

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische  
Pharmakologie und Toxikologie  
des Zentrums für Experimentelle Medizin  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen

---

Regionale Verteilung des Hyperpolarisations-aktivierten  
Kationenkanals HCN2 im insuffizienten und  
nichtinsuffizienten menschlichen Myokard

– Dissertation –

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg  
vorgelegt von

TOBIAS TÖDTER  
aus  
Hamburg

Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 17. März 2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin  
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Thomas Eschenhagen

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Korth

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. Heimo Ehmke

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Physiologische und pathophysiologische Rolle des Schrittmacherstroms $I_f$ am Herzen . . . . .	2
1.2	Hypothese und Ziele der Dissertation . . . . .	7
1.2.1	Hypothese . . . . .	7
1.2.2	Ziele . . . . .	7
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>8</b>
2.1	Molekularbiologische Methoden . . . . .	8
2.1.1	RNA-Präparation nach der APGC-Methode . . . . .	8
2.1.2	Gelelektrophoretische Überprüfung der RNA . . . . .	8
2.1.3	Reverse Transkription . . . . .	9
2.1.4	Polymerasekettenreaktion (PCR) . . . . .	9
2.1.5	Agarosegel-Elektrophorese . . . . .	11
2.1.6	Isolierung von DNA-Molekülen aus Low-melting-point-Agarosegelen . . . . .	11
2.1.7	Ligation . . . . .	11
2.1.8	Transformation . . . . .	12
2.1.9	Isolierung von Plasmid-DNA . . . . .	12
2.1.10	Restriktionsverdau zur Überprüfung der Orientierung des Inserts im Vektor . . . . .	14
2.1.11	DNA-Konzentrationsbestimmung . . . . .	14
2.1.12	Restriktionsverdau zur Linearisierung des Vektors . . . . .	14
2.1.13	RNase Protection Assay (RPA) . . . . .	14
2.2	Gewebeentnahme und klinische Daten . . . . .	19
2.2.1	Myokardiales Gewebe . . . . .	19
2.2.2	Patientencharakteristik . . . . .	19
2.3	Statistische Methoden . . . . .	20

---

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>22</b>
3.1	Qualitativer Nachweis der HCN2-Expression im menschlichen Myokard .	22
3.2	Quantitative Bestimmungen der HCN2-mRNA-Expression im menschlichen Herzen mittels RPA . . . . .	23
3.2.1	Schematische Zusammenfassung des Ablaufs eines RPA . . . . .	24
3.2.2	Ergebnisse der vorbereitenden Experimente für den RPA . . . . .	25
3.2.3	HCN2-mRNA-Expression in terminal insuffizienten im Vergleich zu nichtinsuffizienten Herzen . . . . .	34
3.2.4	Regionale Unterschiede der HCN2-Expression im menschlichen Herzen . . . . .	38
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>40</b>
4.1	Einfluss der Herzinsuffizienz . . . . .	42
4.2	Regionale Verteilung . . . . .	46
4.3	Auswahl der Methode . . . . .	48
4.4	Ausblick . . . . .	49
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>51</b>
<b>A</b>	<b>Material</b>	<b>60</b>
A.1	Chemikalien . . . . .	60
A.2	Enzyme . . . . .	61
A.3	Plasmidvektoren . . . . .	61
A.4	Bakterienstämme . . . . .	61
A.5	Reaktionskits . . . . .	62
A.6	Verbrauchsmittel . . . . .	62
A.7	Laborgeräte . . . . .	62
A.8	Lösungen . . . . .	63
A.9	Medien . . . . .	65
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>67</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>68</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>69</b>
	<b>Erklärung</b>	<b>70</b>

# Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cDNA	Komplementäre DNA
Ci	Curie
CNDB	Cyclic nucleotide binding domain
cRNA	Komplementäre RNA
CTP	Cytidintriphosphat
d	Tag, Tage
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	Disintegrations per minute, Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
g	Gramm bzw. Vielfaches der Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde, Stunden
HCN	Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide gated cation channel
HEK	Human embryonic kidney
ICM	Ischämische Kardiomyopathie
IVS	Interventrikularseptum
kb	Kilobasen
LA	Linker Vorhof
LV	Linker Ventrikel
M	Mol/Liter
min	Minute, Minuten

---

MOPS	4-(N-morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NF	Gesundes Herzgewebe (Non-Failing)
nt	Nukleotide
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionenkonzentration
RA	Rechter Vorhof
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
RPA	RNase Protection Assay
RT	Raumtemperatur
RV	Rechter Ventrikel
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde, Sekunden
SEM	Standardfehler
TBE	Tris-(Hydroxymethyl)-aminoethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit, Einheit
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

# 1 Einleitung

Bei Patienten mit hypertoniebedingter linksventrikulärer Hypertrophie und Herzinsuffizienz findet man eine erhöhte Inzidenz des plötzlichen Herztodes. Knapp die Hälfte dieser Patienten verstirbt plötzlich und unerwartet [Kannel et al. 1988], wobei man davon ausgeht, dass hauptsächlich ventrikuläre oder – seltener – atriale Tachyarrhythmien die Auslöser des plötzlichen Herztodes sind [McLenachan et al. 1987, Kannel et al. 1988, Pye und Cobbe 1992].

Es sind verschiedene Mechanismen denkbar, die solche Tachyarrhythmien im hypertrophierten linken Ventrikel begünstigen. Die genauen elektrophysiologischen Vorgänge sind aber immer noch nicht vollständig aufgeklärt. Nach einem Herzinfarkt beispielsweise könnten Reentry-Mechanismen zur Entstehung einer Tachyarrhythmie beitragen. Eine weitere mögliche Ursache könnte eine gesteigerte Aktivität im Ventrikelmyokard sein – im Sinne von Automatien durch ektope Schrittmacher [Messerli et al. 1984]. Bei *in-vitro*-Experimenten an druckbelasteten Katzenherzen fand man eine gesteigerte ektope Aktivität in den hypertrophierten linken Ventrikeln [Tritthart et al. 1975].

