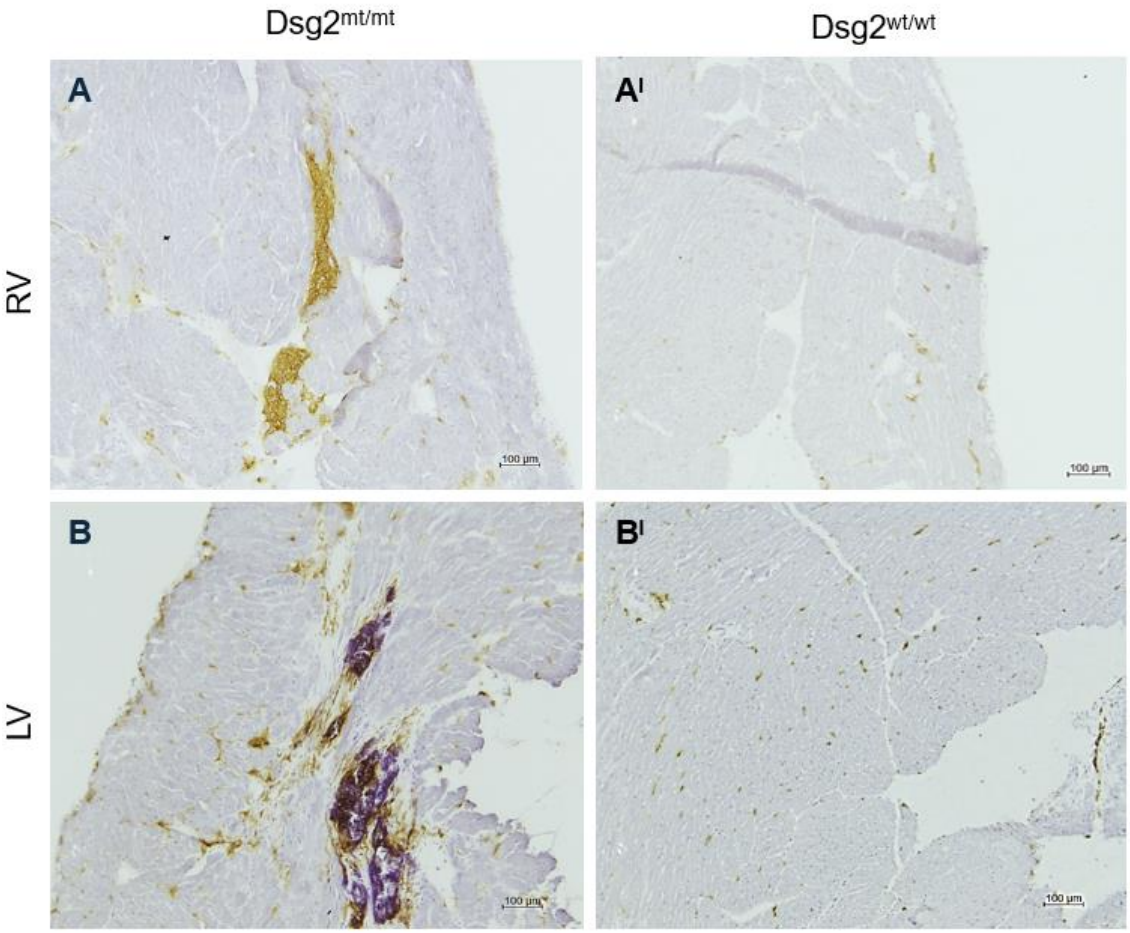


Abbildung 5.48: CD11b Immunreaktion im rechten (**A, A^{I}**) und linken Ventrikel (**B, B^{I}**) einer 30 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- (**A, B**) und einer 30 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus (**A^{I}, B^{I}**). **A**: Periläsionale Ansammlung an CD11b-positiven Immunzellen (braune gefärbte Zellansammlung oder Pfeile) im rechten Ventrikel einer FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus. **B**: CD11b+ Zellen (braun) in direkter Nachbarschaft zu einer kalzifizierenden Läsion (dunkelblau/lila angefärbte Areale) im linken Ventrikel einer FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus. **A^{I}, B^{I}** stellen diffus vorkommende CD11b+ Zellen jeweils im den rechten und linken Ventrikel einer FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus dar. Maßstab 100 µm.

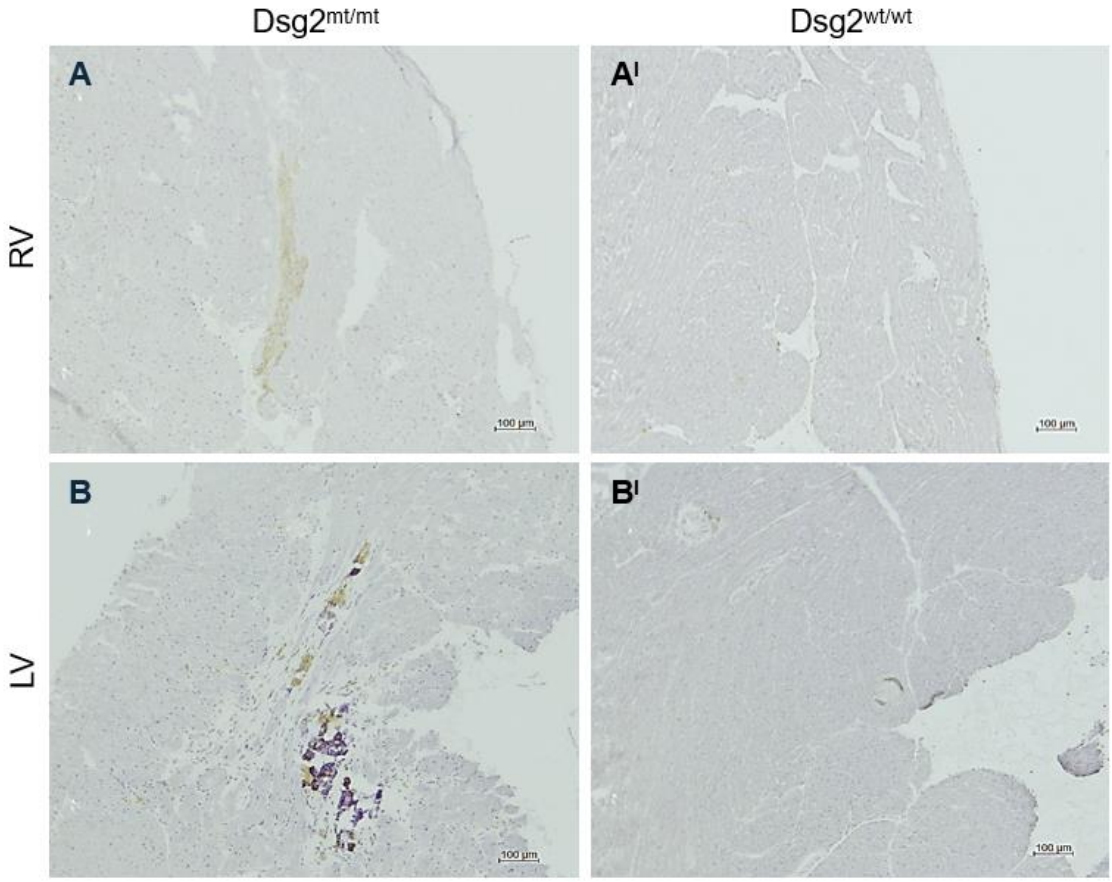


Abbildung 5.49: CD11c positive Immunzellen im rechten (**A, A^{I}**) und linken Ventrikel (**B, B^{I}**) einer 30 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- (**A, B**) und einer 30 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus (**A^{I}, B^{I}**). **A, B**: Im rechten und linken Ventrikel einer FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus zeigen sich periläsional CD11c+ Immunzellen. **A^{I}, B^{I}**: im rechten und linken Ventrikel einer FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus befinden sich kaum CD11c+ Zellen. Maßstab 100 µm.

5.6 Kardiale CD68 mRNA Expression

CD68 ist ein stark glykosyliertes Oberflächenprotein, welches zur Familie der LAMP (Lysosom-assoziierte-Membran-Glykoproteine) gerechnet wird und auf Makrophagen/Monozyten exprimiert wird. CD68 spielt in der Antigen-Präsentation und Prozessierung sowie in der Tumorgenese eine wesentliche Rolle (Chistiakov et al 2017). Um die Expression von Makrophagen/Monozyten im Myokard der FVBN Dsg2$^{wt/wt}$- und Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse zu analysieren, führten wir qRT-PCRs durch (Abb. 5.50). Dabei stellten wir eine signifikant erhöhte Expression der CD68 mRNA im rechten Ventrikel der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse der Altersklasse 29-31 Wochen im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen fest (unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0.0043, Abbildung 5.50 A). Die CD68 mRNA-Expression im linken Ventrikel der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse war im Gegensatz dazu nicht signifikant erhöht (unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0.5887, Abbildung 5.50 B). Diese Ergebnisse unterstreichen die überwiegende Beteiligung des rechten Ventrikels an der Entzündungsreaktion und stehen im Einklang mit der stärkeren Anfärbung der Immunzellmarker im Bereich des rechten Ventrikels der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse, wobei immunhistochemisch auch eine nicht zu vernachlässigende Affektion des linken Ventrikels aufgefallen ist.

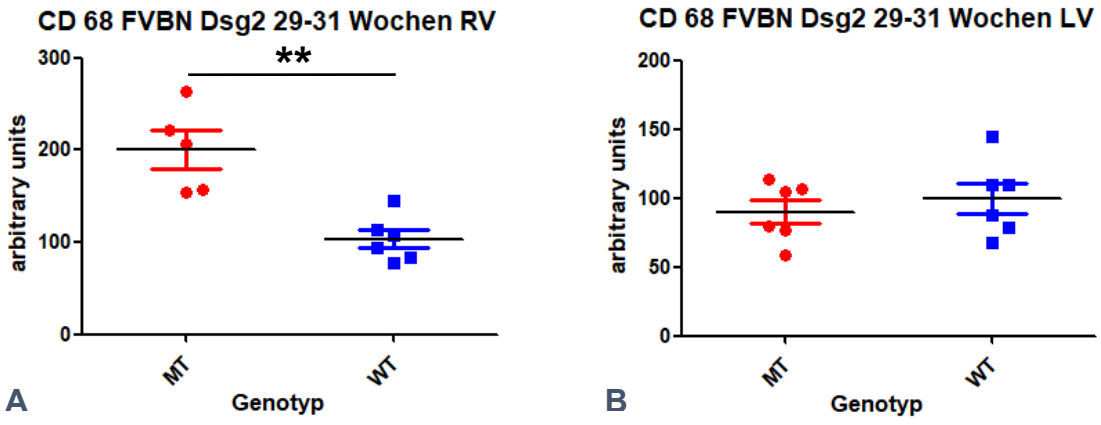


Abbildung 5.50: **A-B**: CD68 mRNA-Expression in 29-31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ (MT)- und FVBN Dsg2$^{wt/wt}$ (WT)-Mäusen. **A**: rechter Ventrikel, unpaired Mann-Whitney T-Test: p-Wert = 0,0043 **B**: linker Ventrikel, unpaired Mann-Whitney T-Test: p-Wert = 0,5887.

5.7 Die Extrazellularmatrix

Tenascin C (TNC) ist ein extrazelluläres Matrix-Glykoprotein, ein sog. matrizelluläres Protein, welches sowohl während physiologischen als auch während pathologischen Gewebeumbauprozessen wie Wundheilung und Tumorgenese exprimiert wird (Erickson 1993). Im Herz wird Tenascin C temporär begrenzt während der Embryogenese exprimiert und ist im gesunden erwachsenen Herzen kaum mehr nachweisbar. Unter pathologischen Bedingungen, die mit einer Entzündung und Fibrosierung einhergehen, wie beispielhaft beim Myokardinfarkt, Myokarditis, dilatativer Kardiomyopathie und Kawasaki-Krankheit, wird Tenascin C zeitlich und lokal begrenzt reexprimiert (Imanaka-Yoshida et al. 2003, Imanaka-Yoshida et al. 2004, Midwood et al. 2011). Beim Myokardinfarkt wird TNC innerhalb von 24 Stunden nach Ischämie-Beginn hochreguliert und vor allem periläsional, d. h. zwischen infarziertem und gesundem Gewebe, exprimiert. Die TNC mRNA-Expression erreicht an den Tagen 3-5 das Maximum und nimmt im Verlauf allmählich ab, sodass ab Tag 28 nach Infarkt keine TNC-Expression mehr nachweisbar ist (Imanaka-Yoshida et al. 2001). Der Zeitpunkt und die Lokalisation der TNC-Expression lassen vermuten, dass TNC an den frühen Prozessen der Entzündungs- und proliferativen Phase mit kardialem Umbau beteiligt ist (Matsui et al. 2023). Um die TNC-Produktion im Rahmen der AC zu untersuchen, wurde die TNC-Expression und Lokalisation mittels Immunhistochemie analysiert. Das Herzgewebe von FVBN $Dsg2^{wt/wt}$-Mäusen und das läsionsfreie Myokard von FVBN $Dsg2^{mt/mt}$-Mäusen beider Altersklassen zeigten keine TNC-positive Areale. Allerdings ließ sich bereits im Bereich von kleinsten Myokardläsionen der FVBN $Dsg2^{mt/mt}$-Mäuse der Altersklasse 10-14 Wochen eine TNC-Expression nachweisen. Im Myokard von FVBN $Dsg2^{mt/mt}$-Mäusen der Altersklasse 26-31 Wochen fielen großflächig TNC+ Areale auf. Das Myokard im Bereich einer Läsion mit umgebenden Entzündungsinfiltrat im Papillarmuskel einer 31 Wochen alten FVBN $Dsg2^{mt/mt}$-Maus färbte sich TNC+ an (Abbildung 5.51). Ebenso zeigt das atriale Myokard einer 27 Wochen und 14 Wochen alten FVBN $Dsg2^{mt/mt}$ Maus jeweils großflächigen TNC+ Areale (Abbildung 5.52). Kossa-positive Kalzifikationen, färbten sich ebenso TnC-positiv an. Diese Reaktionen werteten wir jedoch als falsch positiv, da eine Vielzahl von spezifischen Antikörpern und

auch non-immune Kontroll-Antikörper unspezifisch an diese kalzifizierten Stellen adhärieren.

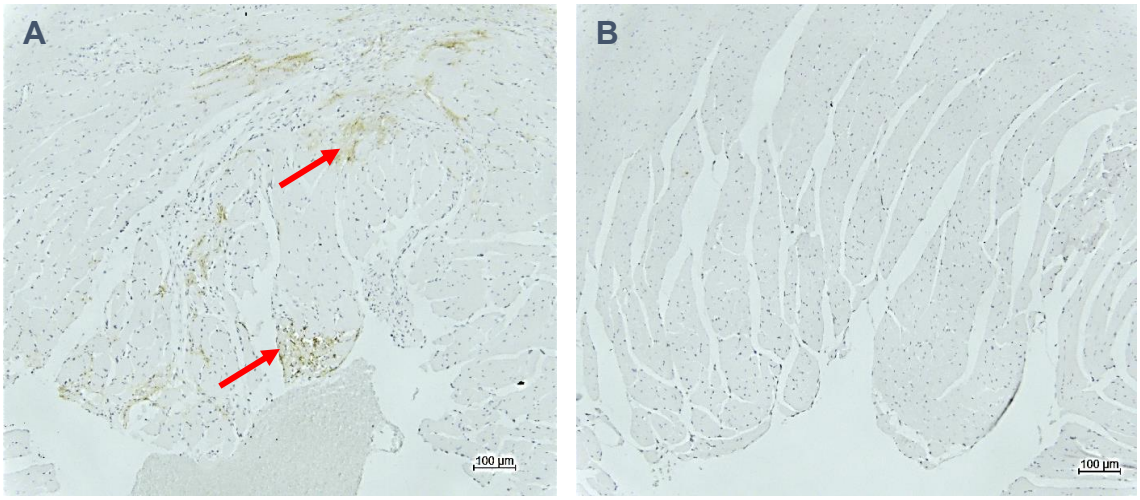


Abbildung 5.51: TnC-positive Areale im linken Ventrikel einer repräsentativen 31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**A**) und einer 30 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus (**B**). **A**: TnC-positives Interstititum im Bereich des Papillarmuskels (rote Pfeile). **B**: Der linke Ventrikel eines wildtypischen Kontrolltiers zeigt keine TnC-positive Areale. Maßstab 100 µm.

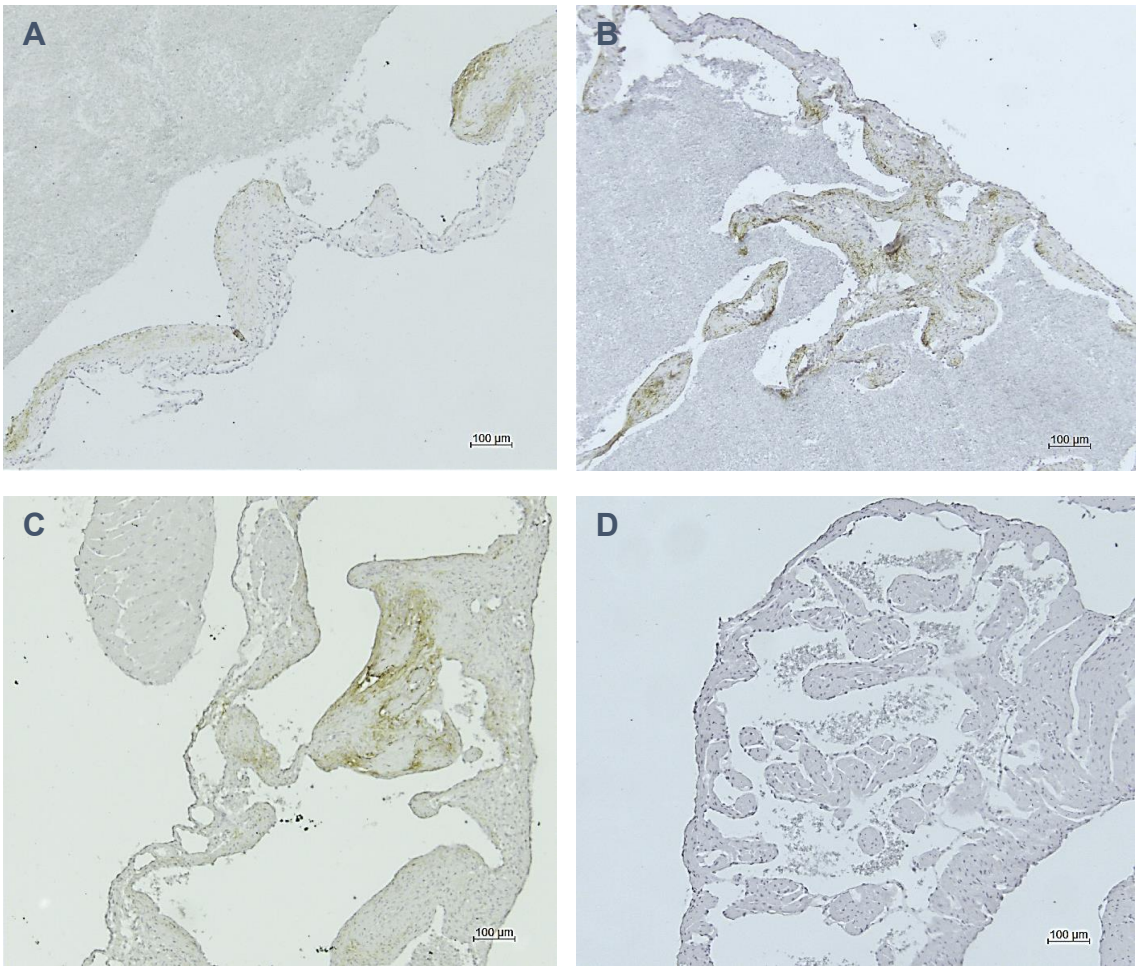


Abbildung 5.52: TnC-Immunreaktion im Atrium einer repräsentativen 27 Wochen alten (**A**), von zwei 14 Wochen alten (**B, C**) FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen und einer 12 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus (**D**). Periläsional ist das Interstititum TnC positiv. Das Atrium eines wildtyischen Kontrolltiers (**D**) zeigt keine TnC-positive Areale. Maßstab 100 µm.