Die Schrittmacheraktivität einer Zelle beruht auf ihrer Fähigkeit, spontan zu depolarisieren. Im physiologischen Schrittmacher des Herzens, dem Sinusknoten, aber auch in den Purkinjefasern des Ventrikels trägt der durch Hyperpolarisation aktivierte Einwärtsstrom  $I_f$  wesentlich zur spontanen diastolischen Depolarisation der Zellen bei, weshalb man diesen Strom auch als so genannten »Schrittmacherstrom« bezeichnet. Entgegen ursprünglicher Annahmen konnte in elektrophysiologischen Untersuchungen an Herzen verschiedener Tierspezies gezeigt werden, dass dieser Schrittmacherstrom auch außerhalb des Reizleitungssystems in Ventrikelmyozyten messbar ist. Interessant ist dabei, dass das Schwellenpotenzial zur Aktivierung von  $I_f$  einen Gradienten vom Sinusknoten (ca.  $-50$  mV) über die Purkinjefasern (ca.  $-80$  mV) bis zum Ventrikelmyokard (ca.  $-110$  mV) aufweist. Der Strom wird demnach im Ventrikelmyokard erst bei deutlich negativeren Potenzialen als im Sinusknoten aktiviert [Yu et al. 1995]. In derselben Reihenfolge vergrößert sich auch der Abstand zwischen dem jeweiligen Aktivierungs- und Ruhepotenzial. Dies könnte einen wichtigen Grund dafür darstellen, dass unter normalen Bedingungen der Sinusknoten die Herzaktion führt.

Ektope Automatien wiederum werden durch Abnormalitäten in der Repolarisationsphase des Herzens begünstigt [Tomaselli et al. 1994]. Einen wichtigen Beitrag liefert dabei einerseits die Verminderung der Stromdichte des repolarisierenden Auswärtsstroms  $I_{to}$ , andererseits die Erhöhung des depolarisierenden Einwärtsstroms  $I_f$  [Cerbai et al. 2001]. Der Ionenstrom  $I_f$  konnte bis Ende der 90er Jahre nur elektrophysiologisch untersucht werden. Die Aufklärung der Gensequenz sowie Struktur des entsprechenden stromtragenden Ionenkanals gelang erst 1998 [Ludwig et al. 1998, Ludwig et al. 1999, Seifert et al. 1999].  $I_f$  wird durch die Hyperpolarisations-aktivierten Kationenkanäle HCN (*hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide gated cation channel*) 1 bis 4 gebildet. Im menschlichen Herzen ist HCN2 neben HCN4 die vorherrschende Isoform.

## 1.1 Physiologische und pathophysiologische Rolle des Schrittmacherstroms $I_f$ am Herzen

Physiologischerweise übt der Sinusknoten die primäre Schrittmacherfunktion im menschlichen Herzen aus. Dabei handelt es sich um spezialisierte Myozyten, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie ein labiles Ruhepotenzial aufweisen. Es kommt so zu einer spontanen Depolarisation, die in der Diastole erfolgt.

Welche Ionenströme für diese Spontandepolarisation verantwortlich sind, war trotz Entdeckung des Hyperpolarisations-aktivierten Einwärtsstroms  $I_f$  in Purkinje-Zellen [DiFrancesco 1981] lange Zeit nicht abschließend geklärt. Man weiß aus elektrophysiologischen Untersuchungen, dass an der Regulation des Herzschlages im Sinusknoten mehrere Ionenströme bzw. Ionenkanäle beteiligt sind. Die drei wichtigsten sind wahrscheinlich:

- ein depolarisierender transienter Kalzium-Einwärtsstrom durch T-Typ-Kalziumkanäle,
- der Acetylcholin-sensitive, auswärts gerichtete (repolarisierende) Kaliumstrom  $I_{K(ACh)}$ ,
- der Schrittmacherstrom  $I_f$ .

Die ersten Beschreibungen eines Hyperpolarisations-aktivierten Stroms stammen von Noma und Irisawa sowie von Brown et al. [Noma und Irisawa 1976, Brown et al. 1979]. Letztere gaben dem Strom den Namen  $I_f$ . Das »f« steht dabei für »funny«, da der Ionenstrom einige »komische« Eigenschaften besitzt. Inzwischen ist klar, dass dieser Strom

eine wesentliche Rolle bei der Entstehung und Regulation der spontanen diastolischen Depolarisation im Sinusknoten spielt.

$I_f$  konnte in Schrittmacherzellen von verschiedenen Säugetieren nachgewiesen werden, z. B. in Meerschweinchen [Yu et al. 1993], Hunden [Yu et al. 1995] und Ratten [Cerbai et al. 1994b, Cerbai et al. 1996], aber auch im menschlichen Myokard [Cerbai et al. 1997, Porciatti et al. 1997, Hoppe und Beuckelmann 1998].

Dieser Einwärtsstrom weist einige physiologische Besonderheiten auf, die noch nicht vollständig verstanden sind. Der Schrittmacherstrom  $I_f$  ist ein zeit- und spannungsabhängiger, nichtselektiver, einwärts gerichteter Kationenstrom [DiFrancesco 1981]. Der Strom wird durch Natrium- und Kaliumionen getragen. Typischerweise wird dieser Strom *in-vitro* durch Zugabe von Cäsium zu isolierten Myozyten blockiert, nicht aber durch Barium [DiFrancesco 1982]. Die Aktivierung des Ionenkanals erfolgt durch Hyperpolarisation, abhängig vom Zelltyp bei einem Potenzial von etwa  $-60$  bis  $-120$  mV.

Eine weitere Eigenschaft des Kanals stellt die direkte Modulation durch zyklische Nukleotide dar. Die entscheidende Funktion übernimmt dabei cAMP, das die Aktivierungspotenzial von  $I_f$  um etwa 10 bis 15 mV in den positiveren Bereich verschiebt [DiFrancesco und Tortora 1991, Ludwig et al. 1998]. Auch cGMP ist in der Lage, die Öffnung des Kanals zu beeinflussen, allerdings nicht in dem Maße wie cAMP. Durch diese Potenzialverschiebung in Richtung des positiven Bereiches wird die Kinetik des Kationenkanals dahingehend beeinflusst, dass eine frühere und schnellere Depolarisation stattfindet [DiFrancesco und Tortora 1991]. Folglich können Neurotransmitter wie z. B. Adrenalin, die intrazellulär cAMP freisetzen,  $I_f$  dahingehend steuern, dass es schneller zu einem Aktionspotenzial kommt, wodurch dann wiederum die Herzfrequenz erhöht wird [Brown et al. 1979, Porciatti et al. 1997]. Analog wird durch die Verminderung der intrazellulären cAMP-Konzentration der Herzschlag verlangsamt.