5.8 TGF-β2 -mRNA Expression

TGF-β ist ein Zytokin aus der TGF (transforming growth factor) -β Superfamilie, welches eine entscheidende Rolle in der frühen Embryonalentwicklung und Organogenese spielt, aber auch an Prozessen wie der Immunüberwachung, Gewebereparaturmechanismen und Homöostase beteiligt ist. Eine Überexpression von TGF-β trägt zur Kollagenablagerung und Gewebefibrosierung bei. Es sind drei TGF-β Isoformen (β1, β2, β3) bekannt (Goumans M. et al. 2018). TGF-β stimuliert verschiedene Signalwege, die grob in SMAD- und no-SMAD-Signalwege unterteilt werden, und reguliert die Proteinexpression. Eine dysregulierte TGF-β Signalübertragung fördert u.a. eine Umwandlung von Fibroblasten in Myofibroblasten sowie eine übermäßige Ablagerung von Extrazellulärenmatrix, was zu einer Hyperplasie des Bindegewebes, Fibrose oder sogar zu einer erheblichen Organsklerose führt (Peng et al 2022). Wir analysierten mittels qRT-PCR die mRNA-Expression von TGF-β2 im rechten und linken Ventrikel der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- und FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Mäuse. Die TGF-β2 mRNA-Expression im rechten Ventrikel der 29-31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse ist im Vergleich zu den gleichaltrigen FVBN Dsg2$^{wt/wt}$ nicht signifikant erhöht (unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0,8726, Abbildung 5.53 A). Die TGF-β2-Expression im linken Ventrikel zeigt ebenso keinen statistisch signifikanten Unterschied der Vergleichsgruppen, jedoch kann eine Tendenz zu einer TGF-β2 Überexpression im Myokard der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe beobachtet werden (unpaired Mann-Whitney T-Test; p-Wert: 0,1320, Abbildung 5.53 B).

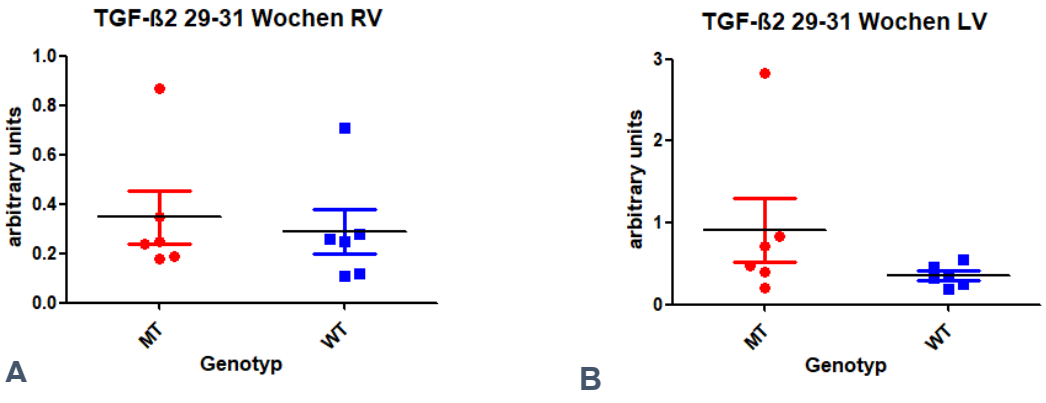


Abbildung 5.53: **A-B**: TGF β2-mRNA-Expression in 29-31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ (MT)- und FVBN Dsg2$^{wt/wt}$ (WT)-Mäusen. **A**: rechter Ventrikel (unpaired Mann-Whitney T-Test: p-Wert = 0,8726); **B**: linker Ventrikel (unpaired Mann-Whitney T-Test: p-Wert = 0,1320).

5.9 Heterozygote FVBN Dsg2$^{wt/mt}$ Mäuse

FVBN Dsg2$^{wt/mt}$ Mäuse (n= 8) wiesen keinen makroskopischen Phänotyp (Makro-Score = 0) auf. Histologisch zeigten jedoch zwei heterozygote Mäuse geringe phänotypische Veränderungen. Im Bereich des Papillarmuskels einer 30 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/mt}$-Maus kam beispielhaft eine kleine Läsion mit Immunzellinfiltration und beginnendem fibrotischem Umbau zur Darstellung. Auch das Atrium einer 30 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/mt}$-Maus wies eine aufgelockerte myokardiale Struktur mit geringer Bindegewebsvermehrung auf (Abbildung 5.54). Dies unterscheiden FVBN-Mäuse von vorherigen murinen AC-Modelle, in welchen bisher keine phänotypischen Veränderungen der heterozygoten Tiere gleichen Alters gefunden wurden. Eine nähere Analyse der heterozygoten FVBN Dsg2-Mäuse wurde im Rahmen unserer Untersuchungen nicht vorgenommen. Eine genauere Charakterisierung der Dsg2$^{wt/mt}$-Mäuse könnte zu einem besseren Verständnis des genetischen Hintergrundes und der Pathogenese der arrhythmogenen Kardiomyopathie im Menschen beitragen. Unsere Beobachtungen werden als Ansatz für zukünftige Projekte dienen.

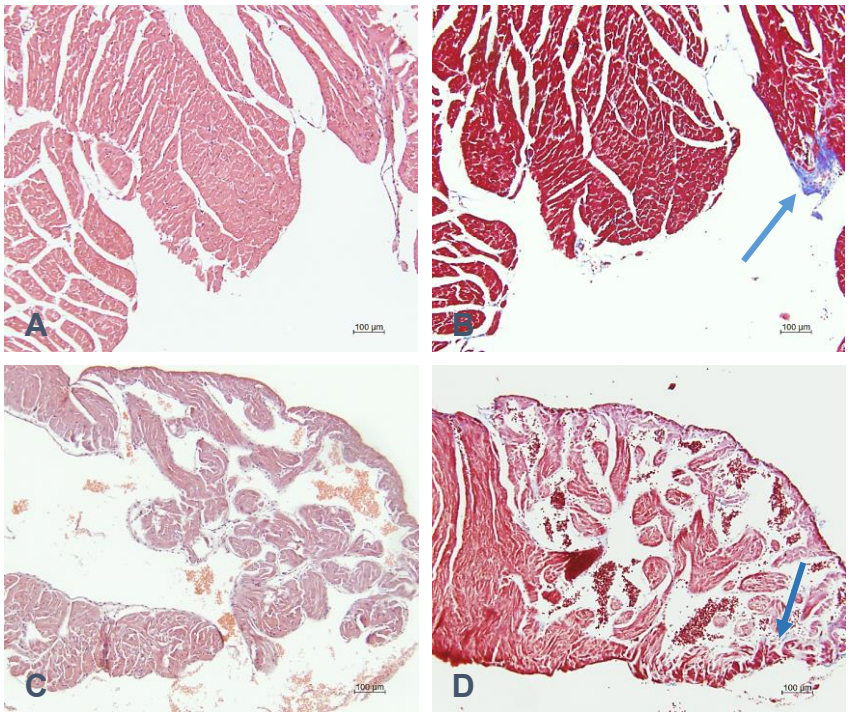


Abbildung 5.54: linker Ventrikel einer 30 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/mt}$ Maus (**A, B**) und Atrium einer 30 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/mt}$ Maus (**C, D**). **A, C**: HE-Färbung. **B, D**: Azan-Färbung. **A, B**: kleine Läsion im Bereich des Papillarmuskels. Periläsional befindet sich ein Immunzellinfiltrat. Die Läsion ist z.T. fibrotisch umgebaut (hellbauer Pfeil in B). **C, D**: Verbreiterte bindegewebige Septen im Bereich des Atriums (hellblauer Pfeil in D). Maßstab 100 µm.

6 Diskussion

6.1 Histomorphologischer Vergleich zwischen murinen und humanen AC-Herzen

Das murine Dsg2$^{mt/mt}$-Tiermodell ermöglicht eine schrittweise („step by step“) Charakterisierung der phänotypischen Veränderungen im Krankheitsverlauf der AC und liefert damit essenzielle Erkenntnisse über die zugrundeliegenden Pathomechanismen, die potentiell zukünftige therapeutische Ansatzpunkte bieten können. Obwohl Dsg2-mutierte Mäuse ein etabliertes Modell für die AC darstellen (Pilichou et al. 2009, Krusche et al. 2011, Kant et al. 2012, Rizzo et al. 2012), müssen Spezies-abhängige Unterschiede beachtet werden, wenn Ergebnisse auf den Menschen übertragen werden.

Humane AC-Herzen weisen eine sehr heterogene phänotypische Ausprägung aus, die von einer rein rechts-ventrikulären (bei 39% der patienten), einer links-ventrikulären (5%) bis zu einer biventrikulären Beteiligung in 56% der Patienten reicht (Mansueto et al. 2020). Makroskopisch betrachtet, fallen Veränderung wie eine weißliche oder gelbliche Verfärbung der Myokardwand des rechten Ventrikels als Folge des Kardiomyozytenverlustes und das Vorhandensein einzelner oder mehrerer im Dysplasie-Dreieck lokalisierten Aneurysmen auf (Sen-Chowdhry et al. 2010, Austin et al. 2019). Stattdessen sind Läsionen im linken Ventrikel häufig auf subepikardiale Schichten der lateralen und posterioren Wand begrenzt, das Septum interventriculare bleibt häufig ausgespart (Pinamonti et al. 2014, Corrado et al. 2017).

Ein biventrikulärer Phänotyp lässt sich auch bei FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen beobachten, wobei Läsionen im linken Ventrikel über die subepikardialen Arealen hinausreichen und auch im Septum interventriculare sowie in den Papillarmuskeln auftreten können. Darüber hinaus konnten in Menschen und Maus Mastzellen, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten, als die am häufigsten rekrutierten Entzündungszellen identifiziert werden (Campuzano et al. 2012, Lubos et al. 2020). Post-mortem Autopsie-Untersuchungen von AC-Patienten (Mansueto et al. 2020), Studien mit B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen (Gerçek et al. 2017) und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten sowohl in humanen als auch in murinen AC-Herzen

Kompensationsmechanismen im Sinne einer periläsionalen Kardiomyozyten-Hypertrophie. Während humane AC-Herzen durch einen fortschreitenden Ersatz des Herzmuskelgewebes durch Fett- und Bindegewebe gekennzeichnet sind (Thiene et al. 1998, Basso et al. 2009, Haj Salem et al. 2015) erfolgt der Umbau des geschädigten Myokards im murinen Dsg2$^{mt/mt}$-Modell rein fibrotisch (Krusche et al .2011, Kant et al. 2012, Chelko et al. 2016). Auch bei FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen lassen sich Adipozyten nur im Bereich des Sulcus coronarius und an der Herzbasis nachweisen. In murinen AC-Herzen können zudem sowohl kalzifizierende als auch nicht kalzifizierende, rein fibrotisch durchsetzte Läsionen identifiziert werden. Im Gegensatz dazu sind kalzifizierende Läsionen im humanen AC-Myokard eher selten (Thiene et al. 1991). Eine Ausnahme stellt ein von Pilichou et al. (2009) beschriebener Fall dar, in dem bei einer Herz-transplantierten AC-Patientin Kalzifikationen im geschädigten Myokard nachgewiesen wurden.

Zusammenfassend verdeutlichen die dargestellten Unterscheide, dass Ergebnisse aus murinen AC-Modellen nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragbar sind und eine differenzierte Interpretation erfordern.

6.2 Kammer-spezifische Genexpressionsmuster

Im Rahmen unserer Arbeit stellten wir fest, dass die Ausprägung der phänotypischen Veränderungen im Bereich der Atrien und Ventrikel in FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ Mäusen sehr variabel ist und dass die Atrien bereits in früheren Stadien deutlich affektierter sind als die Ventrikel.

Während die Vorhöfe der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse der Altersklasse 10-14 Wochen bereits organisierte Läsionen mit flächenhafter Fibrosierung des Myokards und atrophe Kardiomyozyten aufwiesen, fielen im Bereich der Ventrikel der Mäuse erst frische und kleinere Läsionen mit einer umgebenden Entzündungsreaktion und beginnender interstitiellen Bindegewebsvermehrung auf. Organisierte Narben wie sie in den Atrien der 10-14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen identifiziert wurden, zeigten sich im Bereich der Ventrikel erst in der Altersklasse 26-31 Wochen. Aus welchem Grund die Krankheitsentwicklung im Bereich der Atrien und Ventrikel unterschiedlich schnell und schwer verläuft, bleibt unklar und

erfordert weitere Untersuchungen. Eine Herzkammer spezifische Genexpression, welche für die normale Entwicklung und Funktion des Herzens von entscheidender Bedeutung ist, könnte eine mögliche Erklärung liefern (Tabibiazar et al. 2003).

Atrien und Ventrikel sind spezialisierte Strukturen, die unterschiedlichen physiologischen Anforderungen, wie variierende Druck- und Volumenverhältnisse, während der Embryonalphase und im Erwachsenenalter gerecht werden müssen. Daher bestehen die einzelnen Herzkammern aus Zellen mit spezialisierten funktionellen, strukturellen, metabolischen und elektrophysiologischen Eigenschaften. Diese Spezialisierung spiegelt sich in der Expression unterschiedlicher Gegensätze wider (Lyons G.E. 1996, Franco D. et al, 1998, Bruneau B. G. et al. 1999, Tabibiazar et al. 2003). Tabibiazar et al. (2003) konnten mittels Microarray-Analysen Kammer-spezifische Genexpressionsmuster im rechten und linken Atrium sowie im rechten und im linken Ventrikel sowie im Septum interventriculare identifizieren. Dabei werden beispielweise Transkriptionsfaktoren wie LIM-Proteine, Zytoskelett-Gene wie Myosin light chain regulatory A (MLC 2A) oder Extrazellulärmatrix-Proteine wie VCAM und EGF-haltiges Fibulin in den Vorhöfen stärker exprimiert. Die Ventrikel zeigten im Vergleich eine verstärkte Expression von ventrikulären Myosine wie Myosin light chain 1v (MLC1v), Tropomyosine sowie Aktin- und Myosin-Isoformen, wie das kardialen α-Actin. Die Unterschiede zwischen rechtem und linkem Ventrikel sind insgesamt deutlich geringer als die zwischen Atrien und Ventrikeln. Das Septum interventriculare sowie der linke Ventrikel weisen ein sehr ähnliches Genexpressionsprofil auf, wobei bestimmte Gene ausschließlich im Septum interventriculare exprimiert werden (Tabibiazar et al. 2003).

Wir stellen somit die Hypothese auf, dass die Heterogenität des kardialen Phänotyps, gekennzeichnet durch einen zeitlich versetzten Verlauf der Herzkammeraffektion sowie durch Unterschiede im Schweregrad der histopathologischen Veränderungen, maßgeblich durch den genetischen Hintergrund der Mausstämme B6 und FVBN und insbesondere durch Kammer-spezifische Genexpressionsmuster beeinflusst werden.

6.3 Der Kardiomyozyten-Verlust ist der Auslöser der myokardialen Schädigung

Während bei den B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen erste phänotypische Veränderungen typischerweise zwischen der 2. und 4. Lebenswoche auftraten, beobachteten wir entsprechende Auffälligkeiten bei FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen in der 10. Lebenswoche. Ob auch schon früher kardiale Veränderungen auftreten, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Die fortgeschrittene Phase der Erkrankung mit Bildung organisierter Narben trat bei B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen ab Woche 8, bei FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen erst ab der 25. Lebenswoche auf. Die B6 und FVBN-Mausmodelle spiegeln demzufolge zwei wichtigste Erscheinungsformen der arrhythmogenen Kardiomyopathie beim Menschen wider: einerseits das Patientenkollektiv, dass bereits in jüngeren Jahren schwere Arrhythmien entwickelt und an einem plötzlichen Herztod nach körperlicher Anstrengung verstirbt, andererseits diejenigen die einen langwierigen asymptomatischen Krankheitsverlauf mit wesentlich höher Lebenserwartung aufweisen (Bauce et al. 2011, Judge 2011).

Frisch entstandene Läsionen ab Woche 2-4 im Herzgewebe der B6 Dsg2$^{mt/mt}$- und ab Woche 10 im Herzgewebe der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse sind durch ein Absterben kardialer Myozyten gekennzeichnet. Wie in unserer und in zahlreichen Studien (Krusche et al. 2011, Kant et al. 2012, Gerçek et al. 2017) bewiesen, geht der Kardiomyozyten-Untergang mit weiteren phänotypischen Veränderungen, wie einer aseptische Entzündungsreaktion, einer Hypertrophie und im Verlauf einer fortschreitenden Fibrosierung des Myokards einher. Der Kardiomyozyten-Verlust ist demzufolge die erste strukturelle Veränderung, die eine Myokardschädigung auslöst und darauffolgende Reparatur- und Umbau-Prozesse induziert. Pilichou et al. (2009) identifizierten im Rahmen von elektronenmikroskopischen Untersuchungen am Herzgewebe von 2-3 Wochen alten Dsg2-mutierten Mäusen ultrastrukturelle Merkmale, die auf eine Kardiomyozyten-Nekrose als grundlegender Mechanismus des Kardiomyozyten-Verlustes zurückzuführen sind. Dazu gehören beispielweise die Unterbrechung des Sarkolemms, Auflockerung der Myofilamente, Schwellung der Mitochondrien und eine Inflammationsreaktion (Kung et al. 2011, Konstantinidis et al. 2012). Apoptotische Kardiomyozyten konnten nur selten und auf fibrotische Bereiche

beschränkt, detektiert werden. Dies lässt vermuten, dass apoptotische Prozesse nur in einem geringen Ausmaß zum Kardiomyozytenverlust beitragen (Valente et al. 1998).

Eine Theorie legt nahe, dass das Absterben der Herzmuskelzellen vermutlich durch die desmosomale Instabilität im Bereich des Glanzstreifens ausgelöst wird. Die Dsg2-Mutationen schwächen die Adhäsion der Kardiomyozyten und die Stabilität des Zytoskeletts, sodass das mutierte Herzgewebe in der postnatalen Entwicklung der erhöhten mechanischen Beanspruchung nicht Widerstand leisten kann. Der daraus resultierende mechanische Stress löst einen lokal begrenzten Kardiomzyozytenuntergang aus (Kant et al. 2012). Da Dsg2 sowohl im Bereich der Desmosomen als auch der adherens junctions (Area composita) vorkommt (Pieperhoff & Franke 2007), führt die mutationsbedingte Proteinstruktur-Veränderung wahrscheinlich zu einer gestörten Funktion beider Haftkontakte. Ob jedoch der Kardiomyozyten-Verlust ausschließlich auf eine mechanische Instabilität und einer beeinträchtigten Kraftübertragung zurückzuführen ist, oder auch als Folge einer gestörten Signalübertragung entsteht, ist unklar und erfordert zukünftige Untersuchungen (Berkowitz et al. 2008, Lanza et al. 2008, Hirschy et al. 2010).