Obwohl  $I_f$  elektrophysiologisch vergleichsweise gut erforscht ist, bestand lange Zeit Unklarheit darüber, wie der Ionenkanal auf molekularer Ebene aufgebaut ist. Erst durch die Arbeit von Ludwig et al. konnte eine Proteinfamilie identifiziert werden, die alle Eigenschaften von  $I_f$  aufweist [Ludwig et al. 1998]. Allerdings wurde kontrovers diskutiert, ob  $I_f$  tatsächlich eine essentielle Rolle bei der Autonomie des Herzens zukommt oder nicht [DiFrancesco 1995, Vassalle 1995]. Erst vor kurzem konnte zum einen nachgewiesen werden, dass  $I_f$  in Myozyten in der Tat einer der wichtigsten Ströme ist, der die spontane diastolische Depolarisation einleitet; zum anderen fand die Arbeitsgruppe heraus, dass die HCN-Isoformen 2 und 4 wie vermutet die molekulare Basis dieses Kationenstroms darstellen [Er et al. 2003]. Für die Isoform 1 konnte dieser Zusammenhang für das Kaninchenherz gezeigt werden [Moroni et al. 2001].

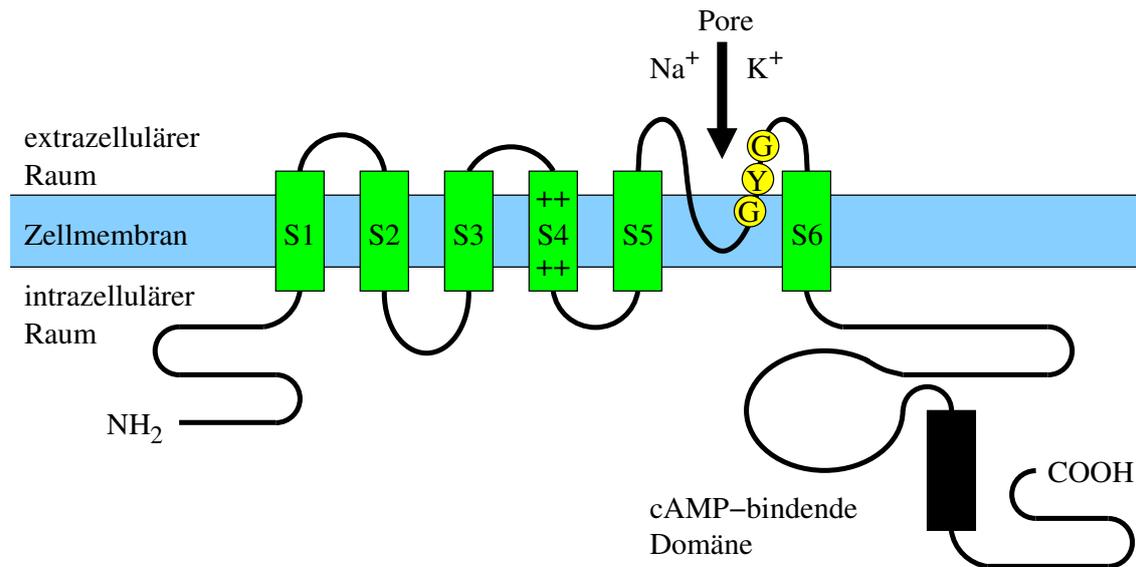


Abbildung 1.1: Schematische Struktur der humanen HCN-Kanäle [Robinson und Siegelbaum 2003]

In Abbildung 1.1 ist die Struktur der HCN-Kanäle schematisch dargestellt. Die HCN-Kanäle 1 bis 4 weisen – neben den gleichen elektrophysiologischen Eigenschaften wie  $I_f$  – strukturelle Gemeinsamkeiten auf. Alle Kanäle bestehen aus sechs transmembranösen Domänen (S1-S6), wobei S4 positiv geladen und für die Spannungsabhängigkeit verantwortlich ist. Zwischen den Regionen S5 und S6 befindet sich die Pore, durch die sowohl Natrium- als auch Kaliumionen ins Zellinnere geschleust werden. Kennzeichnendes Merkmal ist hier die Aminosäuresequenz G-Y-G (Glycin, Tyrosin, Glycin), die in nahezu allen Kaliumkanälen gefunden wird und die Selektivität der Pore für Kaliumionen determiniert [Doyle et al. 1998]. Tatsächlich leiten HCN-Kanäle Kaliumionen etwa vierfach besser als Natriumionen [Wollmuth und Hille 1992, Ho et al. 1994], allerdings eben nicht ausschließlich. Daher muss man davon ausgehen, dass der Selektivitätsfilter des Kanals etwas von seiner Funktion verloren hat. Biel et al. erklären dieses Phänomen dadurch, dass nicht nur die Sequenz G-Y-G ausschlaggebend sei, sondern auch die Carbonylreste dieser Aminosäuren, die bei streng kaliumspezifischen Kanälen durch aromatische Aminosäuren in der Umgebung stabilisiert werden und so ein starres Gerüst bilden. Bei HCN-Kanälen fehlen diese stabilisierenden Aminosäuren, so dass das G-Y-G-Gerüst weniger starr ist und nun offensichtlich auch Natriumionen die Passage erlaubt [Biel et al. 1999]. Weiterhin existiert intrazellulär am Carboxyterminus eine CNB-Domäne (CNBD, Cyclic Nucleotide Binding Domain), an der die zyklischen Nukleotide, vor allem cAMP, andocken und die Funktion modulieren können [Ludwig et al. 1998]. Innerhalb dieser Kanalfamilie finden sich Aminosäuresequenzen, die hoch konserviert sind. Dazu gehören außer

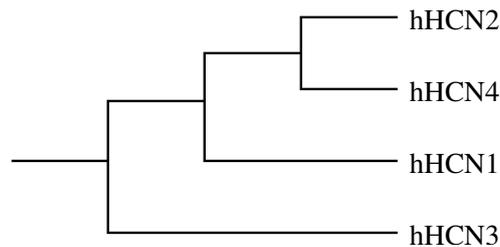


Abbildung 1.2: Dendrogramm der humanen HCN-Kanäle (hHCN). Dargestellt ist die phylogenetische Verwandtschaft, berechnet durch Vergleich der korrespondierenden Aminosäuresequenzen von Segment S1 bis zum Ende der CNBD [Biel et al. 1999].

den transmembranösen Abschnitten S1–S6 auch die Porenregion und die CNB-Domäne. An den Amino- und Carboxytermini hingegen unterscheiden sich die einzelnen Kanäle [Santoro und Tibbs 1999].