Zusammenfassend vermuten wir, im Einklang mit vorherigen Arbeiten, dass eine gestörte Adhäsion des desmosomalen Proteins Desmoglein 2 den Krankheitsprozess während der postnatalen Phase der Herzentwicklung auslöst. Die mechanische Stabilität ist verändert und in lokal begrenzten Arealen gehen Kardiomyozyten unter. Der Kardiomyozytenverlust induziert kardiale Reparaturmechanismen, die eine aseptische Entzündungsreaktion und im Verlauf einen fibrotischer Umbau des Myokards auslösen. Daraus resultiert ein fortschreitender Kardiomyozytenverlust und eine Fibrosierung, die schließlich aufgrund der gestörten Kraftverteilung und der Veränderungen der elektrischen Leitfähigkeit zu lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen und/oder zum Herzversagen führen können.

6.4 Immunzellen sind der Treiber der Krankheitsentwicklung und modulieren den Schweregrad der arrhythmogenen Kardiomyopathie

Die Kardiomyozytennekrose induziert eine Inflammationsreaktion im geschädigten Myokard (Pilichou et al. 2009, Kant et al. 2012, Lubos et al. 2020). Immunhistochemische Färbungen mit dem Pan-Leukozyten-Marker CD44 zeigten eine ausgeprägte Immunzellinfiltration im Bereich frisch entstandener Läsionen im Myokard vor allem des rechten Ventrikels und der Atrien der 10-14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse. CD44-positive Zellen kamen nur selten im strukturell nicht beeinträchtigten Myokard vor. Die Anzahl an Immunzellen im angrenzenden gesunden Myokard weichte nicht von denjenigen im wildtypischen Kontrollmyokard ab. Insgesamt ließen sich CD44-positive Zellen am stärksten im Bereich der sich organisierenden Läsionen mit Absterben der Kardiomyozyten und Einsatz von Reparaturmechanismen, anfärben. Solche entzündlichen Infiltrate wurde ebenfalls bei Desmin-Null-Mäusen (Psarras et al. 2012), in der transgenen N271S-Dsg2-Maus (Pilichou et al. 2009) und den B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen unserer Arbeitsgruppe (Kant et al. 2012, Lubos et al. 2020) beschreiben.

Darüber hinaus konnten in den FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen CD3 positive T-Zellen periläsional detektiert werden. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den Ergebnissen von Lubos et al. 2020 mit B6 Dsg2$^{mt/mt}$ und B6 Dsg2^{cKO}-Mäusen: Immunzellen wandern in der akuten Phase der Krankheitsentwicklung im Bereich von frisch entstandenen Läsionen ein. MPO-positive neutrophile Granulozyten machen den Hauptteil der Immunzellen in den akuten Krankheitsstadien aus. Eine begrenzte adaptive Immunantwort setzt ein, die sich in einer Hochregulierung von CD3-positiven Zellen äußert. CD44-positive Immunzellen konnten auch nach Einsetzten von Umbau-Prozessen, gekennzeichnet durch einen fibrotischen Umbau des Myokards, detektiert werden.

Eine beginnende Organisation der Läsionen im Sinne einer interstitiellen Bindegewebsvermehrung und Ersatzfibrose geht mit einer Veränderung der begleitenden Immunzellinfiltrate einher. F4/80-positive und CD11b-positive Makrophagen stellen die Mehrheit der infiltrierenden Zellen sowohl im Bereich von kalzifizierenden als auch im Bereich von nicht kalzifizierenden fibrotisch umgebauten Läsionen der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse der Altersklasse 26-31 Wochen dar. F4/80 und CD11b-positive Makrophagen konnten auch im Rahmen

einer interstitiellen Bindegewebsvermehrung festgestellt werden. CD11c-positive dendritische Zellen ließen sich vor allem im Bereich von kalzifizierenden Kardiomyozyten anfärben. CD206-positive Immunzellen, ein Marker für reparative Makrophagen, kamen sowohl im Bereich reifer Narben als auch diffus verteilt als residente Makrophagen im gesunden Kontrollmyokard und im strukturell nicht beeinträchtigten Myokard der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse vor.

CD3-positive T-Zellen persistierten im geschädigten Myokard der älteren Mutanten, auch wenn in einem deutlich reduzierten Ausmaß im Vergleich zu unreifen Narben. MPO-positiven neutrophilen Granulozyten, welche von Lubos et al. 2020 in der akuten Phase der Erkrankung detektiert wurden, werden nach Einsetzten von Reparaturmechanismen im Verlauf der Erkrankung allmählich durch Makrophagen ersetzt.

Auf molekularer Ebene zeigte sich die CD68-mRNA-Expression, ein Glykoprotein, das auf der Oberfläche von Makrophagen und Monozyten synthetisiert wird (Chistiakov et al. 2017), im Bereich des rechten Ventrikels der 26-31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ -Mäusen signifikant erhöht. Dies steht im Einklang mit der im Rahmen der immunhistochemischen Reaktionen nachgewiesenen überwiegende Beteiligung des rechten Ventrikels an der Entzündungsreaktion. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass der Kardiomyozytenverlust in den frühen Stadien der Erkrankung eine Einwanderung von Immunzellen induziert, wobei diese in den fortgeschrittenen Stadien im Bereich reifer Narben persistieren und das Voranschreiten der Erkrankung modulieren.

Entzündungsinfiltrate fanden sich auch im Myokard von AC-Patienten (Basso et al. 1996, Asimaki et al. 2011, Meraviglia et al. 2021). Eine durch neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten dominierte Inflammationsreaktion im Bereich von abgestorbenen Kardiomyozyten konnte in post-mortem Autopsie Untersuchungen von humanen AC-Herzen durch Campuzano et al. (2012) identifiziert werden. Dieser erstellte zudem die Hypothese, dass das Vorhandensein von Immunzellen mit dem Schweregrad der phänotypischen Veränderungen korreliert: die Anzahl an Entzündungszellen ist umso höher, je mehr Herzkammern betroffen sind (rechts-ventrikuläre Beteiligung < biventrikuläre Beteiligung < biventrikuläre + atriale Beteiligung).

In Übereinstimmung mit Campuzano et al. (2012) und Lubos et al. (2020) vermuten wir, dass die Inflammationsreaktion im Rahmen der AC nicht nur ein wichtiger „Treiber“ der Krankheitsprogression darstellt, sondern auch strukturelle Veränderungen des Herzmyokards auslöst und somit den Schweregrad der Erkrankung beeinflusst. Diese Schlussfolgerungen legen nahe, dass zukünftige zielgerichtete antiinflammatorische Therapien einen vielversprechenden Ansatz in der Behandlung der AC darstellen könnten.

6.5 Kardiomyozyten-Hypertrophie und Ca^{2+}-Handling

Eine pathologische Herzhypertrophie ist durch eine Zunahme der Kardiomyozytengröße sowie Verdickung der Ventrikelwände gekennzeichnet. Dabei handelt es sich um eine adaptive Reaktion, die als Folge eines Myokardinfarktes oder einer genetischen Mutation entsteht und der Aufrechterhaltung der kardialen Pumpfunktion dient (Grossman et al. 1975). Während in der Anfangsphase die hypertrophierten Myozyten der erhöhten Arbeitsbelastung Widerstand leisten können, lassen bei anhaltendem pathologischem kardialem Stress die Kompensationsmechanismen nach, was letztendlich zu einer ventrikulären Dilatation, Abnahme der Kontraktionsfähigkeit und kardialen Dekompensation führt (Tham et al. 2015). Eine pathologische Kardiomyozyten-Hypertrophie konnte im Rahmen von post-mortem Autopsie-Untersuchungen von humanen AC-Herzen beobachtet werden (Basso et al. 2008, Mansueto et al. 2020). Dabei ist unklar, ob die Hypertrophie eine Anpassung an die destabilisierende Wirkung der mutierten desmosomalen Proteine oder ein Kompensationsmechanismus nach Ausbruch und im chronischen Verlauf der Erkrankung darstellt.

Hypertrophierte Kardiomyozyten ließen sich sowohl im Bereich des rechten als auch des linken Ventrikels der FVBN $Dsg2^{mt/mt}$-Mäuse in der akuten Phase der Erkrankung (10-14 Wochen) und in den fortgeschrittenen Stadien (26-31 Wochen) nachweisen. Ergebnisse von Gerçek et al. (2017) mit B6 $Dsg2^{mt/mt}$-Mäusen zeigten einen Trend zu erhöhten rechts- und linksventrikulären Kardiomyozyten-Durchmesser ab der 6. Lebenswoche. Diese Ergebnisse legen nahe, dass ventrikuläre Kardiomyozyten im Herzgewebe der FVBN und der B6

Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse dem Kardiomyozytenverlust und dem fibrotischem Umbau des Myokards durch eine Hypertrophie periläsionaler Myozyten kompensieren können. Eine kardiale Dekompensation setzt vermutlich erst später ein. Die Unterschiede zwischen FVBN- und B6-Mäusen können einerseits auf die regionale Heterogenität innerhalb des Herzmuskels zurückgeführt werden und spiegeln andererseits die Variabilität der Krankheitsmanifestation wider.

Das Myokard der Vorhöfe der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse zeigt bereits ab Lebenswoche 10-14 ausgeprägte strukturelle Veränderungen: neben Kompensationsmechanismen fanden bereits Umbauprozesse mit flächenhafter Fibrosierung der Atrien statt, sodass sowohl eine Kardiomyozyten-Hypertrophie als auch ein Kardiomyozytenverlust in unmittelbarer Nachbarschaft fibrotisch durchsetzter Läsionen beobachtet werden konnte. In der Altersklasse 27-30 Wochen überwiegte eine flächenhafte Fibrosierung des atrialen Myokards. Die atrialen Kardiomyozyten-Durchmesser waren nicht signifikant erhöht. Die Atrien der B6 Dsg2$^{mt/mt}$ Mäuse zeigten wiederum ab Woche 12-14 eine Tendenz zu erhöhten Kardiomyozyten-Durchmessern, ab Woche 26-28 waren die Durchmesser der mutierten Tiere im Vergleich zur wildtypischen Kontrollgruppe dann signifikant erhöht. Diese Ergebnisse legen nahe, dass während die Atrien der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse bereits eine fibrotische Umstrukturierung zeigen, die Atrien der B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse dem kardialen Stress durch eine kompensatorische Kardiomyozyten-Hypertrophie entgegenwirken können. Diese Unterschiede lassen einen starken Einfluss des genetischen Hintergrundes beider Mausmodelle auf die Ausprägung der phänotypischen Veränderungen und die Kompensationsfähigkeit der einzelnen Herzkammern vermuten. Wie bereits in Kapitel 5.2 besprochen, ist die Heterogenität der Affektion zwischen Atrien und Ventrikel einer Maus am ehesten auf die Kammer-spezifischen Genexpressionsmuster zurückzuführen (Tabibiazar et al. 2003).

Die Hypertrophie geht u.a. mit einer Störung des Ca^{2+}-Handlings und des Energiestoffwechsels einher (Tham et al. 2015). Singh et al. 2021 beschrieben Spezies-abhängige Unterschiede in der Expression von Proteinen, die am Ca^{2+}-Zyklus des sarkoplasmatischen Retikulums und am mitochondrialen Ca^{2+}-Transport beteiligt sind: FVBN-Mäuse exprimieren Proteine die im Ca^{2+}-Handling eine Rolle spielen, weniger stark als C57BL/6J (B6) -Mäuse, was zu

Unterschieden im Calciumstoffwechsel beitragen könnte. Während der kardialen Erregungs-Kontraktions-Kopplung bewirkt ein hohes Aktionspotential den Eintritt von Ca^{2+} in den Kardiomyozyten über L-Typ Ca^{2+}Kanäle (LTCC), die sich in den T-Tubuli befinden. Die Bindung von Ca^{2+} an Typ-2-Ryanodinrezeptoren (RyR2) in den Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) führt zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR, ein Prozess, der als Ca^{2+}-induzierte Ca^{2+}-Freisetzung bekannt ist (Bers 2014). Ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration verstärkt die Bindung von Ca^{2+} an Troponin C innerhalb des dünnen Filaments der Sarkomere, was die Bildung von Querbrücken zwischen dem dicken und dem dünnen Filament fördert und zu einer Kontraktion des Herzmuskels führt (Solaro 2010). Die Entspannung erfolgt, wenn Ca^{2+} durch SERCA2a, eine Ca^{2+}-abhängige ATPase des sarko-endoplasmatischen Retikulums, zurück in den SR oder durch den Na^{+}/Ca^{2+}-Austauscher (NCX) aus der Zelle gepumpt wird (Bers 2006). Störungen des Ca^{2+}-Haushaltes induzieren eine kontraktile Dysfunktion und führen letztendlich beim Nachlassen von Kompensationsmechanismen zum Herzversagen (Feldman et al. 1987, Gwathmey et al. 1987, Lindner et al. 2002). Da die pathologische Hypertrophie zudem mit einer Reaktivierung des fetalen Genprogramms einhergeht (Zaugg & Buser 2001), ist die mRNA-Expression des B-Typ natriuretischen Peptids mittels quantitativer RT-PCR untersucht worden, wobei im Einklang mit den Ergebnissen aus der Immunhistochemie und Immunfluoreszenz eine erhöhte BNP-mRNA-Expression im Bereich des rechtsventrikulären Myokards nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Kardiomyozyten-Hypertrophie im Rahmen der AC als Folge des Kardiomyozyten-Verlustes in der akuten Phase der Erkrankung auftritt und im Verlauf der Krankheitsprogression weiter fortschreitet. Wir vermuten, dass der genetische Hintergrund der Tiere, die Kammer-spezifische Genexpression sowie Mausstamm-abhängige Unterschiede in der relativen Expression von Sarkolipin, Proteinen der Elektronentransportkette und mitochondrialen Ca^{2+}-Transportproteinen einen wesentlichen Einfluss auf die Aufrechterhaltung von Kompensationsmechanismen, Kontraktionsfähigkeit und den Energiestoffwechsel des Herzmuskels haben, wobei speziesanhängig früher oder später eine kardiale Dekompensation einsetzt.

6.6 Kalzifizierende Läsionen und die Rolle von Osteopontin

Kalzifikationen entstehen durch abnormale Ca^{2+}-Ablagerungen im myokardialen Gewebe, wobei dystrophische Verkalkungen von metastatischen unterschieden werden (Freundlich et al. 1975, Ananthakrishna et al. 2016). Dystrophische Kalzifikationen sind Folge einer lokalen Gewebeschädigung mit Kardiomyozytenverlust (z.B. bei einem Myokardinfarkt) und gehen nicht mit einem erhöhten Serum-Ca^{2+}-Spiegel oder einer Störung der Ca^{2+}-Homöostase einher. Ursächlich sind u.a. eine relative Alkalinität, eine verminderte Kalziumlöslichkeit und die Produktion von Kohlendioxid in langsam metabolisierendem Gewebe (infarziertes Myokard) (Gowda et al. 2004, Nance et al. 2015). Metastatische Kalzifikationen sind Folge von Systemerkrankungen mit einem gestörten Ca^{2+}-/Phosphat-Stoffwechsel (z.B. Nierenversagen mit Phosphatretention und sekundärem Hyperparathyreoidismus) und kommen häufig in Zusammenhang mit Ca^{2+}-Depositionen in anderen Geweben vor, darunter Haut, Lunge und Niere (Frierer et al. 1970, Kuzela et al. 1997, Gowda et al. 2004).

Dystrophe kalzifizierende Läsionen sind Teil der AC-Pathogenese vor allem bei Mäusen und traten überwiegend in subepikardialen Bereichen des rechten Ventrikels der FVBN $Dsg2^{mt/mt}$-Mäuse der Altersklassen 26-31 Wochen auf, seltener hingegen im Bereich der Atrien (Doktorarbeit Bezrucav 2020). Besonders auffällig waren myokardiale Kalzifikationen im Bereich dreier Ventrikel und eines Atriums in der Gruppe der 27-31 Wochen alten FVBN $Dsg2^{mt/mt}$-Tiere. Diese Herzbereiche färbten sich in der Azan-Färbung nur blass an, was auf einen Verlust der rot erscheinenden Myofibrillen-reichen Kardiomyozyten hindeutet. Die kalzifizierenden Läsionen enthielten im Vergleich zu nicht kalzifizierenden, fibrotischen Läsionen nur geringe Mengen an Kollagenfasern (in der Azan-Färbung blau dargestellt), wie bereits von Kant et al. (2012) beschrieben.

Osteopontin ist ein phosphoryliertes Glykoprotein, das physiologischerweise im Knochen sowie im Epithelgewebe exprimiert wird (Brown et al. 1992). Es spielt eine Rolle bei Gewebeschädigung und Entzündungsreaktionen, etwa bei Verkalkungen in atherosklerotischen Plaques (Patarca et al. 1993, Fritzpatrick et al. 1994). Osteopontin wird sowohl von Makrophagen (Murry et al. 1994) als auch

von Kardiomyozyten exprimiert (Graf et al. 1997). Es wird vermutet, dass in frühen Stadien der Myokardschädigung auch Kardiomyozyten zur Osteopontin-Produktion beitragen, während in späteren Stadien Makrophagen und andere interstitielle Zellen (z.B. Mastzellen, neutrophile Granulozyten) diese Funktion übernehmen (Mavroidis & Capetanaki 2002). Zusätzlich wird Osteopontin durch Angiotensin II in kardialen Fibroblasten induziert (Ashizawa et al. 1996).

Osteopontin-mRNA konnte im Rahmen dieser Arbeit mittels in-situ-Hybridisierung in und im direkten Umfeld von kalzifizierten Läsionen nachgewiesen werden. Mavroidis & Capetanaki (2002) beschrieben ebenfalls eine erhöhte Expression im rechten Ventrikel von Desmin-Knockout-Mäusen, vor allem in Arealen mit Kardiomyozytenverlust, Immunzellinfiltration und Kalziumablagerungen. In fortgeschrittenen Stadien der AC führte die Myokardschädigung zu fibrotischem Umbau und einer verstärkten Osteopontin-mRNA Expression, insbesondere in Bereichen mit Entzündungszellen wie Makrophagen, Lymphozyten und fibroblastenähnlichen Zellen.

Der Zusammenhang zwischen Osteopontin und Kalzifikationen ist bisher nicht abschließend geklärt. McClure et al. (1981) und Van Vleet & Ferrans (1987) beschrieben dystrophe Kalzinosen in Mausmodellen. Dabei ist unklar, ob Osteopontin aktiv Calcium binden kann oder eher indirekt über Aktivierung der Ca^{2+}-ATPase (Miyauchi et al. 1991) oder über Ca^{2+}-Bindung (Shing et al. 1993) an der Kalzifikation beteiligt ist. Zu hohe intrazelluläre Ca^{2+}-Mengen wirken zytotoxisch, fördern die Bildung reaktive Sauerstoffspezies und könnten die Osteopontin-Freisetzung triggern (Richter 1998, Guo et al. 2001).

In unserer Arbeit wurde Osteopontin-mRNA ausschließlich in kalzifizierten Läsionen detektiert, nicht jedoch im gesunden Myokard von FVBN $Dsg2^{wt/wt}$- und dem remote-Myokard von $Dsg2^{mt/mt}$-Mäusen. Trotz diffuser Makrophagenverteilung wurde dort keine Expression festgestellt, was darauf hindeutet, dass Osteopontin-positive Zellen ausschließlich im Läsionsareal rekrutiert oder vor Ort differenziert werden (Lubos et al. 2020).

Chelko et al. (2019) zeigten außerdem, dass die Osteopontin-Expression negativ mit der Ejektionsfraktion korreliert und gleichzeitig positiv mit dem

Ausmaß der Myokardschädigung assoziiert ist, eine Beobachtung, die durch unsere Ergebnisse bestatigt wird.

6.7 Fibrotische Umbauprozesse: FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- versus B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse

Im rechten und linken Ventrikel von 10-14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen konnten neben frisch entstandenen Läsionen mit ausgeprägtem inflammatorischem Infiltrat bereits auch kleinere, fibrotische Veränderungen nachgewiesen werden. Das atriale Myokard derselben Altersklassen wies hingegen ausgedehnte, narbige Läsionen auf, die mit einer deutlichen Wandausdünnung assoziiert waren. Die fibrotische Umstrukturierung des Myokards setzte sich bei FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen im Alter von 26-31 Wochen weiter fort. In diesem fortgeschrittenen Stadium konnten eine ausgeprägte interstitielle Bindegewebsproliferation sowie eine konsolidierte Ersatzfibrose identifiziert werden, die sowohl im atrialen als auch im ventrikulären Myokard lokalisiert waren. Im Gegensatz dazu begannen ausgedehntere fibrotische Umbauprozesse im Myokard der B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse bereits im Alter 2 bis 6 Wochen. Ab der 4. Lebenswoche zeigten alle B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse kardiale Läsionen, die durch unterschiedlich stark ausgeprägte Kollagenablagerungen gekennzeichnet waren. Im Alter von sechs Wochen wiesen sämtliche Läsionen eine deutlich verstärkte und flächendeckende Kollagenablagerung auf. Ab der 13. Lebensawoche ähnelten die Läsionen narbigem Gewebe, da sie viele Kollagenfasern und nur noch wenige Zellen enthielten (Krusche et al. 2011, Kant et al. 2012). Diese Befunde deuten, im Einklang mit den vorherigen Ergebnissen, darauf hin, dass Umbauprozesse im Myokard der B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen wahrscheinlich früher einsetzen als bei FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Tieren. Es liegt der Vermutung nahe, dass der genetische Hintergrund der untersuchten Mausmodelle einen entscheidenden Einfluss auf den zeitlichen Verlauf der myokardialen Fibrosierung ausübt. Um den Krankheitsverlauf bei den FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen vollständig aufzuklären, müssen hier in Zukunft noch die Untersuchungen der 2-6 Wochen alten Mäuse erfolgen.

6.8 Die „Fibrose-Inflammations-Achse“

Läsionen mit einem ausgeprägten Immunzellinfiltrat sowie bereits fibrotisch umgebaute Läsionen konnten zeitgleich im Myokard von FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen beobachtet werden. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Entzündungsreaktion und die kardiale Fibrosierung keine voneinander unabhängigen, zeitlich versetzten Prozesse darstellen, sondern eng miteinander verbunden sind und sich ggf. wechselseitig beeinflussen.

Fibroblasten und Immunzellen modulieren in wechselseitiger Abhängigkeit sowohl die Immunantwort als auch das kardiale Remodelling. Sowohl die Aktivierung kardialer Fibroblasten als auch die Rekrutierung von Immunzellen spielen gemeinsam eine zentrale Rolle beim fibrotischen Umbau des Herzens und tragen wesentlich zu kardialen Fibrosierung bei (Smolgovsky et al. 2021). Fibroblasten gelten als zentrale Akteure der Immunantwort, indem sie Chemokine und Zytokine freisetzen, welche die Aktivierung und Infiltration von Immunzellen im Myokard fördern. Dabei erkennen sie DAMPs (*damage-associates molecular patterns*) über eigene PRR (*pattern regognition receptors*) und beseitigen Zelltrümmer (Prabhu & Frangogiannis 2016, Shinde & Frangogiannis 2017). In ähnlicher Weise tragen Immunzellen zur Aufrechterhaltung der kardialen Homöostase bei, indem sie durch die Freisetzung von Zytokinen die Aktivität von Fibroblasten regulieren. Über physische Interaktionen fördern sie zudem die Sekretion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen, die sich direkt auf den Phänotyp und die Funktion der Fibroblasten auswirken (Mouton et al. 2018). Kardiale Fibroblasten polarisieren in Richtung eines stark proliferativen, fibrotischen und proangiogenen Profils, wobei eine hohe Expression von α-SMA auf einen aktivierten Myofibroblasten-Phänotyp hinweist (Fu et al. 2018). Myofibroblasten lagern große Mengen an Kollagen ein und vernetzen die extrazelluläre Matrix, um eine stabile Narbe im geschädigten Myokard zu bilden. Nachdem die Narbe ausgereift ist, erhalten die Fibroblasten anti-fibrotische Signale aus der Mikroumgebung (Bujak et al. 2009, Saxena et al. 2014). Zusammenfassend ist die Koordination von Fibroblasten und Immunsystem kein getrennter, sondern ein eng abgestimmter Prozess, der als orchestrierte Reaktion zur Wundheilung dient. Während fibrotische Umbauprozesse für das Überleben notwendig sind, trägt die progressive Vernarbung des Myokards zu

der kardialen Dysfunktion und zum Herzversagen bei (Psarras et al. 2019, Smolgovsky et al. 2021).

Die Interaktion zwischen Immunzellen und Fibroblasten wird durch die im Myokard der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen verstärkte Tenascin C-Färbung unterstrichen. Hochreguliertes TNC stimuliert Makrophagen, welche über die αV*β*3/FAK/Src/Nuclear Factor-κB Signalkaskade die Expression und Migration von Wachstumsfaktoren und proinflammatorischen Zytokinen (wie IL-6) induzieren, welche wiederum Fibroblasten zur Kollagensynthese und Bindegewebsvermehrung anregen. Darüber hinaus regulieren proinflammatorische Zytokine, die Synthese von TNC durch Fibroblasten, sodass eine positive Rückkopplung entsteht (Imanaka-Yoshida 2021).

6.9 Kardiale *Remodelling* und Fibrose-Marker: GDF 15 und TGFβ-2

GDF-15 ist ein Mitglied der TGF-β-Superfamilie und wird als Reaktion auf myokardialen Stress, Ischämie, Entzündungsprozesse und kardiales Remodelling stark hochreguliert. Im Myokard wird GDF-15 vor allem von Kardiomyozyten, Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert. Klinisch gilt GDF-15 als prognostischer Biomarker für Herzversagen (Kempf et al. 2007, Adela & Banerjee 2015). Im rechten Ventrikel von 29-31 Wochen FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen konnte eine verstärkte GDF15-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Krusche et al. 2011 berichteten zudem über eine signifikant erhöhte GDF15-mRNA-Expression in geschädigtem Myokard der B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse ab der 8., teilweise bereits ab der 2. Lebenswoche. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die GDF-15-mRNA-Expression als früher Marker für den Krankheitsfortschritt sowie potenziell als prädiktiver Marker für das Einsetzen einer ventrikulären Dysfunktion herangezogen werden könnte.

TGFβ-2 spielt eine zentrale Rolle im kardialen Remodelling, idem es über SMAD-abhängige Signalwege die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten induziert und somit zur progressiven myokardialen Fibrosierung beiträgt (Bujak & Frangogiannis 2007, Koitabashi et al. 2011). Kant, Freytag et al. (2019) zeigten, dass alle drei TGFβ-Isoformen (TGF β-1, β-2, β-3) im Myokard der B6 Dsg2$^{mt/mt}$- und Dsg2^{cKO}-Mäuse exprimiert werden. Dabei wurden TGFβ-1 und TGFβ-3

überwiegend in fibrotischen Läsionen nachgewiesen, während TGFβ-2 vermehrt in periläsionalen Kardiomyozyten exprimiert war. Alle TGFβ-Isoformen zeigten ab der Läsionsbildung in der 4. Lebenswoche eine deutliche Hochregulation, wobei jede Isoform durch ein spezifisches Expressionsmuster im zeitlichen Verlauf charakterisiert war. Insbesondere TGFβ-2 und TGFβ-3 wiesen eine langanhaltende Hochregulation bis in die fortgeschrittene Phase des Krankheitsverlaufs auf. Eine verstärkte TGFβ-2-mRNA-Expression konnte auch im linken Ventrikel der FVBN $Dsg2^{mt/mt}$ -Mäuse nachgewiesen werden. Die frühe Expression in fibrotischen Läsionen sowie die persistierende Hochregulation in fortgeschrittenen Stadien unterstreichen das potenzielle prognostische Potential von TGFβ als Progressions- oder Krankheitsmarker. Diese Beobachtungen eröffnen Perspektiven für eine gezielte therapeutische Modulation des TGFβ-Signalwegs zur Begrenzung der Fibrosierung im Herzen.

6.10 Limitationen

Die vorliegende Arbeit besitzt einige Limitationen. Da auf die Aussagekraft einzelner Ergebnisse im Kontext der jeweiligen Kapitel eingegangen wurde, sollen an dieser Stelle übergreifende Einschränkungen diskutiert werden.

Es wurden zwei in unserer Arbeitsgruppe etablierte Mausmodelle der arrhythmogenen Kardiomyopathie verwendet, basierend auf einer Desmoglein-2-Mutation: die FVBN- und die B6-Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse (Krusche, Holthöfer et al. 2011, Kant et al. 2012). Aufgrund der hohen intrauterinen Sterberate und der aufwendigen Zuchtbedingungen von FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- und B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Mäusen gestaltete sich die Tierbeschaffung sehr schwierig. Zur Reduktion der Versuchstieranzahl im Sinne des 3R-Prinzips (*replace, reduce, refine*; Russell & Burch 1959) konnte nicht in allen Fällen ein vollständiger Altersabgleich zwischen den Gruppen erzielt werden. Dennoch ermöglichte der Einsatz beider Modelle einen Einblick in unterschiedliche Stadien und Ausprägungen der AC. Trotz deutlicher Tendenzen in den Expressionsanalysen war zum Teil aufgrund der begrenzten Tierzahl keine statistische Signifikanz zwischen den Vergleichsgruppen zu erreichen.

Die immunhistochemischen Färbungen zeigten deutliche Effekte, insbesondere im Bereich der Vorhöfe, konnten aber ebenfalls nicht für alle Marker systematisch durchgeführt werden. So fehlen aktuell immunhistochemische Daten mit den Antikörpern F4/80, CD206, CD11b und CD11c in den Atrien der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse, die zukünftig ergänzt werden sollten, um potenzielle atriale Unterschiede in der Immunzellverteilung detaillierter erfassen zu können.

Gleichzeitig konzentrieren sich die bisherigen qRT-PCR-Analysen auf den linken und den rechten Ventrikel der FVBN-Dsg2-Mäuse der Altersklasse 29-31 Wochen. Auch hier wären weiterführende Untersuchungen sinnvoll, etwa durch Expressionsanalysen atrialer Inflammations-, Hypertrophie- und Fibrosemarker, um die molekularen Grundlagen atrialer Umbauprozesse gezielter zu charakterisieren.

7 Zusammenfassung

Die arrhythmogene Kardiomyopathie (AC) ist eine genetisch bedingte Herzmuskelerkrankung. Klinisch ist die Erkrankung in Penetranz und Symptomatik sehr variabel. Sie ist durch Palpitationen, Synkopen, ventrikuläre Arrhythmien oder den plötzlichen Herztod charakterisiert. Morphologisch ist der Verlust von Kardiomyozyten und deren Ersatz durch Binde- und Fettgewebe kennzeichnend. Ursache sind meistens Mutationen in desmosomalen Proteinen, die an der mechanischen Kopplung von Kardiomyozyten, aber auch an Signaltransduktions-Prozessen beteiligt sind. In dieser Arbeit wurden zwei Mausstämme, FVBN- und B6-Mäuse, untersucht, die beide konstitutive, homozygote Träger eines mutierten Desmoglein-2-Allels ($Dsg2^{mt}$) sind, dem die Exone 4 bis 6 fehlen. Ziel der Arbeit war es, strukturelle und molekulare Veränderungen in Atrien und Ventrikeln während des Krankheitsverlaufs in FVBN und den Atrien der B6-Mäuse zu charakterisieren und zu vergleichen. Hierzu wurden 10-14 und 26-31 Wochen alte FVBN $Dsg2^{mt/mt}$- und B6 $Dsg2^{mt/mt}$-Mäuse analysiert und mit gleichaltrigen wildtypischen Kontrollen verglichen. Untersucht wurden Immunzellinfiltration, Kardiomyozyten-Hypertrophie, Kalzifikation sowie fibrotische Umbauprozesse im atrialen und ventrikulären Myokard. Bereits in der 10. Lebenswoche zeigten FVBN $Dsg2^{mt/mt}$-Mäuse lokal begrenzte Areale mit Kardiomyozyten-Verlust. Eine Infiltration der Areale durch Makrophagen (F4/80, CD 206, CD11b), dendritische Zellen (CD11c), und T-Zellen (CD 3) konnte immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die entzündliche Reaktion begleitet im Krankheitsverlauf den fibrotischen Myokardumbau. Kalzifikationen traten vor allem in den Atrien und im rechten Ventrikel von FVBN $Dsg2^{mt/mt}$- Mäusen auf. Eine kompensatorische Hypertrophie periläsionaler Kardiomyozyten wurde in der akuten Krankheitsphase (Alter 10-14 Wochen) sowie im fortgeschrittenen Stadium (Alter 26-31 Wochen) in den Ventrikeln der FVBN $Dsg2^{mt/mt}$-Mäuse nachgewiesen. Parallel dazu zeigte sich eine Steigerung der Expression Ventrikel-spezifischer Stress- und Hypertrophie-Marker (BNP, Lgals3). In den Atrien der 10-14 Wochen alten FVBN $Dsg2^{mt/mt}$-Mäuse waren die Kardiomyozyten-Durchmesser signifikant erhöht, während dies in der Altersklasse 26-31 Wochen nicht mehr der Fall und das atriale Myokard fibrotisch umgebaut war. Bei den B6 $Dsg2^{mt/mt}$-Mäusen fand sich im Alter von 12-14 Wochen eine Tendenz zu vergrößerten atrialen Kardiomyozyten und im Alter von 26-28 Wochen waren die Durchmesser dann signifikant erhöht im Vergleich zu den Wildtypen. Die Ergebnisse und der Vergleich der beiden Mausstämme deuten darauf hin, dass der Verlust von Kardiomyozyten ein zentraler Auslöser myokardialer Schädigung ist und die Immunzellinfiltration den Krankheitsverlauf mitbestimmt. Kompensationsmechanismen wie die Hypertrophie periläsionaler Kardiomyozyten verzögern den Funktionsverlust des Herzens, können aber eine fortschreitende Fibrosierung nicht verhindern. Der genetische Hintergrund und die herzkammerspezifische Genexpression beeinflussen die Progression der Erkrankung wesentlich. Therapeutisch erscheinen immunmodulatorische und antifibrotische Ansätze vielversprechend, um den fortschreitenden Gewebeumbau unabhängig vom genetischen Hintergrund zu bremsen. Zukünftig könnte eine personalisierte Behandlung, orientiert an dem genetischen Profil, molekularen Markern und kammerspezifischen Veränderungen, die Prognose der AC entscheidend verbessern.

8 Summary

Arrhythmogenic cardiomyopathy (AC) is a genetically determined heart muscle disease. Clinically, the disease shows high variability in both penetrance and symptomatology. It is characterized by palpitations, syncope, ventricular arrhythmias, or sudden cardiac death. Morphologically, it is defined by the loss of cardiomyocytes and their replacement with fibrous and fatty tissue. The cause is most often mutations in desmosomal proteins, which are involved in the mechanical coupling of cardiomyocytes as well as in signal transduction processes.

In this study, two mouse strains, FVBN and B6, were investigated. Both are constitutive, homozygous carriers of a mutated desmoglein 2 allele ($Dsg2^{mt}$), in which exons 4 to 6 are deleted. The aim of this study was to characterize and compare structural and molecular changes in the atria and ventricles during disease progression in FVBN mice and in the atria of B6 mice. For this purpose, FVBN $Dsg2^{mt/mt}$ and B6 $Dsg2^{mt/mt}$ mice aged 10-14 and 26-31 weeks were analyzed and compared to age-matched wild-type controls.

The study examined immune cell infiltration, cardiomyocyte hypertrophy, calcification, and fibrotic remodeling processes in atrial and ventricular myocardium. As early as week 10, FVBN $Dsg2^{mt/mt}$ mice exhibited localized areas of cardiomyocyte loss. These areas were shown by immunohistochemistry to be infiltrated by macrophages (F4/80, CD206, CD11b), dendritic cells (CD11c), and T cells (CD3). The inflammatory response accompanied fibrotic myocardial remodeling throughout disease progression. Calcifications were primarily observed in the atria and the right ventricle of FVBN $Dsg2^{mt/mt}$ mice.

Compensatory hypertrophy of perilesional cardiomyocytes was observed in the acute phase of the disease (age 10–14 weeks) as well as in the advanced stage (age 26-31 weeks) in the ventricles of FVBN $Dsg2^{mt/mt}$ mice. Concurrently, there was an increase in the expression of ventricle-specific stress and hypertrophy markers (BNP, Lgals3). In the atria of 10-14-week-old FVBN $Dsg2^{mt/mt}$ mice, cardiomyocyte diameters were significantly increased, whereas this was no longer the case in the 26–31 week age group, where the atrial myocardium had undergone fibrotic remodeling.

In B6 $Dsg2^{mt/mt}$ mice, a trend toward enlarged atrial cardiomyocytes was observed at 12-14 weeks of age, and by 26-28 weeks, the diameters were significantly increased compared to wild-type mice.

The results and the comparison of the two mouse strains suggest that the loss of cardiomyocytes is a central trigger of myocardial damage, and that immune cell infiltration significantly influences the course of the disease. Compensatory mechanisms such as hypertrophy of perilesional cardiomyocytes can delay the loss of cardiac function, but cannot prevent progressive fibrosis. The genetic background and chamber-specific gene expression significantly influence disease progression.

From a therapeutic perspective, immunomodulatory and antifibrotic strategies appear promising in slowing the progressive tissue remodeling regardless of genetic background. In the future, a personalized treatment approach, guided by genetic profile, molecular markers and chamber-specific changes, could significantly improve the prognosis of AC.