Seit einiger Zeit ist die Lokalisation des HCN2-Gens im menschlichen Chromosomensatz bekannt. Vaccari et al. gelang es, das Gen in der Telomerregion des Chromosoms 19, Bande p13.3 zu sequenzieren [Vaccari et al. 1999].

Ursprünglich wurde der hier untersuchte Kanal HAC1 (*hyperpolarization activated cation channel*) genannt [Ludwig et al. 1998], später wurde die Nomenklatur der Kanalfamilie in HCN geändert [Clapham 1998, Biel et al. 1999].

Der in der Zwischenzeit ebenfalls klonierte Kanal HCN4 [Ludwig et al. 1999, Seifert et al. 1999] kommt – wie HCN2 – im Gehirn und Herzen vor und ist im Kaninchenmyokard für etwa 80 % der HCN-mRNA Expression verantwortlich [Shi et al. 1999, Moosman et al. 2001]. In diesen Arbeiten konnte auch gezeigt werden, dass HCN1 entgegen früherer Annahmen doch im Herzen exprimiert wird – allerdings in geringen Mengen, die gerade über der Nachweisgrenze der in den erwähnten Arbeiten benutzten Methoden liegen.

Bei der Herzinsuffizienz wird das Auftreten von ektopten Automatien durch das verlängerte Aktionspotenzial in der spontanen diastolischen Depolarisation begünstigt [Tomasselli et al. 1994]. Die elektrophysiologischen Grundlagen der ektopten Reizbildung sind bislang noch nicht vollständig aufgeklärt, allerdings gibt es Hinweise darauf, dass der Hyperpolarisations-aktivierte Einwärtsstrom  $I_f$  an der Entstehung beteiligt sein könnte [Escande et al. 1986]. Cerbai et al. konnten zeigen, dass bei 18 Monate alten spontan hypertensiven Ratten im Vergleich zu jungen (2 Monate) ein deutlich höherer Einwärtsstrom messbar ist, der die gleichen elektrophysiologischen Merkmale wie  $I_f$  aufweist [Cer-

bai et al. 1994b]. Gleichzeitig weisen die Myozyten dieser Tiere ein verlängertes Aktionspotenzial in der diastolischen Depolarisationsphase auf, was als Möglichkeit angesehen wird, ektope Automatismen zu begünstigen [Cerbai et al. 1994b]. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass  $I_f$  im Herzen von spontan hypertensiven Ratten im Vergleich zu normotensiven Ratten erhöht ist [Cerbai et al. 1996]. Da die spontan hypertensiven Ratten als Tiermodell für die Entstehung einer Herzinsuffizienz auf dem Boden einer Hypertonie angesehen werden [Bing et al. 1995], liegt die Vermutung nahe, dass  $I_f$  auch beim Menschen im Rahmen der Herzinsuffizienz erhöht ist und somit zum plötzlichen Herztod durch Tachyarrhythmien beitragen könnte. Neuere Erkenntnisse bestätigen diese Hypothese. Die Stromdichte von  $I_f$  ist in insuffizienten gegenüber normalen Myozyten erhöht [Cerbai et al. 2001]. Dabei scheint nicht das Ausmaß der Hypertrophie, sondern vielmehr die Ätiologie der Herzinsuffizienz darüber zu entscheiden, wie stark die Stromdichte erhöht ist.

## 1.2 Hypothese und Ziele der Dissertation

### 1.2.1 Hypothese

Das stromtragende Kanalprotein des Hyperpolarisations-aktivierten Kationenkanals HCN2 wird bei terminal insuffizienten menschlichen Herzen vermehrt exprimiert (und kann die erhöhte Stromdichte von  $I_f$  erklären).

### 1.2.2 Ziele

Die Ziele der Arbeit sind

1. die Expression der HCN2-mRNA im menschlichen Herzen zu untersuchen,
2. die HCN2-mRNA Expression in terminal insuffizienten Herzen und nichtinsuffizienten Kontrollherzen zu quantifizieren und zu vergleichen,
3. die Expression in fünf verschiedenen Regionen des Herzens (rechter und linker Vorhof bzw. Ventrikel sowie Ventrikelseptum) quantitativ zu bestimmen und zu vergleichen.

Die Auswahl von HCN2 lag darin begründet, dass dieser Kanal zum Zeitpunkt des Designs der Dissertation 1998 als einzige der bekannten Isoformen im Herzen exprimiert wurde, wohingegen sowohl HCN1 als auch HCN3 lediglich im Gehirn nachgewiesen werden konnten. Das Vorkommen von HCN4 im Herzen und besonders im Sinusknoten war noch umstritten.

## 2 Methoden

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 RNA-Präparation nach der APGC-Methode

Die Gesamt-RNA des Herzgewebes wurde nach der APGC-Methode (Acid Phenol Guanidinium Chloroform) isoliert [Chomczynski und Sacchi 1987].