9 Literaturverzeichnis

1. Adela R., Banerjee S.K.: GDF-15 as a Target and Biomarker for Diabetes and Cardiovascular Diseases: A Translational Prospective. Journal of Diabetes Research (2015); 2015:490842
2. Al-Amoudi A., Frangakis A.S.: Structural studies on desmosomes. Biochemical Society Transactions (2008); 36(Pt 2):181-7
3. Ananthakrishna R., Moorthy N.: Dystrophic myocardial calcification. Indian Heart Journal (2016); 68 Suppl 2(Suppl 2):S180-S181
4. Arbelo E., Protonotarios A., Gimeno J.R., Arbustini E., Barriales-Villa R., Basso C., Bezzina C.R., Biagini E., Blom N.A., de Boer R.A., De Winter T., Elliott P.M., Flather M., Garcia-Pavia P., Haugaa K.H., Ingles J., Jurcut R.O., Klaassen S., Limongelli G., Loeys B., Mogensen J., Olivotto I., Pantazis A., Sharma S., Van Tintelen J.P., Ware J.S., Kaski J.P.: 2023 ESC Guidelines for the management of cardiomyopathies. European Heart Journal (2023); 44(37): 3503-3626.
5. Ashizawa N., Graf K., Do Y.S., Nunohiro T., Giachelli C.M., Meehan W.P., Tuan T.L., Hsueh W.A.: Osteopontin is produced by rat cardiac fibroblasts and mediates A(II)-induced DNA synthesis and collagen gel contraction. Journal of Clinical Investigation (1996); 98(10):2218-27
6. Asimaki A., Syrris P., Wichter T., Matthias P., Saffitz J.E., McKenna W.J.: A novel dominant mutation in plakoglobin causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. American Journal of Human Genetics (2007); 81(5):964-73
7. Asimaki A., Tandri H., Duffy E.R., Winterfield J.R., Mackey-Bojack S., Picken M.M., Cooper L.T., Wilber D.J., Marcus F.I., Basso C., Thiene G., Tsatsopoulou A., Protonotarios N., Stevenson W.G., McKenna W.J., Gautam S., Remick D.G., Calkins H., Saffitz J.E.: Altered desmosomal proteins in granulomatous myocarditis and potential pathogenic links to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Circulation. Arrhythmia and Electrophysiology (2011); 4(5):743-52
8. Austin K.M., Trembley M.A., Chandler S.F., Sanders S.P., Saffitz J.E., Abrams D.J., Pu W.T.: Molecular mechanisms of arrhythmogenic cardiomyopathy. Nature Reviews. Cardiology (2019); 16(9):519-537

9. Awad M.M., Calkins H., Judge D.P.: Mechanisms of disease: molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine (2008); 5:258–267
10. Basso C., Corrado D., Marcus F.I., Nava A., Thiene G.: Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Lancet (2009); 373(9671):1289-300
11. Basso C., Czarnowska E., Della Barbera M., Bauce B., Beffagna G., Wlodarska E. K., Pilichou K., Ramondo A., Lorenzon A., Wozniek O., Corrado D., Daliento L., Danieli G.A., Valente M., Nava A., Thiene G., Rampazzo A.: Ultrastructural evidence of intercalated disc remodelling in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: an electron microscopy investigation on endomyocardial biopsies. European Heart Journal (2006), 27(15):1847–1854
12. Basso C., Ronco F., Marcus F., Abudureheman A., Rizzo S., Frigo A.C., Bauce B., Maddalena F., Nava A., Corrado D., Grigoletto F., Thiene G.: Quantitative assessment of endomyocardial biopsy in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: an in vitro validation of diagnostic criteria. European Heart Journal (2008); 29(22):2760-71
13. Basso C., Thiene G., Corrado D., Angelini A., Nava A., Valente M.: Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Dysplasia, dystrophy, or myocarditis? Circulation (1996); 94(5):983-91
14. Basso C., Thiene G., Corrado D., Angelini A., Nava A., Valente M.: Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Dysplasia, dystrophy, or myocarditis? Circulation (1996) 94(5):983-91
15. Basso C., Thiene G.: Adipositas cordis, fatty infiltration of the right ventricle, and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Just a matter of fat? Cardiovascular Pathology (2005); 14(1):37-41
16. Bauce B., Rampazzo A., Basso C., Mazzotti E., Rigato I., Steriotis A., Beffagna G., Lorenzon A., De Bortoli M., Pilichou K., Marra M.P., Corbetti F., Daliento L., Iliceto S., Corrado D., Thiene G., Nava A.: Clinical phenotype and diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in pediatric patients carrying desmosomal gene mutations. Heart Rhythm (2011); 8(11):1686-1695
17. Bays J.L., Peng X., Tolbert C.E., Guilluy C., Angell A.E., Pan Y., Superfine R., Burridge K., DeMali K.A.: Vinculin phosphorylation differentially regulates

mechanotransduction at cell-cell and cell-matrix adhesions. The Journal of Cell Biology (2014); 205(2):251-63

18. Beffagna G., De Bortoli M., Nava A., Salamon M., Lorenzon A., Zaccolo M., Mancuso L., Sigalotti L., Bauce B., Occhi G., Basso C., Lanfranchi G., Towbin J.A., Thiene G., Danieli G.A., Rampazzo A.: Missense mutations in desmocollin-2 N-terminus, associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, affect intracellular localization of desmocollin-2 in vitro. BMC Medical Genetics (2007); 8:65
19. Beffagna G., Occhi G., Nava A., Vitiello L., Ditadi A., Basso C., Bauce B., Carraro G., Thiene G., Towbin J.A., Danieli G.A., Rampazzo A.: Regulatory mutations in transforming growth factor-beta3 gene cause arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 1. Cardiovascular Research (2005); 65(2):366-73
20. Berin M. C., Mayer L.: Can we produce true tolerance in patients with food allergy. Journal of Allergy and Clinical Immunology (2013) 131(1): 14-22.
21. Berkowitz P., Chua M., Liu Z., Diaz L.A., Rubenstein D.S.: Auto- antibodies in the autoimmune disease pemphigus foliaceus induce blistering via p38 mitogen-activated protein kinase-dependent signaling in the skin. The American Journal of Pathology (2008); 173(6):1628–1636
22. Bernardo B.C., Weeks K.L., Pretorius L., McMullen J.R.: Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. Pharmacology and Therapeutics (2010); 128(1):191-227
23. Bers D.M.: Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. Physiology, Bethesda (2006); 21:380-387
24. Bers D.M.: Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction. Annual Review of Physiology (2014); 76:107-27
25. Bertoli-Avella A.M., Gillis E., Morisaki H., Verhagen J.M.A., de Graaf B.M., van de Beek G., Gallo E., Kruithof B.P.T., Venselaar H., Myers L.A., Laga S., Doyle A.J., Oswald G., van Cappellen G.W.A., Yamanaka I., van der Helm R.M., Beverloo B., de Klein A., Pardo L., Lammens M., Evers C., Devriendt K., Dumoulein M., Timmermans J., Bruggenwirth H.T., Verheijen F., Rodrigus I., Baynam G., Kempers M., Saenen J., Van Craenenbroeck E.M., Minatoya K., Matsukawa R., Tsukube T., Kubo N., Hofstra R., Goumans M.J., Bekkers J.A., Roos-Hesselink J.W., van de Laar I.M.B.H.,

Dietz H.C., Van Laer L., Morisaki T., Wessels M.W., Loeys B.L.: Mutations in a TGF-β ligand, TGFB3, cause syndromic aortic aneurysms and dissections. Journal of the American College of Cardiology (2015); 65(13):1324-1336

26. Borland G., Ross J. A., Guy K.: Forms and functions of CD44. Immunology (1998) 9:139-148.
27. Borrmann C.M., Grund C., Kuhn C., Hofmann I., Pieperhoff S., Franke W.W.: 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 (2006); 85(6):469-85
28. Brown L.F., Berse B., Van de Water L., Papadopoulos-Sergiou A., Perruzzi C.A., Manseau E.J., Dvorak H.F., Senger D.R.: Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. Molecular Biology of the Cell (1992); 3(10):1169-80
29. Bruneau B.G., Logan M., Davis N., Levi T., Tabin C.J., Seidman J.G., Seidman C.E.: Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt-Oram syndrome. Developmental Biology (1999); 211(1):100-8
30. Bujak M., Dobaczewski M., Gonzalez-Quesada C., Xia Y., Leucker T., Zymek P., Veeranna V., Tager A.M., Luster A.D., Frangogiannis N.G.: Induction of the CXC chemokine interferon-gamma-inducible protein 10 regulates the reparative response following myocardial infarction. Circulation Research (2009); 105(10):973-83
31. Bujak M., Frangogiannis N.G.: The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. Cardiovascular Research (2007); 74(2):184-95
32. Campian M.E., Verberne H.J., Hardziyenka M., de Groot E.A., van Moerkerken A.F., van Eck-Smit B.L., Tan H.L.: Assessment of inflammation in patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging (2010) 37(11):2079-2085
33. Campuzano O., Alcalde M., Iglesias A., Barahona-Dussault C., Sarquella-Brugada G., Benito B., Arzamendi D., Flores J., Leung T.K., Talajic M., Oliva

A., Brugada R.: Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: severe structural alterations are associated with inflammation. Jounal of Clinical Pathology (2012); 65(12):1077-83.

34. Carvajal-Huerta L.: Epidermolytic palmoplantar keratoderma with woolly hair and dilated cardiomyopathy. Jounal of the American Academy of Dermatology (1998); 39(3):418-21
35. Chelko S.P., Asimaki A., Andersen P., Bedja D., Amat-Alarcon N., DeMazumder D., Jasti R., MacRae C.A., Leber R., Kleber A.G., Saffitz J.E., Judge D.P.: Central role for GSK3β in the pathogenesis of arrhythmogenic cardiomyopathy. JCI Insight (2016); 1(5):e85923
36. Chelko S.P., Asimaki A., Lowenthal J., Bueno-Beti C., Bedja D., Scalco A., Amat-Alarcon N., Andersen P., Judge D.P., Tung L., Saffitz J.E.: Therapeutic Modulation of the Immune Response in Arrhythmogenic Cardiomyopathy. Circulation (2019); 140(18):1491-1505
37. Chen S.N., Gurha P., Lombardi R., Ruggiero A., Willerson J.T., Marian A.J.: The hippo pathway is activated and is a causal mechanism for adipogenesis in arrhythmogenic cardiomyopathy. Circulation Research (2014); 114(3):454-68
38. Chen X., Bonne S., Hatzfeld M., van Roy F., Green K.J.: Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and beta -catenin signaling. Jounal of Biological Chemistry (2002); 277: 10512–22
39. Chistiakov D.A., Killingsworth M.C., Myasoedova V.A., Orekhov A.N., Bobryshev Y.V.: CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. Laboratory Investigation a journal of technical methods and pathology (2017); 97(1):4-13
40. Chow S.L., Maisel A.S., Anand I., Bozkurt B., de Boer R.A., Felker G.M., Fonarow G.C., Greenberg B., Januzzi J.L. Jr, Kiernan M.S., Liu P.P., Wang T.J., Yancy C.W., Zile M.R: American Heart Association Clinical Pharmacology Committee of the Council on Clinical Cardiology; Council on Basic Cardiovascular Sciences; Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Cardiopulmonary, Critical Care, Perioperative and Resuscitation; Council on Epidemiology and Prevention; Council on Functional Genomics and Translational Biology; and Council on Quality of Care and Outcomes

Research. Role of Biomarkers for the Prevention, Assessment, and Management of Heart Failure: A Scientific Statement From the American Heart Association. Circulation (2017); 135(22):e1054-e1091

41. Corrado D., Basso C., Judge D.P.: Arrhythmogenic Cardiomyopathy. Circulation Research (2017); 121(7):784-802
42. Corrado D., Basso C., Rizzoli G., Schiavon M., Thiene G.: Does sports activity enhance the risk of sudden death in adolescents and young adults? Journal of the American College of Cardiology (2003); 42(11):1959-63
43. Corrado D., Perazzolo Marra M., Zorzi A., Beffagna G., Cipriani A., Lazzari M., Migliore F., Pilichou K., Rampazzo A., Rigato I., Rizzo S., Thiene G., Anastasakis A., Asimaki A., Bucciarelli-Ducci C., Haugaa K.H., Marchlinski F.E., Mazzanti A., McKenna W.J., Pantazis A., Pelliccia A., Schmied C., Sharma S., Wichter T., Bauce B., Basso C.: Diagnosis of arrhythmogenic cardiomyopathy: The Padua criteria. International Journal of Cardiology (2020); 319:106-114.
44. Corrado D., Thiene G., Nava A., Rossi L., Pennelli N.: Sudden death in young competitive athletes: clinicopathologic correlations in 22 cases. The American Journal of Medicine (1990);
45. Corrado D., Thiene G.: Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: clinical impact of molecular genetic studies. Circulation (2006); 113(13):1634-7
46. Corrado D., Wichter T., Link M.S., Hauer R.N., Marchlinski F.E., Anastasakis A., Bauce B., Basso C,. Brunckhorst C., Tsatsopoulou A., Tandri H., Paul M., Schmied C., Pelliccia A., Duru F., Protonotarios N., Estes N.M. 3rd, McKenna W.J., Thiene G., Marcus F.I., Calkins H.: Treatment of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: An International Task Force Consensus Statement. Circulation. (2015); 132(5):441-53
47. Cruz F.M., Sanz-Rosa D., Roche-Molina M., García-Prieto J., García-Ruiz J.M., Pizarro G., Jiménez-Borreguero L.J., Torres M., Bernad A., Ruíz-Cabello J., Fuster V., Ibáñez B., Bernal J.A.: Exercise triggers ARVC phenotype in mice expressing a disease-causing mutated version of human plakophilin-2. Journal of the American College of Cardiology (2015); 65(14):1438-50

48. Dalal D., Jain R., Tandri H., Dong J., Eid S.M., Prakasa K., Tichnell C., James C., Abraham T., Russell S.D., Sinha S., Judge D.P., Bluemke D.A., Marine J.E., Calkins H.: Long-term efficacy of catheter ablation of ventricular tachycardia in patients with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Journal of the American College of Cardiology (2007); 50(5):432-40
49. de Boer R.A., Voors A.A., Muntendam P., van Gilst W.H., van Veldhuisen D.J.: Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression. European Journal of Heart Failure (2009) 11(9):811-7
50. Delmar M., McKenna W.J.: The cardiac desmosome and arrhythmogenic cardiomyopathies: from gene to disease. Circulation Research (2010); 107(6):700-14
51. Delva E., Kowalczyk A. P.: Regulation of cadherin trafficking. Traffic. (2009) 10(3): 259–267
52. East L., Isacke C.M.: The mannose receptor family. Biochim Biophys Acta. 2002 Sep 19;1572(2-3):364-86
53. Eberth C.J.: Die Elemente der quergestreiften Muskeln. Archiv für pathol. Anatomie (1866); 37:100-124
54. Epstein A.E., DiMarco J.P., Ellenbogen K.A., Estes N.A. 3rd, Freedman R.A., Gettes L.S., Gillinov A.M., Gregoratos G., Hammill S.C., Hayes D.L., Hlatky M.A., Newby L.K., Page R.L., Schoenfeld M.H., Silka M.J., Stevenson L.W., Sweeney M.O., Smith S.C. Jr, Jacobs A.K., Adams C.D., Anderson J.L., Buller C.E., Creager M.A., Ettinger S.M., Faxon D.P., Halperin J.L., Hiratzka L.F., Hunt S.A., Krumholz H.M., Kushner F.G., Lytle B.W., Nishimura R.A., Ornato J.P., Page R.L., Riegel B., Tarkington L.G., Yancy C.W.; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the ACC/AHA/NASPE 2002 Guideline Update for Implantation of Cardiac Pacemakers and Antiarrhythmia Devices); American Association for Thoracic Surgery; Society of Thoracic Surgeons. ACC/AHA/HRS 2008 Guidelines for Device-Based Therapy of Cardiac Rhythm Abnormalities: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the ACC/AHA/NASPE 2002 Guideline Update for Implantation of Cardiac Pacemakers and Antiarrhythmia Devices): developed in collaboration with

the American Association for Thoracic Surgery and Society of Thoracic Surgeons. Circulation (2008); 117(21):e350-408

55. Erickson H.P.: Tenascin-C, tenascin-R and tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions. Current Opinion in Cell Biology (1993); 5(5):869-76
56. Fabritz L., Fortmueller L., Gehmlich K., Kant S., Kemper M., Kucerova D., Syeda F., Faber C., Leube R.E., Kirchhof P., Krusche C.A.: Endurance Training Provokes Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Phenotype in Heterozygous Desmoglein-2 Mutants: Alleviation by Preload Reduction. Biomedicines (2024); 12(5):985
57. Feldman M.D., Copelas L., Gwathmey J.K., Phillips P., Warren S.E., Schoen F.J., Grossman W., Morgan J.P.: Deficient production of cyclic AMP: pharmacologic evidence of an important cause of contractile dysfunction in patients with end-stage heart failure. Circulation (1987); 75(2):331-9
58. Fierer J.A., Wagner B.M., Strebel R.F.: Metastatic calcification of the myocardium. The American Jounal of Cardiology (1970); 26(4):423-6.
59. Fitzpatrick L.A., Severson A., Edwards W.D., Ingram R.T.: Diffuse calcification in human coronary arteries. Association of osteopontin with atherosclerosis. Journal of Clinical Investigation (1994); 94(4):1597-604
60. Flurkey K., Currer J.M., Harrison D.E.: Chapter 20—Mouse Models in Aging Research. In The Mouse in Biomedical Research, 2nd ed.; Fox J.G., Davisson M.T., Quimby F.W., Barthold S.W., Newcomer C.E., Smith A.L., Eds.; Academic Press: Burlington, NJ, USA (2007); pp. 637–672
61. Forbes M.S., Sperelakis N.: Intercalated discs of mammalian heart: a review of structure and function. Tissue and Cell (1985); 17(5):605-48
62. Franco D., Lamers W. H., Moorman A. F. M.: Patterns of expression in the developing myocardium: towards a morphologically integrated transcriptional model. Cardiovascular Research (1998); 38(1): 25–53
63. Frank K., Kranias E.G..: Phospholamban and cardiac contractility. Annals of Medicine (2000); 32(8):572-8
64. Frank R., Fontaine G., Vedel J., Mialet G., Sol C., Guiraudon G., Grosgogeat Y.: Electrocardiologie de quatre cas de dysplasie ventriculaire droite arythmogène [Electrocardiology of 4 cases of right ventricular dysplasia

inducing arrhythmia]. Archives de Maladies du Coeur et des Vaisseaux (1978); 71(9):963-72

65. Franke W.W., Borrmann C.M., Grund C., Pieperhoff S.: 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 (2006); 85(2):69-82.
66. Freundlich I.M., Lind T.A.: Calcification of the heart and great vessels. CRC Critical Reviews in Clinical Radiology and Nuclear Medicine (1975); 6(2):171-216
67. Fu X., Khalil H., Kanisicak O., Boyer J.G., Vagnozzi R.J., Maliken B.D., Sargent M.A., Prasad V., Valiente-Alandi I., Blaxall B.C., Molkentin J.D.: Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart. The Journal of Clinical Investigation (2018); 128(5):2127-2143 68.
68. Gaisler-Silva F., Junho C.V.C., Fredo-da-Costa I., Christoffolete M.A., Carneiro-Ramos M.S.: Diet-induced Obesity Differentially Modulates Cardiac Inflammatory Status in the C57 and FVB Mouse Strains. Current Molecular Medicine (2022); 22(4):365-373
69. George K., Whyte G.P., Green D.J., Oxborough D., Gaze D., Somauroo J.: The endurance athletes heart: acute stress and chronic adaptation. British Journal of Sports Medicine (2012); 46:29-36
70. Gerçek M., Gerçek M., Kant S., Simsekyilmaz S., Kassner A., Milting H., Liehn E.A., Leube R.E., Krusche C.A.: Cardiomyocyte Hypertrophy in Arrhythmogenic Cardiomyopathy. The American Journal of Pathology (2017); 187(4):752-766.
71. Gerull B., Heuser A., Wichter T., Paul M., Basson C.T., McDermott D.A., Lerman B.B., Markowitz S.M., Ellinor P.T., MacRae C.A., Peters S., Grossmann K.S., Drenckhahn J., Michely B., Sasse-Klaassen S., Birchmeier W., Dietz R., Breithardt G., Schulze-Bahr E., Thierfelder L.: Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Nature Genetics (2004); 36(11):1162-4