Zunächst wurden 0,5 g myokardiales Gewebe in flüssigem Stickstoff zermörsert, dann in Falcon-Gefäße in 5 ml kalter Lösung D aufgenommen und sofort polytronisiert ( $3 \times 15$  sec, je 30 sec Pause, Stufe 5). Es wurden nacheinander 0,5 ml 2 M Natriumacetat (pH 4), 5 ml wassergesättigtes Phenol und 1 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugegeben. Nach jeder Zugabe wurde die Lösung für 1 min auf dem Vortexgerät gemischt. Nach 15 min Inkubation auf Eis folgte eine Zentrifugation (Beckman, J-6B) für 30 min bei  $5.000 \times g$ . Der wässrige Überstand wurde in neue Sarstedt-Röhrchen überführt, mit gleichem Volumen eiskaltem Isopropanol versetzt und für 30 min bei  $-80^\circ\text{C}$  präzipitiert. Die RNA wurde in einer Kühlzentrifuge (Beckman, J-6B) für 30 min bei  $4^\circ\text{C}$  und  $5.000 \times g$  pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das RNA-Pellet in 1,5 ml Lösung D gelöst. Nach Zugabe von gleichem Volumen Isopropanol wurde die Suspension über Nacht bei  $-80^\circ\text{C}$  gefällt. Es folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei  $4^\circ\text{C}$  und  $5.000 \times g$  in der Kühlzentrifuge. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und 10 min bei  $7.500 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Die Proben wurden an der Luft getrocknet und in definiertem Volumen Aqua ad iniectabilia aufgenommen. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch (260 nm) ermittelt und die Qualität auf einem 1%igen Agarosegel überprüft.

#### 2.1.2 Gelelektrophoretische Überprüfung der RNA

Die Überprüfung der Qualität der präparierten RNA erfolgte mittels Auftrennung der Proben in einem Agarosegel. Das Agarosegel hatte folgende Zusammensetzung: 1 % Agarose,

1 × MOPS, 2 % säurefreies Formaldehyd, 0,0375 % Ethidiumbromid. Von der Gesamt-RNA wurden 5 µg auf 5 µl Volumen mit Aqua ad iniectabilia aufgefüllt, mit zweifachem Volumen Denaturierungspuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach Abkühlung wurde 1 µl Ladepuffer hinzugegeben. Anschließend wurden die RNA-Proben in die Geltaschen überführt und horizontal bei 60 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden unter UV-Beleuchtung auf Polaroidfilm fotografiert. Diese Fotos erlaubten eine Beurteilung der Qualität der Präparation und ließen Rückschlüsse auf Degradation und Verunreinigungen zu.

### 2.1.3 Reverse Transkription

Die mRNA des linken Ventrikels wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA diente als Matrize für die nachfolgende PCR mit spezifischen Primern.

Dazu wurde die aus den Herzen extrahierte Gesamt-RNA (5 µg) mit Oligo-dT (25-mer bis 30-mer) versetzt und auf 12 µl mit Aqua ad iniectabilia aufgefüllt. Der Ansatz wurde gemischt und 10 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend kühlte der Ansatz auf 42 °C ab. Es wurden 4 µl »first strand buffer«, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTP-Mix sowie 1 µl »Superscript II« zugegeben und erneut vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 42 °C wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 95 °C für 4 min gestoppt. Durch Zugabe von 40 µl Aqua ad iniectabilia erfolgte eine Verdünnung von 1:3.

### 2.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Aus dem Pool der Matrizen-cDNA wurden unter Verwendung spezifischer Primerpaare DNA-Fragmente von HCN2 mit der Polymerasekettenreaktion nach Saiki enzymatisch amplifiziert [Saiki et al. 1988].

Dazu wurde ein Ansatz von 50 µl pipettiert:

Matrizen-cDNA	2	$\mu$ l
Primer-Oligonukleotid 1	20	pmol
Primer-Oligonukleotid 2	20	pmol
Desoxynukleotide	100	$\mu$ M
10 $\times$ PCR-Puffer	5	$\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	1,5	mM
DMSO	1	$\mu$ l
Aqua ad iniectabilia	35,5	$\mu$ l
Taq-Polymerase	0,5	$\mu$ l (5 U/ $\mu$ l)

Als Primer wurden die folgenden Oligonukleotide verwendet:

- 5'-Region des HCN2:

- 309-HCN2 (5'): GCG TCA ACA AGT TCT CGC T
- 309-HCN2 (3'): GGA TGA TCT CCG TGT TGT CC

- Region Mitte:

- 222-HCN2 (5'): ACC AGG GCA AGA TGT TTG AC
- 222-HCN2 (3'): ACA TCT TCT TCC CGA TGG TG

Die jeweiligen 3'-Primer waren komplementär zu den Basen der entsprechenden HCN2-Sequenz. Als Matrize diente die durch reverse Transkription wie oben beschrieben hergestellte cDNA. Der Reaktionsansatz wurde mit Paraffinöl überschichtet. Die PCR wurde nach einer fünfminütigen Denaturierungsphase bei 95 °C nach folgendem Zyklusprogramm durchgeführt:

Annealing	1 min	58 °C
Synthese	1 min	72 °C
Denaturierung	1 min	94 °C

Nach dem Durchlaufen von 35 Zyklen folgte eine 60 sec lange Annealing-Phase bei 58 °C. Als Nächstes wurde die Reaktion 10 min bei 72 °C gehalten, um die Taq-Polymerase zu inaktivieren. Anschließend wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt und gelagert.

### 2.1.5 Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte nach Größe elektrophoretisch in Agarosegelen. Dazu wurden die Ansätze mit 1/6 Volumen DNA-Ladepuffer und in 1–1,5%igen horizontalen Agarosegelen bei 60 V / 120 V aufgetrennt. Die Agarosegele wurden mit  $1 \times$  TBE hergestellt und dieser wurde auch als Laufpuffer verwendet. Durch Zusatz des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid in einer Konzentration von  $0,3 \mu\text{g/ml}$  wurde die DNA unter UV-Licht (360 nm) sichtbar gemacht.

Als DNA-Größenstandard wurde die 100 bp DNA Leiter ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) verwendet, die für die Größenbestimmung von doppelsträngiger DNA im Bereich von 100 bis 1.500 bp geeignet ist und – in definierter Menge (500 ng) aufgetragen – eine grobe Abschätzung der DNA-Menge der Proben ermöglicht.