72. Getsios S., Huen A. C., Green K. J.: Working out the strength and flexibility of desmosomes. Nature Reviews, Molecular Cell Biology (2004) 5(4): 271–281
73. Goumans M.-J., ten Dijke P.: TGF-β Signaling in Control of Cardiovascular Function. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology (2018) 10: 1-.39.
74. Gowda R.M., Boxt L.M.: Calcifications of the heart. Radiologic Clinics of North America (2004); 42(3):603-17
75. Graf K., Do Y.S., Ashizawa N., Meehan W.P., Giachelli C.M., Marboe C.C., Fleck E., Hsueh W.A.: Myocardial osteopontin expression is associated with left ventricular hypertrophy. Circulation (1997); 96(9):3063-71
76. Grossman W., Jones D., McLaurin L.P.: Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. The Journal of Clinical Investigation (1975); 56(1):56-64
77. Guo H., Cai C.Q., Schroeder R.A., Kuo P.C.: Osteopontin is a negative feedback regulator of nitric oxide synthesis in murine macrophages. Journal of Immunology (2001); 166(2):1079-86
78. Guo H., Lu Y.W., Lin Z., Huang Z.P., Liu J., Wang Y., Seok H.Y., Hu X., Ma Q., Li K., Kyselovic J., Wang Q., Lin J.L., Lin J.J., Cowan D.B., Naya F., Chen Y., Pu W.T., Wang D.Z. Intercalated disc protein Xinβ is required for Hippo-YAP signaling in the heart. Nature Communications (2020); 11(1):4666
79. Gwathmey J.K., Copelas L., MacKinnon R., Schoen F.J., Feldman M.D., Grossman W., Morgan J.P.: Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. Circulation Research (1987); 61(1):70-6
80. Haddad F., Doyle R., Murphy D.J., Hunt S.A.: Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure. Circulation (2008); 117: 1717-1731
81. Haj Salem N., Mesrati M.A., Hadhri R., Besbes S., Belhadj M., Aissaoui A., Zakhama A., Chadly A.: Arrhythomgenic right ventricular dysplasia and sudden death: An autopsy and histological study. Annales de Cardiologie et Angeiologie (2015); 64(4):249-54
82. Hall C.: NT-ProBNP: The Mechanism Behind the Marker. Journal of Cardiac Failure (2005). 11:81-83

83. Harmon R.M., Green K.J.: Structural and Functional Diversity of Desmosomes. Cell Communication & Adhesion (2013); 20(6):171-187
84. Harris A.L.: Connexin specificity of second messenger permeation: real numbers at last. The Journal of General Physiology (2008); 131(4):287-92
85. Hemmati-Brivanlou A., Frank D., Bolce M.E., Brown B.D., Sive H.L., Harland R.M.: Localization of specific mRNAs in Xenopus embryos by whole-mount in situ hybridization. Development (1990); 110(2):325-30
86. Hirschy A., Croquelois A., Perriard E., Schoenauer R., Agarkova I., Hoerstrup S.P., Taketo M.M., Pedrazzini T., Perriard J.C., Ehler E.: Stabilised beta-catenin in postnatal ventricular myocardi- um leads to dilated cardiomyopathy and premature death. Basic Research in Cardiology (2010); 105(5):597–608
87. Höfler H.: What's new in "in situ hybridization". Pathology, Research and Practice (1987); 182(3):421-30
88. Holthöfer B., Windoffer R., Troyanovsky S., Leube R. E.: Structure an Function of Desmosomes. International Review of Cytology (2007) 264: 65–163
89. Içer M. A., Gezmen-Karadag: The multiple functions an mechanism of osteopontin. Manuscript on Clinical Biochemistry (2018); 59:17-24
90. Imanaka-Yoshida K., Hiroe M., Nishikawa T., Ishiyama S., Shimojo T., Ohta Y., Sakakura T., Yoshida T.: Tenascin-C modulates adhesion of cardiomyocytes to extracellular matrix during tissue remodeling after myocardial infarction. Laboratory Investigation (2001); 81(7):1015-24
91. Imanaka-Yoshida K., Hiroe M., Yoshida T.: Interaction between cell and extracellular matrix in heart disease: multiple roles of tenascin-C in tissue remodeling. Histology and Histopathology (2004); 19(2):517-25
92. Imanaka-Yoshida K., Matsumoto K., Hara M., Sakakura T., Yoshida T.: The dynamic expression of tenascin-C and tenascin-X during early heart development in the mouse. Differentiation (2003); 71(4-5):291-8
93. Imanaka-Yoshida K.: Tenascin-C in Heart Diseases-The Role of Inflammation. International Journal of Molecular Sciences (2021); 22(11):5828

94. Judge D.P.: Cardiovascular genetics provides new insights for early onset arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Heart Rhythm (2011); 8(11):1696-7
95. Kant S., Freytag B., Herzog A., Reich A., Merkel R., Hoffmann B., Krusche C.A., Leube R.E.: Desmoglein 2 mutation provokes skeletal muscle actin expression and accumulation at intercalated discs in murine hearts. Journal of Cell Science (2019); 132(5):jcs199612
96. Kant S., Holthöfer B., Magin T.M., Krusche C.A., Leube R.E.: Desmoglein 2-Dependent Arrhythmogenic Cardiomyopathy Is Caused by a Loss of Adhesive Function. Circulation. Cardiovascular Genetics (2015); 8(4):553-63
97. Kant S., Krull P., Eisner S., Leube R.E., Krusche C.A.: Histological and ultrastructural abnormalities in murine desmoglein 2-mutant hearts. Cell and Tissue Research (2012): 348:249–259
98. Kempf T., von Haehling S., Peter T., Allhoff T., Cicoira M., Doehner W., Ponikowski P., Filippatos G.S., Rozentryt P., Drexler H., Anker S.D., Wollert K.C.: Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure. Journal of the American College of Cardiology (2007); 50(11):1054-60
99. Kim H.R., Lin H.M., Biliran H., Raz A.: Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. Cancer Research (1999) 59(16):4148-4154
100. Kirchhof P., Fabritz L., Zwiener M., Witt H., Schäfers M., Zellerhoff S., Paul M., Athai T., Hiller K.H., Baba H.A., Breithardt G., Ruiz P., Wichter T., Levkau B.: Age- and training-dependent development of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in heterozygous plakoglobin-deficient mice. Circulation (2006); 114(17):1799-806
101. Koitabashi N., Danner T., Zaiman A.L., Pinto Y.M., Rowell J., Mankowski J., Zhang D., Nakamura T., Takimoto E., Kass D.A.: Pivotal role of cardiomyocyte TGF-β signaling in the murine pathological response to sustained pressure overload. The Journal of Clinical Investigation (2011); 121(6):2301-12

102. Konstantinidis K., Whelan R.S., Kitsis R.N.: Mechanisms of cell death in heart disease. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology (2012); 32(7):1552-62

103. Krusche C.A., Holthofer B., Hofe V., van de Sandt A.M., Eshkind L., Bockamp E., Merx M.W., Kant S., Windoffer R., Leube R.E.: Desmoglein 2 mutant mice develop cardiac fibrosis and dilation. Basic Research in Cardiology (2011); 106:617-633

104. Kung G., Konstantinidis K., Kitsis R.N.: Programmed necrosis, not apoptosis, in the heart. Circulation Research (2011); 108(8):1017-36

105. Kuzela D.C., Huffer W.E., Conger J.D., Winter S.D., Hammond W.S.: Soft tissue calcification in chronic dialysis patients. The American Jounal of Pathology (1977); 86(2):403-24

106. Lala R. I., Lungeanu D., Darabantiu D., Pilat L., Puschita M.: Galectin-3 as a marker for clinical prognosis and cardiac remodeling in acute heart failure. Herz (2018) 43:146-155

107. Lancisi G.M.: De Motu Cordis et Aneurysmatibus Opus Posthumum In Duas Partes Divisum. Naples (1736)

108. Lanza A., Cirillo N., Rossiello R., Rienzo M., Cutillo L., Casamassimi A., de Nigris F., Schiano C., Rossiello L., Femiano F., Gombos F., Napoli C.: Evidence of key role of Cdk2 overexpression in pemphigus vulgaris. The Journal of Biological Chemistry (2008); 283(13):8736–8745

109. Lemola K., Brunckhorst C., Helfenstein U., Oechslin E., Jenni R., Duru F.: Predictors of adverse outcome in patients with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: long term experience of a tertiary care centre. Heart (2005); 91(9):1167-72

110. Lin H.H., Stacey M., Stein-Streilein J., Gordon S.: The Macrophage-Specific Adhesion-GPCR and its Role in Immunoregulation. Advances in Experimental Medicine and Biology (2010) 706:149-156

111. Lindner M., Brandt M.C., Sauer H., Hescheler J., Böhle T., Beuckelmann D.J. Calcium sparks in human ventricular cardiomyocytes from patients with terminal heart failure. Cell Calcium (2002); 31(4):175-82

112. Liu Y.H., D'Ambrosio M., Liao T.D., Peng H., Rhaleb N.E., Sharma U., André S., Gabius H.J., Carretero O.A.: N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline prevents cardiac remodeling and dysfunction induced by galectin-3, a

mammalian adhesion/growth-regulatory lectin. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology (2009) 296(2):404-412

113. Lorenzon A., Beffagna G., Bauce B., De Bortoli M., Li Mura I.E., Calore M., Dazzo E., Basso C., Nava A., Thiene G., Rampazzo A.: Desmin mutations and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. American Journal of Cardiology (2013); 111(3):400-5

114. Lubos N., van der Gaag S., Gerçek M., Kant S., Leube R., Krische C. A.: Inflammation shapes pathogenesis of murine arrythmogenic cardiomyopathy. Basic Reaserch in Cardiology (2020); 115:42

115. Lyons G.E.: Vertebrate heart development. Current Opinion in Genetics and Developement (1996); 6(4):454-60

116. Mansueto G., Benincasa G., Capasso E., Graziano V., Russo M., Niola M., Napoli C., Buccelli C.: Autoptic findings of sudden cardiac death (SCD) in patients with arrhythmogenic ventricular cardiomiopathy (AVC) from left ventricle and biventricular involvement. Pathology, Research and Practice (2020); 216(12):153269

117. Marcus F.I., Fontaine G.H., Guiraudon G., Frank R., Laurenceau J.L., Malergue C., Grosgogeat Y. Right ventricular dysplasia: a report of 24 adult cases. Circulation (1982); 65(2):384-98

118. Marcus F.I., McKenna W.J., Sherrill D., Basso C., Bauce B., Bluemke D.A., Calkins H., Corrado D., Cox M.G., Daubert J.P., Fontaine G., Gear K., Hauer R., Nava A., Picard M.H., Protonotarios N., Saffitz J.E., Sanborn D.M., Steinberg J.S., Tandri H., Thiene G., Towbin J.A., Tsatsopoulou A., Wichter T., Zareba W.: Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: proposed modification of the task force criteria. Circulation (2010); 121(13):1533-41

119. Marcus F.I., Zareba W., Calkins H., Towbin J.A., Basso C., Bluemke D.A., Estes N.A. 3rd, Picard M.H., Sanborn D., Thiene G., Wichter T., Cannom D., Wilber D.J., Scheinman M., Duff H., Daubert J., Talajic M., Krahn A., Sweeney M., Garan H., Sakaguchi S., Lerman B.B., Kerr C., Kron J., Steinberg J.S., Sherrill D., Gear K., Brown M., Severski P., Polonsky S., McNitt S.: Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia clinical presentation and diagnostic evaluation: results from the North American Multidisciplinary Study. Heart Rhythm (2009); 6(7):984-92

120. Marcus G.M., Glidden D.V., Polonsky B., Zareba W., Smith L.M., Cannom D.S., Estes N.A. 3rd, Marcus F., Scheinman M.M.: Multidisciplinary Study of Right Ventricular Dysplasia Investigators. Efficacy of antiarrhythmic drugs in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a report from the North American ARVC Registry. Journal of the American College of Cardiology (2009); 54(7):609-15
121. Matsui K., Torii S., Hara S., Maruyama K., Arai T., Imanaka-Yoshida K.: Tenascin-C in Tissue Repair after Myocardial Infarction in Humans. International Journal of Molecular Sciences (2023); 24(12):10184
122. Mavroidis M., Capetanaki Y.: Extensive induction of important mediators of fibrosis and dystrophic calcification in desmin-deficient cardiomyopathy. American Journal of Pathology (2002); 160(3):943-52
123. Mayosi B.M., Fish M., Shaboodien G., Mastantuono E., Kraus S., Wieland T., Kotta M.C., Chin A., Laing N., Ntusi N.B., Chong M., Horsfall C., Pimstone S.N., Gentilini D., Parati G., Strom T.M., Meitinger T., Pare G., Schwartz P.J., Crotti L.: Identification of Cadherin 2 (CDH2) Mutations in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. Circulacion. Cardiovascular Genetetics (2017); 10(2):e001605
124. McClure J., Pieterse A.S., Pounder D.J., Smith P.S.: Myocardial fibre calcification. Journal of Clinical Pathology (1981); 34(10):1167-74
125. McKoy G., Protonotarios N., Crosby A., Tsatsopoulou A., Anastasakis A., Coonar A., Norman M., Baboonian C., Jeffery S., McKenna W.J.: Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). Lancet (2000); 355(9221):2119-24
126. McKoy G., Protonotarios N., Crosby A., Tsatsopoulou A., Anastasakis A., Coonar A., Norman M., Baboonian C., Jeffery S., McKenna W.J.: Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). Lancet (2000); 355(9221):2119-24
127. Meng W., Takeichi M.: Adherens junction: molecular architecture and regulation. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology (2009); 1(6):a002899
128. Meraviglia V., Alcalde M., Campuzano O., Bellin M.: Inflammation in the Pathogenesis of Arrhythmogenic Cardiomyopathy: Secondary Event or

Active Driver? Frontiers in Cardiovascular Medicine (2021); 20;8:784715

129. Merner N.D., Hodgkinson K.A., Haywood A.F., Connors S., French V.M., Drenckhahn J.D., Kupprion C., Ramadanova K., Thierfelder L., McKenna W., Gallagher B., Morris-Larkin L., Bassett A.S., Parfrey P.S., Young T.L.: Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 5 is a fully penetrant, lethal arrhythmic disorder caused by a missense mutation in the TMEM43 gene. American Journal of Human Genetics (2008); 82(4):809-21

130. Midwood K.S., Hussenet T., Langlois B., Orend G.: Advances in tenascin-C biology. Cellular and Molecular Life Sciences (2011); 68(19):3175-99

131. Miyauchi A., Alvarez J., Greenfield E.M., Teti A., Grano M., Colucci S., Zambonin-Zallone A., Ross F.P., Teitelbaum S.L., Cheresh D., et al.: Recognition of osteopontin and related peptides by an alpha v beta 3 integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. The Journal of Biological Chemistry (1991); 266(30):20369-74

132. Mouton A.J., DeLeon-Pennell K.Y., Rivera Gonzalez O.J., Flynn E.R., Freeman T.C., Saucerman J.J., Garrett M.R., Ma Y., Harmancey R., Lindsey M.L.: Mapping macrophage polarization over the myocardial infarction time continuum. Basic Research in Cardiology (2018); 113(4):26

133. Murry C.E., Giachelli C.M., Schwartz S.M., Vracko R.: Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. American Journal of Pathology (1994); 145(6):1450-62

134. Nance J. W., Crane G. M., MD, Halushka M. K., Fishman E. K., Zimmerman S. L.: Myocardial calcifications: Pathophysiology, etiologies, differential diagnoses, and imaging findings. (2015) 9 (1): 58-67

135. Nance J.W. Jr., Crane G.M., Halushka M.K., Fishman E.K., Zimmerman S.L.: Myocardial calcifications: pathophysiology, etiologies, differential diagnoses, and imaging findings. Journal of Cardiovasc Computed Tomography (2015); 9(1):58-67

136. Nava A., Bauce B., Basso C., Muriago M., Rampazzo A., Villanova C., Daliento L., Buja G., Corrado D., Danieli G.A., Thiene G.: Clinical profile and long-term follow-up of 37 families with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Journal of the American College of Cardiology (2000); 36(7):2226-33

137. Nielsen M.S., van Opbergen C.J.M., van Veen T.A.B., Delmar M.: The intercalated disc: a unique organelle for electromechanical synchrony in cardiomyocytes. Physiological Reviews. (2023); 103(3):2271-2319

138. Nolan T., Hands R.E., Bustin S.A.: Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nature Protocols (2006); 1(3):1559-82

139. Norgett E.E., Hatsell S.J., Carvajal-Huerta L., Cabezas J.C., Common J., Purkis P.E., Whittock N., Leigh I.M., Stevens H.P., Kelsell D.P.: Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma. Human Molecular Genetics (2000); 9(18):2761-6

140. Norman M., Simpson M., Mogensen J., Shaw A., Hughes S., Syrris P., Sen-Chowdhry S., Rowland E., Crosby A., McKenna W.J. Novel mutation in desmoplakin causes arrhythmogenic left ventricular cardiomyopathy. Circulation (2005); 112(5):636-42

141. North A.J., Bardsley W.G., Hyam J., Bornslaeger E.A., Cordingley H.C., Trinnaman B., Hatzfeld M., Green K.J., Magee A.I., Garrod D.R.: Molecular map of the desmosomal plaque. Journal of Cell Science (1999); 112(23):4325-36

142. Obergassel J., O'Reilly M., Sommerfeld L.C., Kabir S.N., O'Shea C., Syeda F., Eckardt L., Kirchhof P., Fabritz L.: Effects of genetic background, sex, and age on murine atrial electrophysiology. Europace (2021); 7;23(6):958-969

143. Parvari R., Levitas A.: The mutations associated with dilated cardiomyopathy. BiochemicaL Research International (2012); 2012:1-12

144. Patarca R., Saavedra R.A., Cantor H.: Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. Critical Reviews of Immunology (1993); 13(3-4):225-46

145. Peng D., Fu M., Wang M., Wei Y., Wei X.: Targeting TGF-β signal transduction for fibrosis and cancer therapy. Molecular Cancer (2022) 21:104.

146. Peters S., Trümmel M., Meyners W.: Prevalence of right ventricular dysplasia-cardiomyopathy in a non-referral hospital. International Journal of Cardiology (2004); 97(3):499-501

147. Pieperhoff S., Franke W.W.: The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates - IV: coalescence and amalgamation of desmosomal and adhaerens junction components - late processes in mammalian heart development. European Journal of Cell Biology (2007); 86(7): 377-91

148. Pilichou K., Nava A., Basso C., Beffagna G., Bauce B., Lorenzon A., Frigo G., Vettori A., Valente M., Towbin J., Thiene G., Danieli G.A., Rampazzo A.: Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Circulation (2006); 113(9):1171-9

149. Pilichou K., Remme C.A., Basso C., Campian M.E., Rizzo S., Barnett P., Scicluna B.P., Bauce B., van den Hoff M.J., de Bakker J.M., LSEPTan H.L., Valente M., Nava A., Wilde A.A., Moorman A.F., Thiene G., Bezzina C.R.: Myocyte necrosis underlies progressive myocardial dystrophy in mouse dsg2-related arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Jounal of Experimental Medicine (2009): 206:1787–1802.

150. Pinamonti B., Brun F., Mestroni L., Sinagra G.: Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: From genetics to diagnostic and therapeutic challenges. World Journal of Cardiology (2014); 6(12):1234-44

151. Pinamonti B., Brun F., Mestroni L., Sinagra G.: Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: From genetics to diagnostic and therapeutic challenges. World Journal of Cardiology (2014); 6(12):1234-44

152. Pitsch M., Kant S., Mytzka C., Leube R.E., Krusche C.A.: Autophagy and Endoplasmic Reticulum Stress during Onset and Progression of Arrhythmogenic Cardiomyopathy. Cells (2021); 11(1):96

153. Piven O.O., Kostetskii I.E., Macewicz L.L., Kolomiets Y.M., Radice G.L., Lukash L.L.: Requirement for N-cadherin-catenin complex in heart development. Experimental Biology and Medicine (Maywood) (2011); 236(7):816-22

154. Posch M.G., Posch M.J., Geier C., Erdmann B., Mueller W., Richter A., Ruppert V., Pankuweit S., Maisch B., Perrot A., Buttgereit J., Dietz R., Haverkamp W., Ozcelik C.: A missense variant in desmoglein-2 predisposes to dilated cardiomyopathy. Molecular Genetics and Metabolism (2008); 95:74–80

155. Prabhu S.D., Frangogiannis N.G.: The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. Circulation Research (2016); 119(1):91-112

156. Protonotarios N., Tsatsopoulou A., Patsourakos P., Alexopoulos D., Gezerlis P., Simitsis S., Scampardonis G.: Cardiac abnormalities in familial palmoplantar keratosis. British Heart Journal (1986); 56(4):321-6

157. Pruna M., Ehler E.: The intercalated disc: a mechanosensing signalling node in cardiomyopathy. Biophysical Reviews (2020); 12(4):931-946

158. Psarras S., Beis D., Nikouli S., Tsikitis M., Capetanaki Y.: Three in a Box: Understanding Cardiomyocyte, Fibroblast, and Innate Immune Cell Interactions to Orchestrate Cardiac Repair Processes. Frontiers in Cardiovascular Medicine (2019); 6:32

159. Psarras S., Mavroidis M., Sanoudou D., Davos C.H., Xanthou G., Varela A.E., Panoutsakopoulou V., Capetanaki Y.: Regulation of adverse remodelling by osteopontin in a genetic heart failure model. European Heart Journal (2012); 33(15):1954-63

160. Quarta G., Syrris P., Ashworth M., Jenkins S., Zuborne Alapi K., Morgan J., Muir A., Pantazis A., McKenna W.J., Elliott P.M.: Mutations in the Lamin A/C gene mimic arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. European Heart Journal (2012); 33(9):1128-36

161. Radice G.L., Rayburn H., Matsunami H., Knudsen K.A., Takeichi M., Hynes R.O.: Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. Developmental Biology (1997); 181(1):64-78

162. Radosavljevic G., Volarevic V., Jovanovic I., Milovanovic M., Pejnovic N., Arsenijevic N., Hsu D.K., Lukic M.L.: The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. Immunologic Research (2012) 52(1-2):100-110

163. Richter C.: Nitric oxide and its congeners in mitochondria: implications for apoptosis. Environmental Health Perspectives (1998); 106 Suppl 5(Suppl 5):1125-30

164. Rigato I., Bauce B., Rampazzo A., Zorzi A,. Pilichou K., Mazzotti E., Migliore F., Marra M.P., Lorenzon A., De Bortoli M., Calore M., Nava A., Daliento L., Gregori D., Iliceto S., Thiene G., Basso C., Corrado D.: Compound and digenic heterozygosity predicts lifetime arrhythmic outcome and sudden cardiac death in desmosomal gene-related arrhythmogenic right

ventricular cardiomyopathy. Circulation. Cardiovascular Genetics (2013); 6(6):533-42

165. Rizzo S., Lodder E.M., Verkerk A.O., Wolswinkel R., Beekman L., Pilichou K., Basso C., Remme C.A., Thiene G., Bezzina C.R.: Intercalated disc abnormalities, reduced Na(+) current density, and conduction slowing in desmoglein-2 mutant mice prior to cardiomyopathic changes. Cardiovascular Research (2012); 95(4):409-418

166. Rochette L., Dogon G., Zeller M., Cottin Y., Vergely C.: GDF15 and cardiac cells: current concepts and new insights. International Journal of Molecular Science (2021) 22(16): 1-28

167. Rojo J.M., Bello R., Portolés P.: T-cell receptor. Advances in Experimental Medicine and Biology (2008) 640:1-11

168. Russel, W. M. S., Burch, R. L.: The Principles of Humane Experimental Technique.

169. Saxena A., Bujak M., Frunza O., Dobaczewski M., Gonzalez-Quesada C., Lu B., Gerard C., Frangogiannis N.G.: CXCR3-independent actions of the CXC chemokine CXCL10 in the infarcted myocardium and in isolated cardiac fibroblasts are mediated through proteoglycans. Cardiovascular Research (2014); 103(2):217-27

170. Seidman C.E., Seidman J.G.: Identifying sarcomere gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy: a personal history. Circulation Research (2011); 108: 743-750

171. Sen-Chowdhry S., Morgan R.D., Chambers J.C., McKenna W.J.: Arrhythmogenic cardiomyopathy: etiology, diagnosis, and treatment. Annual Review of Medicine (2010); 61:233-53

172. Sen-Chowdhry S., Syrris P., McKenna W.J.: Role of genetic analysis in the management of patients with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Journal of the American College of Cardiology (2007); 50:1813–1821

173. Severs N.J., Bruce A.F., Dupont E., Rothery S.: Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. Cardiovascular Research (2008); 80(1):9-19

174. Severs N.J., Coppen S.R., Dupont E., Yeh H.I., Ko Y.S., Matsushita T.: Gap junc-tion alterations in human cardiac disease. Cardiovascular Research (2004); 62:368–377.

175. Severs N.J., Dupont E., Thomas N., Kaba R., Rothery S., Jain R., Sharpey K., Fry C.H.: Alterations in cardiac connexin expression in cardiomyopathies. Advances in Cardiology (2006); 42:228-242

176. Severs N.J.: Intercellular junctions and the cardiac intercalated disk. Advances in Myocardiology (1985); 5:223-42

177. Shapiro L., Weis W.I.: Structure and biochemistry of cadherins and catenins. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology (2009); 1(3):a003053

178. Sharma U.C., Pokharel S., van Brakel T.J., van Berlo J.H., Cleutjens J.P. M., Schroen B., André S., Crijns H.J.G. M., Gabius H.J., Maessen J., Pinto Y.M.: Galectin-3 Marks Activated Macrophages in Failure-Prone Hypertrophied Hearts and Contributes to Cardiac Dysfunction. Circulation (2004) 110(19): 3121-3128

179. Sheikh F., Ross R.S., Chen J.: Cell-cell connection to cardiac disease. Trends in Cardiovascular Medicine (2009); 19(6):182-90

180. Sherwi N., Merali S., Wong K.: Personalizing biomarker strategies in heart failure with galectin-3. Future Cardiology (2012) 8(6):885-94

181. Shinde A.V., Frangogiannis N.G.: Mechanisms of Fibroblast Activation in the Remodeling Myocardium. Current Pathobiology Reports (2017); 5(2):145-152

182. Shirakawa K., Sano M.: Osteopontin in cardiovascula diseases. Biomolecules. (2021) 11:1047

183. Siegelman M.H., DeGrendele H.C., Estess P.: Activation and interaction of CD 44 and hyaluronan in immunological systems. Journal of Leukocyte Biology (1999) 66(2):315-321

184. Singh K., Deonarine D., Shanmugam V., Senger D.R., Mukherjee A.B., Chang P.L., Prince C.W., Mukherjee B.B: Calcium-binding properties of osteopontin derived from non-osteogenic sources. Journal of Biochemistry (1993); 114(5):702-7

185. Singh S., Periasamy M., Bal N.C.: Strain-specific differences in muscle Ca^{2+} transport and mitochondrial electron transport chain proteins between

FVB/N and C57BL/6J mice. The Journal of Experimental Biology (2021); 224: jeb238634

186. Smolgovsky S., Ibeh U., Tamayo T.P., Alcaide P.: Adding insult to injury - Inflammation at the heart of cardiac fibrosis. Cellular Signaling (2021); 77:109828

187. Sohl G., Willecke K.: Gap junctions and the connexin protein family.Cardiovascular Research (2004); 62:228–232.

188. Solaro R.J.: Sarcomere control mechanisms and the dynamics of the cardiac cycle. Jorunal of Biomedicine and Biotechnology (2010); 2010:105648

189. Syrris P., Ward D., Evans A., Asimaki A., Gandjbakhch E., Sen-Chowdhry S., McKenna W.J.: Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in the desmosomal gene desmocollin-2. American Journal of Human Genetics (2006); 79(5):978-84

190. Szade A., Nowak W.N., Szade K., Gese A., Czypicki R., Waś H., Dulak J., Józkowicz A.: Effect of crossing C57BL/6 and FVB mouse strains on basal cytokine expression. Mediators of Inflammations (2015); 2015:762419

191. Tabib A., Loire R., Chalabreysse L., Meyronnet D., Miras A., Malicier D., Thivolet F., Chevalier P., Bouvagnet P.: Circumstances of death and gross and microscopic observations in a series of 200 cases of sudden death associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy and/or dysplasia. Circulation (2003); 108(24):3000-5

192. Tabibiazar R., Wagner R.A., Liao A., Quertermous T.: Transcriptional profiling of the heart reveals chamber-specific gene expression patterns. Circulation Research (2003); 93(12):1193-1201

193. Takemura N., Kono K., Tadokoro K., Shinbo G., Ito I., Abe C., Matsuhashi N., Iemura T., Nishikimi T., Horinaka S., Matsuoka H.: Right atrial abnormalities in a patient with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy without ventricular tachycardia. Journal of Cardiology (2008); 51(3):205-9

194. Tanaka T.: Leukocyte Adhesion Molecules. Encyclopedia of Immunobiology (2016) 3: 505-511

195. Te Riele A.S., Agullo-Pascual E., James C.A., Leo-Macias A., Cerrone M., Zhang M., Lin X., Lin B., Sobreira N.L., Amat-Alarcon N., Marsman R.F., Murray B., Tichnell C., van der Heijden J.F., Dooijes D., van Veen T.A., Tandri H., Fowler S.J., Hauer R.N., Tomaselli G., van den Berg M.P., Taylor M.R., Brun F., Sinagra G., Wilde A.A., Mestroni L., Bezzina C.R., Calkins H., Peter van Tintelen J., Bu L., Delmar M., Judge D.P.: Multilevel analyses of SCN5A mutations in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy suggest non-canonical mechanisms for disease pathogenesis. Cardiovascular Research (2017); 113(1):102-111

196. Te Riele A.S., James C.A., Philips B., Rastegar N., Bhonsale A., Groeneweg J.A., Murray B., Tichnell C., Judge D.P., Van Der Heijden J.F., Cramer M.J., Velthuis B.K., Bluemke D.A., Zimmerman S.L., Kamel I.R., Hauer R.N., Calkins H., Tandri H.: Mutation-positive arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: the triangle of dysplasia displaced. Journal of Cardiovascular Electrophysiology (2013); 24(12):1311-20

197. Tedford R.J., James C., Judge D.P., Tichnell C., Murray B., Bhonsale A., Philips B., Abraham T., Dalal D., Halushka M.K., Tandri H., Calkins H., Russell S.D.: Cardiac transplantation in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Journal of the American College of Cardiology (2012); 59(3):289-90

198. Tham Y.K., Bernardo B.C., Ooi J.Y., Weeks K.L., McMullen J.R.: Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. Archives of Toxicology (2015); 89(9):1401-38

199. Thiene G,. Nava A., Corrado D., Rossi L., Pennelli N.: Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people. The New England Journal of Medicine (1988); 318(3):129-33

200. Thiene G., Corrado D., Nava A., Rossi L., Poletti A., Boffa G.M., Daliento L., Pennelli N.: Right ventricular cardiomyopathy: is there evidence of an inflammatory aetiology? European Heart Journal (1991); 12 (Suppl D):22-25.

201. Troyanovsky S.M., Troyanovsky R.B., Eshkind L.G., Leube R.E., Franke W.W.: Identification of amino acid sequence motifs in desmocollin, a desmosomal glycoprotein, that are required for plakoglobin binding and

plaque formation. Proceedings of the National Academy of Science of USA (1994); 91(23):10790-4

202. Troyanovsky S.M., Troyanovsky R.B., Eshkind LG, Krutovskikh V.A., Leube R.E., Franke W.W.: Identification of the plakoglobin-binding domain in desmoglein and its role in plaque assembly and intermediate filament anchorage. The Journal of Cell Biology (1994); 127(1):151-60

203. Turkowski K.L., Tester D.J., Bos J.M., Haugaa K.H., Ackerman M.J.: Whole exome sequencing with genomic triangulation implicates CDH2-encoded N-cadherin as a novel pathogenic substrate for arrhythmogenic cardiomyopathy. Congenital Heart Disease (2017);12(2):226-235

204. Uhl HSM.: A previously undescribed congenital formation of the heart: almost totalabsence of the myocardium of the right ventricle. Bull Johns Hopkins Hospital (1952); 91:197–205

205. Umar S., Nadadur R., Iorga A., Amjedi M., Matori H., Eghbali M.: Cardiac structural and hemodynamic changes associated with physiological heart hypertrophy of pregnancy are reversed postpartum. Journal of Applied Physiology (2012); 113(8): 1253–1259

206. Ustyantsev K., Stranges M., Volpe F.G., de Boer J.F., Kuipers F., Mouton S., Berezikov E.: One probe fits all: a highly customizable modular RNA in situ hybridization platform expanding the application of SABER DNA probes. Development (2025); 152(11):dev204775

207. Valente M., Calabrese F., Thiene G., Angelini A., Basso C., Nava A., Rossi L.: In vivo evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. The American Journal of Pathology (1998); 152(2):479-484

208. van den Berg T.K., Kraal G.: A function for the macrophage F4/80 molecule in tolerance induction. Trends in Immunology (2005) 26(10):506-509

209. van der Zande H.J.P., Nitsche D., Schlautmann l., Guigas B., Burgdorf S.: The Mannose Receptor: From Endocytic Receptor and Biomarker to Regulator of (Meta)Inflammation. Frontiers in Immunology (2021) 12:765034.

210. van der Zwaag P.A., Jongbloed J.D., van den Berg M.P., van der Smagt J.J., Jongbloed R., Bikker H., Hofstra R.M., van Tintelen J.P.: A genetic

variants database for arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Human Mutation (2009); 30(9):1278-83

211. van Hengel J., Calore M., Bauce B., Dazzo E., Mazzotti E., De Bortoli M., Lorenzon A., Li Mura I.E., Beffagna G., Rigato I., Vleeschouwers M., Tyberghein K., Hulpiau P., van Hamme E., Zaglia T., Corrado D., Basso C., Thiene G., Daliento L., Nava A., van Roy F., Rampazzo A.: Mutations in the area composita protein αT-catenin are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. European Heart Journal (2013); 34(3):201-10.

212. van Kempen M.J., ten Velde I., Wessels A., Oosthoek P.W., Gros D., Jongsma H.J., Moorman A.F., Lamers W.H.: Differential connexin distribution accommodates cardiac function in different species. Microscic Research and Technique0 (1995); 31(5):420-36

213. van Rijsingen I.A., van der Zwaag P.A., Groeneweg J.A., Nannenberg E.A., Jongbloed J.D., Zwinderman A.H., Pinto Y.M., Dit Deprez R.H., Post J.G., Tan H.L., de Boer R.A., Hauer R.N., Christiaans I., van den Berg M.P., van Tintelen J.P., Wilde A.A.: Outcome in phospholamban R14del carriers: results of a large multicentre cohort study. Circulation Cardiovascular Genetics (2014); 7(4):455-65

214. Van Vleet J.F., Ferrans V.J.. Ultrastructural changes in inherited cardiac calcinosis of DBA/2 mice. American Journal of Veterinary Research (1987); 48(2):255-61

215. Veerman C.C., Wilde A.A., Lodder E.M.: The cardiac sodium channel gene SCN5A and its gene product NaV1.5: Role in physiology and pathophysiology. Gene (2015); 573(2):177-87

216. Vite A., Zhang C., Yi R., Emms S., Radice G.L.: α-Catenin-dependent cytoskeletal tension controls Yap activity in the heart. Development (2018); 145(5):dev149823

217. Volk T., Geiger B.: A 135-kd membrane protein of intercellular adherens junctions. The EMBO Journal (1984); 3(10):2249-60

218. Vozzi C., Dupont E., Coppen S.R., Yeh H.I., Severs N.J.: Chamber-related differences in connexin expression in the human heart. Journal of Molecular and Cellular Cardiology (1999); 31(5):991-1003

219. Waldeyer C., Fabritz L., Fortmueller L., Gerss J., Damke D., Blana A., Laakmann S., Kreienkamp N., Volkery D., Breithardt G., Kirchhof P.:

Regional, age-dependent, and genotype-dependent differences in ventricular action potential duration and activation time in 410 Langendorff-perfused mouse hearts. Basic Research in Cardiology (2009); 104(5):523-33

220. Wang Q., Lin J.L., Wu K.H., Wang D.Z., Reiter R.S., Sinn H.W., Lin C.I., Lin C.J.: Xin proteins and intercalated disc maturation, signaling and diseases. Frontiers in Bioscience Landmark Edition (2012); 17(7):2566-93

221. Wichter T., Borggrefe M., Haverkamp W., Chen X., Breithardt G.: Efficacy of antiarrhythmic drugs in patients with arrhythmogenic right ventricular disease. Results in patients with inducible and noninducible ventricular tachycardia. Circulation (1992); 86(1):29-37

222. Xu T., Yang Z., Vatta M., Rampazzo A., Beffagna G., Pilichou K., Scherer S.E., Saffitz J., Kravitz J., Zareba W., Danieli G.A., Lorenzon A., Nava A., Bauce B., Thiene G., Basso C., Calkins H., Gear K., Marcus F., Towbin J.A.: Multidisciplinary Study of Right Ventricular Dysplasia Investigators. Compound and digenic heterozygosity contributes to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Journal of the American College of Cardiology (2010); 55(6):587-97

223. Yeruva S., Waschke J.: Structure and regulation of desmosomes in intercalated discs: Lessons from epithelia. Journal of Anatomy (2023); 242(1):81-90

224. Young S.G., Jung H.J., Lee J.M., Fong L.G.: Nuclear lamins and neurobiology. Molecular and Cellular Biology (2014); 34(15):2776-85

225. Zaugg C.E., Buser P.T.: When calcium turns arrhythmogenic: intracellular calcium handling during the development of hypertrophy and heart failure. Croatian Medical Journal (2001); 42(1):24-32

226. Zhao Y., Huang Z., Gao L., Ma H., Chang R.: Osteopontin/SPP1: a potential mediator between immune cells and vascular calcification. Frontiers in Immunology (2024); 15:1395596

227. Zipes D.P., Camm A.J., Borggrefe M., Buxton A.E., Chaitman B., Fromer M., Gregoratos G., Klein G., Moss A.J., Myerburg R.J., Priori S.G., Quinones M.A., Roden D.M., Silka M.J., Tracy C., Priori S.G., Blanc J.J., Budaj A., Camm A.J., Dean V., Deckers J.W., Despres C., Dickstein K., Lekakis J., McGregor K., Metra M., Morais J., Osterspey A., Tamargo J.L., Zamorano J.L., Smith S.C. Jr, Jacobs A.K., Adams C.D., Antman E.M., Anderson J.L.,

Hunt S.A., Halperin J.L., Nishimura R., Ornato J.P., Page R.L., Riegel B.; American College of Cardiology; American Heart Association Task Force; European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines; European Heart Rhythm Association; Heart Rhythm Society. ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Develop guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death) developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. Europace (2006); 8(9):746-837

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: ***links,*** Darstellung des Glanzstreifens im Schema und im EM-Bild; ***rechts****,* Darstellung des mutierten Dsg2-Proteins; Deletion der Exon 4-6, welche für die adhäsiven extrazellulären Domänen EC1-EC2 kodieren

Abbildung 1.2: Darstellung der analysierten Altersklassen der FVBN Dsg2-Mäuse (rote Pfeile) und Korrelation mit dem entsprechenden Alter der AC-Patienten; modifiziert Präsentation C. Krusche

Abbildung 5.0: Makroskopische Darstellung der Herzen einer $Dsg2^{mt/mt}$ Maus (A) versus $Dsg2^{wt/wt}$ Maus (B)

Abbildung 5.1: Makroskopische Darstellung des Herzens einer $Dsg2^{mt/mt}$ Maus

Abbildung 5.2: Mikroskopische Darstellung des Atriums einer 27 Wochen alten FVBN $Dsg2^{wt/wt}$ Maus (**A**: HE-Färbung, **B**: Azan-Färbung).