### 2.1.6 Isolierung von DNA-Molekülen aus Low-melting-point-Agarosegelen

Um DNA-Fragmente einer bestimmten Größe zu isolieren, wurde die DNA zuerst in einem 1%igen Low-melting-point-Agarosegel (LMP-Gel) elektrophoretisch aufgetrennt. Das DNA-Fragment der gewünschten Größe wurde auf dem UV-Tisch mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in ein Eppendorfgefäß überführt und 10 min bei  $70^\circ\text{C}$  verflüssigt. Tris-gesättigtes Phenol (pH 7,4) wurde auf  $37^\circ\text{C}$  vorgewärmt, davon das gleiche Volumen zu dem verflüssigten Gelstück gegeben und sofort gemischt. Die Suspension wurde für 5 min in einer Eppendorfszentrifuge bei  $15.800 \times g$  zentrifugiert und die obere Phase abgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, gemischt und für 5 min bei  $11.600 \times g$  in der Eppendorfszentrifuge zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und mit 1/10 Volumen 4 M LiCl und gleichem Volumen  $-20^\circ\text{C}$  kaltem Isopropanol versetzt und gemischt. Der Ansatz wurde mindestens 30 min bei  $-80^\circ\text{C}$  präzipitiert und 30 min bei  $4^\circ\text{C}$  und  $15.800 \times g$  zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in  $15 \mu\text{l}$  Aqua ad iniectabilia aufgenommen. Die gewonnene Menge DNA wurde photometrisch quantifiziert.

### 2.1.7 Ligation

Die DNA-Fragmente wurden in die Multi-Cloning-Site des pGEM-T-Vektors ligiert. Die Menge an einzusetzendem Insert wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{50 \text{ ng Vektor} \times \text{Insertlänge (0,222 kb)}}{\text{Vektorlänge (3,0 kb)}} \times 3 = \text{Insertmenge [ng]}$$

Pro Reaktionsansatz (10  $\mu\text{l}$ ) wurden 50 ng Vektor-DNA und die entsprechend errechnete Menge an Insert eingesetzt. Zu jedem Ansatz wurden 5  $\mu\text{l}$  2  $\times$  Ligasepuffer und 1  $\mu\text{l}$  T4-DNA-Ligase (1 U/ $\mu\text{l}$ ) gegeben. Die Ligation erfolgte über zwei Stunden bei 25 °C.

### 2.1.8 Transformation

Vom Ligationsansatz wurden 8  $\mu\text{l}$  zu 100  $\mu\text{l}$  E. coli des Bakterienstammes DH<sub>5</sub> $\alpha$  gegeben, die für die Aufnahme des Plasmids bereits vorbereitet waren (so genannte kompetente E. coli). Der Ansatz wurde 10 min auf Eis gestellt, anschließend vorsichtig gemischt, 2 min bei 42 °C inkubiert und danach 2 min auf Eis gehalten. Zu jedem Ansatz wurde 1 ml LB-Medium gegeben und dieser dann eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Gelegentlich wurde das Gemisch invertiert. Anschließend wurden die Zellen auf einem Selektivnährboden (Agarplatten mit 4  $\mu\text{l}$  Ampicillin/ml LB-Medium) ausgestrichen, wodurch lediglich die Bakterien Kolonien bilden konnten, die das Plasmid aufgenommen hatten, da im Plasmid eine Ampicillin-Resistenz enthalten war. Die Agarplatten wurden dann bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

### 2.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA

#### 2.1.9.1 TELT-Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung kleinerer Mengen von Plasmid-DNA nach Holmes und Quigley [Holmes und Quigley 1981] wird für analytische Zwecke angewandt und dient der Überprüfung, ob die gewachsenen, resistenten Kolonien das Plasmid mit dem gewünschten Insert enthalten.

Aus den Übernachtskulturen wurde jeweils 1 ml in ein Eppendorfgefäß überführt; die Bakterien wurden in einer Eppendorffzentrifuge für 30 sec bei 15.800  $\times$  g sedimentiert. Auf das Pellet wurde nochmals 1 ml der Übernachtskultur gegeben und abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 250  $\mu\text{l}$  TELT-Lysis-Puffer resuspendiert, der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert und 5  $\mu\text{l}$  Lysozym (50 mg/ml, 250  $\mu\text{g}$ /Ansatz) zugegeben. Nach kurzem Mischen wurde der Ansatz 1 min bei 95 °C denaturiert und 5 min auf Eis abgekühlt.

Die denaturierten Proteine wurden für 10 min bei  $11.600 \times g$  abzentrifugiert, das Sediment wurde mit einem Zahnstocher entfernt. Zur Fällung der Nukleinsäuren wurde der Überstand mit  $500 \mu\text{l}$  100 % Ethanol versetzt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und 10 min in der Eppendorffzentrifuge sedimentiert ( $11.600 \times g$ , Raumtemperatur). Die Nukleinsäuren wurden mit 80 % Ethanol gewaschen, kurz an der Luft getrocknet und in Aqua ad iniectabilia aufgenommen.

### 2.1.9.2 Large Scale Präparation von Plasmid-DNA

Um größere Mengen von Plasmid-DNA für die *in-vitro*-Transkription zu gewinnen, wurde eine Large Scale Präparation (so genannte Großpräparation) nach dem Protokoll der Firma Qiagen (von 1995) durchgeführt.

Aus einer Übernachtskultur des plasmidtragenden Bakterienstammes wurden 3 ml mit  $40 \mu\text{l}$  Ampicillin versetzt, in 10 ml LB-Medium gegeben und über Tag bei  $37^\circ\text{C}$  geschüttelt. Der gesamte Ansatz wurde in 500 ml LB-Ampicillin ( $2 \mu\text{l}$  Ampicillin/ml LB-Medium) gegeben und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  unter Schütteln inkubiert. Die Bakterienkultur wurde in Portionen von circa 170 ml für 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  und  $2.200 \times g$  in einer Vakuumzentrifuge (Beckman, J2-21) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml P1-Puffer resuspendiert. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei RT. Anschließend wurden 10 ml P2-Puffer hinzugegeben, vorsichtig invertiert und der Ansatz 5 min bei RT stengelassen. Die anschließende Zugabe von 10 ml P3-Puffer führte zur Fällung von SDS, genomischer DNA und Proteinen aus den lysierten Bakterienzellen. Zur verstärkten Präzipitation wurde die P3-Lösung vorgekühlt und der Ansatz für 30 min auf Eis gehalten. Der Ansatz wurde für 30 min bei  $4^\circ\text{C}$  und  $28.000 \times g$  in einer Kühlzentrifuge (Beckman, J2-21) zentrifugiert und der Überstand, der die Plasmide enthielt, über Gaze ( $\varnothing 120 \mu\text{m}$ ) in Falcons filtriert. Der Überstand wurde für 20 min bei  $4^\circ\text{C}$  und  $2.800 \times g$  in einer Kühlzentrifuge (Beckman, J6-B) zentrifugiert und erneut durch Gaze auf eine äquilibrierte Qiagen-tip 500 Säule gegeben. Die Qiagen-Säule wurde dann zweimal mit 30 ml QC-Waschpuffer gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 15 ml QF-Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde durch Fällung mit gleichem Volumen Isopropanol bei  $-80^\circ\text{C}$  für 30 min und 30 min Zentrifugation bei  $4^\circ\text{C}$  und  $5.000 \times g$  präzipitiert (Beckman, J6-B). Das Pellet wurde mit 10 ml 70 % Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in Aqua ad iniectabilia aufgenommen und die DNA-Konzentration photometrisch bei 260 nm ermittelt. Die Lagerung der DNA erfolgte bei  $4^\circ\text{C}$ .