Abbildung 5.3: Mikroskopische Darstellung der Ventrikelwände einer 27 Wochen alten FVBN $Dsg2^{wt/wt}$-Maus → **A, B**: rechter Ventrikel (**A**: HE-Färbung, **B**: AZAN-Färbung); **C, D**: linker Ventrikel (**C**: HE-Färbung, **D**: Azan-Färbung)

Abbildung 5.4: Vergrößerung aus dem rechten Ventrikel einer 30 Wochen alten FVBN $Dsg2^{mt/mt}$ Maus (HE-Färbung)

Abbildung 5.5: Immunhistochemische Färbung mit einem Anti-Dsg2-Antikörper (Wildtyp)

Abbildung 5.6: Immunhistochemische Färbung mit einem Anti-Dsg2-Antikörper (Mutante)

Abbildung 5.7: Subepikardiale Läsion mit kernlosen Kardiomyozyten (blauer Pfeil) im Atrium einer 10 Wochen alten FVBN $Dsg2^{mt/mt}$-Maus. **A**: HE-Färbung, **B**: Azan-Färbung

Abbildung 5.8: Atrium einer 14 Wochen alten FVBN $Dsg2^{mt/mt}$ Maus (A, A^{I}: HE-Färbung, B: Azan-Färbung)

Abbildung 5.9: Ausschnitt aus einer 14 Wochen alten FVBN $Dsg2^{mt/mt}$ Maus (A: HE-Färbung, B: Azan-Färbung)

Abbildung 5.10: Ausschnitt aus dem Atrium einer 14 Wochen alten FVBN $Dsg2^{mt/mt}$-Maus (HE-Färbung)

Abbildung 5.11: **A,B,C**: Rechter Ventrikel einer 14 Wochen alten FVBN $Dsg2^{mt/mt}$ Maus (**A**: HE-Färbung, **B**: AZAN-Färbung, **C**: Kossa-Färbung); **D,E,F**: Rechter Ventrikel einer

12-Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$ Maus als Kontrolle (**D**: HE-Färbung, **E**: AZAN-Färbung, **F:** Kossa-Färbung)

Abbildung 5.12: Atrium einer 27 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ Maus (**A**: HE-Färbung, **B**: Azan-Färbung).

Abbildung 5.13: Atrium einer 14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**A**: HE-Färbung, **B**: Azan-Färbung).

Abbildung 5.14: Histologischer Phänotyp einer repräsentativen 28 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus. Rechter (A, B) und linker (C,D) Ventrikel (A,C: HE-Färbung, B,D: Azan-Färbung).

Abbildung 5.15: Morphologie des rechten Ventrikels einer 31 Wochen (A, B) und 29 Wochen (C, D) alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (A, C: HE-Färbung, B, D: Azan-Färbung).

Abbildung 5.16: Kalzifikation im Bereich des Atriums einer 27-Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ Maus (**A**: HE-Färbung, **B**: Azan-Färbung, **C**: von Kossa-Färbung).

Abbildung 5.17: Kalzifikation im Bereich des rechten Ventrikels einer 31 Wochen alten Dsg2$^{mt/mt}$- Maus (**A**: HE-Färbung, **B**: AZAN-Färbung, **C**: von Kossa-Färbung, **D**: In situ Hybridisierung)

Abbildung 5.18: Atrium einer 12 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$ (**A**) und einer 14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**B**,**C**); WGA-TRITC-Immunfluoreszenz und DAPI-Kernfärbung.

Abbildung 5.19: Mittelwerte der atrialen Kardiomyozyten-Durchmesser der 10-14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ (MT)- und der FVBN Dsg2$^{wt/wt}$ (WT)-Mäuse: unpaired Mann-Whitney T-Test

Abbildung 5.20: Atrium einer 29 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus (**A**) und einer 27 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**B**, **C**); WGA-TRITC-Immunfluoreszenz und DAPI-Kernfärbung

Abbildung 5.21: Mittelwerte der atrialen Kardiomyozyten-Durchmesser der 27-31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse und FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Mäuse: unpaired Mann-Whitney T-Test

Abbildung 5.22: Atrium einer 12 Wochen alten B6 Dsg2$^{wt/wt}$- (**A**) und einer 14 Wochen alten B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**B**); WGA-TRITC-Immunfluoreszenz-Färbung und DAPI-Kernfärbung

Abbildung 5.23: Mittelwert der atrialen Kardiomyozyten-Durchmesser der B6 Dsg2$^{mt/mt}$- versus B6 Dsg2$^{wt/wt}$ Mäuse 12-14 Wochen: unpaired Mann-Whitney T-Test

Abbildung 5.24: Atrium einer 26 Wochen alten B6 Dsg2$^{wt/wt}$-Maus(**A**) und einer 28 Wochen alten B6 Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**B**); WGA-TRITC-Immunfluoreszenz und DAPI-Kernfärbung

Abbildung 5.25: Mittelwert atrialer Kardiomyozyten-Durchmesser der B6 Dsg2$^{mt/mt}$- versus B6 Dsg2$^{wt/wt}$-Mäuse 26-28 Wochen: unpaired Mann-Whitney T-Test

Abbildung 5.26: Rechter Ventrikel einer repräsentatitiven 13 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$- (**A**) und einer 12 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**B**); WGA-TRITC-Immunfluoreszenz und DAPI-Kernfärbung.

Abbildung 5.27: **A**: Mittelwert Kardiomyozyten-Durchmesser des rechten Ventrikels der 10-14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- und FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Mäus; **B**: Kardiomyozyten-Durchmesser der einzelnen gemessenen Kardiomyozyten der rechten Ventrikel der 10-14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- und FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Mäuse

Abbildung 5.28: Linker Ventrikel einer 12 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$ (**A**) und einer 10 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ (**B**); WGA-TRITC-Immunfluoreszenz und DAPI-Kernfärbung

Abbildung 5.29: **A**: Mittelwert Kardiomyozyten-Durchmesser des linken Ventrikels der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ versus FVBN Dsg2$^{wt/wt}$ 10-14 Wochen; **B**: Kardiomyozyten-Durchmesser der linken Ventrikel der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ versus FVBN Dsg2$^{wt/wt}$ 10-14 Wochen.

Abbildung 5.30: Rechter Ventrikel einer 27 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$- (**A**) und einer 31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- (**B**); WGA-TRITC-Immunfluoreszenz und DAPI Gegenfärbung.

Abbildung 5.31: **A**: Mittelwert Kardiomyozyten-Durchmesser des rechten Ventrikels der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ - versus FVBN Dsg2$^{wt/wt}$ – Mäuse 27-31 Wochen; **B**: Kardiomyozyten-Durchmesser der rechten Ventrikel der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- versus FVBN Dsg2$^{wt/wt}$ -Mäuse 27-31 Wochen.

Abbildung 5.32: Linker Ventrikel einer 30 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$- (**A**) und einer 31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Mäuse (**B**); WGA-TRITC-Immunfluoreszenz und DAPI-Kernfärbung.

Abbildung 5.33 A: Mittelwert Kardiomyozyten-Durchmesser des linken Ventrikels der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ versus FVBN Dsg2$^{wt/wt}$ 27-31 Wochen; **B**: Kardiomyozyten-Durchmesser der linken Ventrikel der FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- versus FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Mäuse im Alter von 27-31 Wochen.

Abbildung 5.34: **A-B**: BNP-mRNA-Expression in 29-31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- und FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Mäusen.

Abbildung 5.35: **A-B**: Lgals3-mRNA-Expression in 29-31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$- und FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Mäusen.

Abbildung 5.36: **A-B**: GDF15-mRNA-Expression in 29-31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ und FVBN Dsg2$^{wt/wt}$.

Abbildung 5.37: Atrium einer 14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (A: HE-Färbung; B: Azan-Färbung).

Abbildung 5.38: rechter Ventrikel einer 14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ Maus (A, A^{I}: HE-Färbung; B: Azan-Färbung).

Abbildung 5.39: rechter Ventrikel einer 31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ Maus (A: HE-Färbung; B: Azan-Färbung).

Abbildung 5.40: linker Ventrikel einer 31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ Maus (A: HE-Färbung; B: Azan-Färbung).

Abbildung 5.41: Lokalisation von CD44+ Immunzellen im Atrium einer repräsentativen 12 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus (**A**) und einer 14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**B**).

Abbildung 5.42: CD 44 Immunreaktion im Atrium einer 14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$ (A^{I}) und einer 27 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (B).

Abbildung 5.43: CD 44 Immunreaktion im linken Ventrikel einer repräsentativen 27 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus (**A**) und einer 31 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**B**) B^{I} ist ein Ausschnitt aus B (schwarzes Kästchen).

Abbildung 5.44: CD44+Zellen im rechten Ventrikel einer 14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus.

Abbildung 5.45: CD 3 Immunreaktion im Atrium einer repräsentativen 14 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**A, A^{I}**), einer 12 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus (**B**) und einer 27 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**C**).

Abbildung 5.46: Nachweis von F4/80+ Makrophagen im rechten (**A, A^{I}**) und linken Ventrikel (**B, B^{I}**) einer repräsentativen 30 Wochen alten FVBN Dsg2$^{mt/mt}$-Maus (**A, B**) und einer 30 Wochen alten FVBN Dsg2$^{wt/wt}$-Maus (**A^{I}, B^{I}**).

Abbildung 5.47: Lokalisierung von CD206+ Zellen im rechten (A, A^I) und linken Ventrikel (B, B^I) einer repräsentativen 30 Wochen alten FVBN $Dsg2^{mt/mt}$- (A, B) und einer 30 Wochen alten FVBN $Dsg2^{wt/wt}$-Maus (A^I, B^I).

Abbildung 5.48: CD11b Immunreaktion im rechten (A, A^I) und linken Ventrikel (B, B^I) einer 30 Wochen alten FVBN $Dsg2^{mt/mt}$- (A, B) und einer 30 Wochen alten FVBN $Dsg2^{wt/wt}$-Maus (A^I, B^I).

Abbildung 5.49: CD11c Immunreaktion im rechten (A, A^I) und linken Ventrikel (B, B^I) einer 30 Wochen alten FVBN $Dsg2^{mt/mt}$- (A, B) und einer 30 Wochen alten FVBN $Dsg2^{wt/wt}$-Maus (A^I, B^I).

Abbildung 5.50: **A-B**: CD68-mRNA-Expression in 29-31 Wochen alten FVBN $Dsg2^{mt/mt}$- und FVBN $Dsg2^{wt/wt}$-Mäusen.

Abbildung 5.51: TnC-Immunreaktion im linken Ventrikel einer repräsentativen 31 Wochen alten FVBN $Dsg2^{mt/mt}$-Maus (**A**) und einer 30 Wochen alten FVBN $Dsg2^{wt/wt}$-Maus (**B**).

Abbildung 5.52: TnC-Immunreaktion im Atrium einer repräsentativen 27 Wochen alten (A), von zwei 14 Wochen alten (B, C) FVBN $Dsg2^{mt/mt}$-Mäusen und einer 12 Wochen alten FVBN $Dsg2^{wt/wt}$-Maus (D).

Abbildung 5.53: **A-B**: TGF β -mRNA-Expression in 29-31 Wochen alten FVBN $Dsg2^{mt/mt}$ und FVBN $Dsg2^{wt/w}$-Mäusen

Abbildung 5.54: linker Ventrikel einer 30 Wochen alten FVBN $Dsg2^{wt/mt}$ Maus (**A, B**) und Atrium einer 30 Wochen alten FVBN $Dsg2^{wt/mt}$ Maus (**C, D**). **A, C**: HE-Färbung. **B, D**: Azan-Färbung.

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.0: Genmutationen die mit einem AC-Phänotyp assoziiert sind

Tabelle 1.1: Modifizierte Task-Force-Kriterien der AC (modifiziert Marcus et al. 2010)

Tabelle 3.0: Untersuchte Mausstämme

Tabelle 3.1: Laborgebrauchsgegenstände und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.2: Verwendete Mikroskope

Tabelle 3.3: Chemikalien und Lösungen

Tabelle 3.4: Selbst hergestellten Puffer und Lösungen

Tabelle 3.5: Gebrauchsfertige Reagenzien und Kits

Tabelle 3.6: Verwendete Primärantikörper

Tabelle 3.7: Verwendete Sekundärantikörper

Tabelle 3.8: Verwendete Normalseren

Tabelle 3.9: Sonde von Thermo Fisher Scientific, die für die RNA in-situ Hybridisierung, verwendet wurde

Tabelle 3.10: Verwendeten Primer. Die angegebenen Effizienzen wurden mittels der im Kapitel 4.4.2 beschriebenen Methode ermittelt. F = forward, R = reverse

Tabelle 3.11: Verwendete Computerprogramme

Tabelle 4.0: Paraffin-Einbettungsprotokoll

Tabelle 4.1: Protokoll Entparaffinierung der Paraffinschnitte

Tabelle 4.2: Protokoll Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Tabelle 4.3: Protokoll Azan-Färbung

Tabelle 4.4: Protokoll Kossa-Färbung

Tabelle 4.5: Protokoll Desmoglein 2 (rb88)-Immunreaktion

Tabelle 4.6: Protokoll CD44-Immunreaktion

Tabelle 4.7: Protokoll CD3-Immunreaktion

Tabelle 4.8: Protokoll TNC-Immunreaktion

Tabelle 4.9: Protokoll TGF-βi-Immunreaktion

Tabelle 4.10: Protokoll F4/80-, CD206-, CD11b-Immunreaktion

Tabelle 4.11: Verdünnung der Primärantikörper und Kontrollen

Tabelle 4.12: Protokoll CD11c-Immunreaktion

Tabelle 4.13: Protokoll WGA/TRITC

Tabelle 4.14: Master Mix

Tabelle 4.15: Effizienzen

Tabelle 5.0: Makro-Score Kriterien (Dilatation, Farbveränderung und Fibrose)

12 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt meiner wissenschaftlichen Betreuerin, **Frau PD Dr. rer. nat. Claudia A. Krusche** für die Überlassung des spannenden Dissertationsthemas, die wertvolle Unterstützung bei der Durchführung von Experimenten und statistischen Auswetungen sowie für die stets offene, konstruktive und engagierte Betreung.

Ebenso danke ich **Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Rudolf Leube**, dem Leiter des Instituts für molekulare und zelluläre Anatomie der RWTH Aachen, für die Möglichkeit, meine Arbeit in seinem Insitut durchzuführen, sowie für seine konstruktiven Anmerkungen und Vorschläge im Rahmen der Institutsseminare.

Mein besonderer Dank gilt **Herrn Dr. rer. nat. Sebastian Kant** für die geduldige Einweisung ins Axiophot- und Apotom-Mikroskop sowie für seine stete Hilfsbereitschaft bei fachlichen Fragen im Laboralltag. Für viele anregende wissenschaftliche Gespräche danke ich **Frau Dr. rer. nat. Hoda Moazzen**, **Herrn Dr. rer. nat. Marcin Moch**, **Frau Dr. rer. nat. Nicole Schwarz**, **Herrn PD Dr. rer. nat. Jacopo Di Russo**, **Herrn Jun.-Prof. Dr. rer. nat. Florian Geisler** und **Herrn Dr. rer. nat. Volker Buck**.

Für die wertvolle Unterstützung bei immunhistochemischen Färbungen, Paraffineinbettung und Gewebeschnitten danke ich herzlich **Frau Marina Lürkens Weber** und **Frau Chrisine Ehrer**. **Frau Christine Ehrer** danke ich zudem für die gemeinsame Durchführung der mRNA-ISH. Außerdem möchte ich mich bei **Frau Sabine Eisner** für die Unterstützung bei der cDNA-Synthese und bei der Durchführung der qRT-PCR bedanken. Für die Ratschläge bei der graphischen Aufarbeitung der Abbildungen gilt mein Dank **Herrn Adam Breitscheidel**. Außerdem bedanke ich mich bei **Frau Elke Broekmeulen** für die Unterstützung bei administrativen Angelegenheiten.

Mein Dank gilt ebenso allen nicht namentlich genannten technischen Mitarbeterinnen und Mitarbeiter des Instituts, die stets tatkräftig bei der Durchführung von Experimenten zur Seite standen.

Für die schöne gemeinsame zeit im Labor möchte ich mich bei allem MOCAs bedanken. Hervorheben möchte ich vor allem **Dr. Anna Sternberg**, **Dr. Joana Ahlburg**, **Dr. Jana Schrieren**, **Dr. Sonja Lehmann**, **Sophie Wüllenweber** und **Laura Königs** für die fachliche und persönliche Unterstützung.

Ein großer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Zwillingsschwester **Clara de Angelis**, für die stetige Unterstützung während der Promotionszeit. Danke auch an meine Mitbewohnerinnen und Freundinnen **Dr. med. Pia Krüger** und **Sophia Werner** für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihr stets offene Ohr. Allen weiteren Freunden und ehemaligen Kommilitonen danke ich für die gemeinsame Zeit.

13 Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten

- bei meiner Betreuerin **Frau Privatdozentin Dr. rer. nat. Claudia A. Krusche, Institut für Molekulare und Zelluläre Anatomie (MOCA)** des Universitätsklinikums Aachen,

hinterlegt sind.

14 Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, **Alma de Angelis** an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „**Der Einfluss des genetischen Hintergrundes und kammerspezifischer Genexpressionsmuster auf strukturelle und molekulare Veränderungen im Krankheitsverlauf der arrhythmogenen Kardiomyopathie**“ dargestellten Ergebnisse erhoben habe:

Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind.

	Doktorandin Alma de Angelis	Betreuerin PD Dr. rer. nat. Claudia A. Krusche	MTA Christine Eherer, Marina Lürkens Weber	MTA Sabine Eisner	Summe (%)
Studienüberwachung		100			100
Studiendesign/Konzeption		100			100
Gewinnung der Gewebeproben	20	80			100
Durchführung der histologischen Färbungen	80		20		100
Durchführung der immunhistochemischen Reaktionen	80		20		100
Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen	80		20		100
Durchführung der *in- situ* Hybridisierung	50		50		100
RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	20			80	100
Durchführung der qRT-PCR	70			30	100
Bereitstellung von Materialien		100			100
Statistische Auswertung	100				100
Qualitative Datenauswertung der histologischen und immunhistochemischen Reaktionen	80	20			100
Interpretation der Datenauswertung	70	30			100
Schreiben der Monographie	100				100

Hier ggf. auch Experimente oder statistische Auswertungen aufführen, die nicht selbstständig gemacht, sondern von den entsprechenden Personen übernommen wurden.

_____

Unterschrift der Doktorandin

Als Betreuer der obigen Dissertation bestätige ich die Angaben von Alma de Angelis

_____

Unterschrift des Doktorvaters

15 Lebenslauf



Persönliche Daten:

Vor- und Nachnahme: Alma de Angelis

Geburtsdatum: 16.08.1995

Geburtsort: Padova (Italien)

Nationalität: deutsch und italienisch

Beruflicher Werdegang:

Seit 01.03.2022 bis dato	Assistenzärztin in Weiterbildung, Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Aachen Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Bernhard Schulz

Promotion

09.2019-2025	Institut für Molekulare und Zelluläre Anatomie (MOCA), RWTH Aachen Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Rudolf Leube Betreuerin PD Dr. rer. nat. Claudia Krusche

Universitäre Ausbildung

11.2021	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
07.2021-10.2021	3. Tertial Innere Medizin, Universitätsklinikum Aachen
03.2021-06.2021	2. Tertial Allgemeinchirurgie, SEMP-Stipendium (Swiss European Mobility Programm) Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV) Lausanne (Schweiz)
11.2020-02.2021	1. Tertial Neurologie Universitätsklinikum Aachen
10.2020	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
09.2018	Ärztliche Basisprüfung
2014/2015-2021	Beginn Studium der Humanmedizin, RWTH Aachen

Nebentätigkeit:

11.2016-04.2020	Studentische Hilfskraft im AIXTRA (Kompetenzzentrum für Training und Patientensicherheit), Universitätsklinikum Aachen

Schulische Ausbildung:

07.2014	Abitur, Gymnasium Tito Livio, Padova (Italien)