### 2.1.10 Restriktionsverdau zur Überprüfung der Orientierung des Inserts im Vektor

Ein Restriktionsverdau wurde nach der TELT-Minipräparation angeschlossen, um die Anwesenheit und Orientierung des Inserts im pGEM-T Vektor zu überprüfen. Dazu wurden je 2,5  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA, 1  $\mu\text{l}$  RNase A, 8–10 U Restriktionsenzym pro 1–10  $\mu\text{g}$  DNA, 1  $\mu\text{l}$  10  $\times$  Restriktionspuffer pipettiert und mit Aqua ad iniectabilia auf 20  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Die Reaktion dauerte 2 h bei 37 °C. Es wurden Puffer und Zusätze nach Herstellerangaben verwendet. Die Reaktion wurde in einem 1%igen Agarosegel überprüft.

### 2.1.11 DNA-Konzentrationsbestimmung

Der DNA-Gehalt einer Lösung wird durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Der Absorptionswert 1 bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht einer DNA-Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Des Weiteren wird die Absorption bei 280 nm gemessen, die ein Maß für die Verunreinigung der Lösung mit Proteinen darstellt. Die Ratio 260 nm/280 nm stellt die Reinheit der DNA dar; für reine DNA-Lösungen liegt sie zwischen 1,8 und 1,95.

### 2.1.12 Restriktionsverdau zur Linearisierung des Vektors

Das aus der Large Scale Präparation gewonnene Plasmid muss für eine *in-vitro*-Transkription zur Herstellung einzelsträngiger RNA-Sonden für den RNase Protection Assay linearisiert vorliegen. Dazu wurde mit 20  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA ein Restriktionsverdau wie unter 2.1.10 beschrieben über Nacht in einem Endvolumen von 20  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Für den Vektor pGEM-T mit dem HCN2-Insert wurden die Restriktionsenzyme NcoI und PstI verwendet; für pGEM-2 mit dem  $G_{s\alpha}$ -Insert wurden EcoRI und BanI eingesetzt. Die Überprüfung des Verdau erfolgte gelelektrophoretisch in einem 1%igen Agarosegel.

### 2.1.13 RNase Protection Assay (RPA)

Der RNase Protection Assay wurde nach dem Protokoll der Firma Ambion (von 1998) mit geringen Modifikationen nach Mittmann et al. durchgeführt [Mittmann et al. 1998].

Für diese sensitive Nachweismethode wurde zunächst für eine zu untersuchende mRNA eine komplementäre RNA-Sonde (cRNA) hergestellt. Diese RNA, die im Folgenden als antisense-Sonde bezeichnet wird, war dann auf Grund ihrer  $^{32}\text{P}$ -Markierung detektierbar. Die Sonde hybridisierte mit der zu untersuchenden mRNA und wurde so vor einem Verdau durch RNase A/T<sub>1</sub> geschützt. Die Menge an geschützter antisense-Sonde ist proportional zur Menge der gesuchten mRNA.

Als interner Standard für die Quantifizierung der zu untersuchenden mRNA und um Beladungsunterschiede auszugleichen, wurde eine antisense-Sonde von  $G_{s\alpha}$  eingesetzt, da sich die Konzentration von  $G_{s\alpha}$ -mRNA im humanen insuffizienten Herzen nicht verändert [Eschenhagen et al. 1992]. Für die *in-vitro*-Transkription wurde  $G_{s\alpha}$ -cDNA der Ratte eingesetzt. Die cDNA war in den Vektor pGEM-T inseriert worden und ergab nach Linearisierung mit BanI ein Fragment von 153 nt Länge ausgehend vom T7-Promotor (93 nt spezifische Sonde und 60 nt Multi-Cloning-Site). Dadurch, dass sowohl die gesamte antisense-Sonde für  $G_{s\alpha}$  als auch deren spezifischer Teil kürzer waren als die entsprechende antisense-Sonde für HCN2 (308 nt bzw. 222 nt spezifische Sonde), wurden Interferenzen zwischen dem zu messenden HCN2-Signal und Degradationsprodukten von  $G_{s\alpha}$  vermieden.

### 2.1.13.1 *in-vitro*-Transkription der antisense-Sonden

Für die *in-vitro*-Transkription der cRNA-Sonde des 222-HCN2-Fragments wurde folgender Ansatz pipettiert:

Linearisiertes Plasmid pGEM-T	2	$\mu\text{l}$	=	1	$\mu\text{g}$
ATP (10 mM)	2	$\mu\text{l}$	=	20	nmol
CTP (10 mM)	2	$\mu\text{l}$	=	20	nmol
GTP (10 mM)	2	$\mu\text{l}$	=	20	nmol
DTT (10 mM)	2	$\mu\text{l}$	=	20	nmol
10 $\times$ Transkriptionspuffer	2	$\mu\text{l}$			
RNasin (40 U/ $\mu\text{l}$ )	0,5	$\mu\text{l}$			
$^{32}\text{P}$ -UTP (800 Ci/mmol)	50	$\mu\text{Ci}$	=	62,5	pmol
SP6-Polymerase	1	$\mu\text{l}$			
Aqua ad iniectabilia	ad 20	$\mu\text{l}$			

Um vergleichbare Signalintensitäten beim RNase Protection Assay zu erzielen (da  $G_{s\alpha}$  wesentlich stärker exprimiert wird als das Ionenkanalprotein HCN2), wurde das  $^{32}\text{P}$ -UTP

für die *in-vitro*-Transkription der G<sub>sα</sub>-antisense Sonde im Verhältnis 1:8 mit nicht radioaktivem UTP versetzt. Analog zu 222-HCN ergab sich für G<sub>sα</sub> dieser Ansatz:

Linearisiertes Plasmid pGEM-2	2	μl	=	0,5	μg
ATP (10 mM)	2	μl	=	20	nmol
CTP (10 mM)	2	μl	=	20	nmol
GTP (10 mM)	2	μl	=	20	nmol
UTP (100 μM)	1,75	μl	=	175	pmol
DTT (10 mM)	2	μl	=	20	nmol
10 × Transkriptionspuffer	2	μl			
RNasin (40 U/μl)	0,5	μl			
<sup>32</sup> P-UTP (800 Ci/mmol)	20	μCi	=	25	pmol
T7-Polymerase	1	μl			
Aqua ad iniectabilia	ad	20	μl		

Die Transkription lief 2 h bei 25 °C. Im Anschluss an die Transkription erfolgte ein DNase-Verdau mit 10 U DNase (RNase-frei) für 15 min bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μl EDTA 0,5 M, pH 8 beendet. Die Transkriptionsansätze wurden mit dem gleichen Volumen an Formamid-Ladepuffer versetzt und für 4 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung der Sonden erfolgte auf einem 5 % Long-Ranger-Sequenziergel (siehe unten), die Lage der Sonden wurde durch eine zweiminütige Exposition des Gels auf einem Röntgenfilm identifiziert. Die entsprechenden Banden wurden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und über Nacht bei 37 °C in Elutionspuffer inkubiert.

### 2.1.13.2 Hybridisierung der cRNA antisense-Sonde mit der RNA der Gewebeprobe

Für die Hybridisierung der cRNA-antisense Sonde mit der RNA des Herzwes wurden folgende Ansätze pipettiert:

RNA aus Gewebeprobe	10	μg
10 × Transkriptionspuffer	3	μl
RNasin (10 U/μl)	1	μl
DNase I (10 U/μl)	1	μl
Sonde	85.000	dpm
Aqua ad iniectabilia	ad	30 μl

Die Ansätze wurden für 15 min bei 37 °C inkubiert, anschließend auf Eis mit Aqua ad iniectabilia auf 100  $\mu$ l aufgefüllt und mit 1/10 Volumen  $\text{NH}_4\text{OAc}$  versetzt. Nach Zugabe des 2,5fachen Volumens 100 % Ethanol erfolgte die Fällung bei –80 °C für 30 min. Die RNA wurde bei 4 °C 30 min bei  $15.800 \times g$  pelletiert (Hettich-Kühlzentrifuge) und in 20  $\mu$ l Hybridisierungslösung resuspendiert. Nach einer Denaturierung der RNA bei 95 °C für 4 min erfolgte die Hybridisierung der Proben bei 45 °C über Nacht.

### 2.1.13.3 RNase-Verdau

Der Hybridisierungsansatz wurde mit 200  $\mu$ l RNase A/T<sub>1</sub> (Verdünnung 1,3:100 in Bx-Lösung) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle wurden 2.000 dpm der Sonde nur mit 200  $\mu$ l Lösung Bx ohne RNase versetzt.

Der RNase-Verdau wurde durch Zugabe von 300  $\mu$ l auf –20 °C vorgekühlter Lösung Dx gestoppt, die Proben mit 100  $\mu$ l Ethanol 100 % versetzt und bei –80 °C für 30 min gefällt. Der Reaktionsansatz wurde bei 4 °C und  $15.800 \times g$  für 30 min pelletiert (Hettich-Kühlzentrifuge).

Die pelletierte RNA aus dem Verdau wurde in 8  $\mu$ l Formamid-Ladepuffer aufgenommen und 4 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend konnten die Proben mit einer Long-Ranger-Gelelektrophorese aufgetrennt werden.

### 2.1.13.4 Long-Ranger-Elektrophorese

Die Aufreinigung der markierten cRNA-Sonden sowie die Auftrennung der Proben aus dem RNase-Protection-Assay erfolgte durch Gelelektrophorese in einem 5 % Long-Ranger-Sequenziergel. Die radioaktiv markierten antisense-Sonden wurden durch Exposition des Gels auf einem Röntgenfilm lokalisiert, während die Zuordnung der Banden von HCN2 und  $G_{s\alpha}$  im RPA anhand der unverdauten markierten Sonden möglich war. Zur Kontrolle wurde ein DNA-Standard ( $\Phi$  X174 DNA/Bsu I (Hae III)) radioaktiv markiert und mit 2.000 dpm ebenfalls aufgetragen.

Das Gel setzte sich wie folgt zusammen:

Harnstoff	0,07	M
Long-Ranger-Gelsolution	5	%
10 × TBE	12	%
TEMED	0,05	%
Ammoniumpersulfat	0,05	%

Das Gel wurde zwischen zwei vorher gereinigte Glasplatten, von denen eine silanisiert war, gegossen, so dass sich eine Geldicke von ca. 0,5 mm ergab. Als Laufpuffer diente  $0,6 \times$  TBE. Nach einer Vorlaufzeit von 15 min (cRNA-Sonden) bzw. 30 min (RPA) erfolgte die Auftrennung der Proben bei 35 Watt (cRNA-Sonden) bzw. 55 Watt (RPA) innerhalb von 1 h. Das Gel wurde dann nach Abnehmen der silanisierten Glasplatte mit einem Whatman-Papier von der zweiten Glasplatte abgehoben und für eine Stunde bei  $80^\circ\text{C}$  in einem Gel-Trockner gelagert. Anschließend wurde das getrocknete Gel auf einer Phosphoimager-Platte 24 h exponiert.

Diese Platte wurde dann mit einem speziellen Lesegerät (BAS 2000, Fuji, Japan) eingescannt und als Graustufendatei ausgegeben. Eine zunehmende Schwärzung einer Bande in dieser Datei entsprach dabei einem intensiveren Signal der entsprechenden Probe. Auf jeder Spur wurden die Banden von HCN2 und  $G_{s\alpha}$  markiert, so dass die Berechnung der relativen Signalintensität in »arbitrary units« durch das Programm TINA (Version 2.0, Raytest, Deutschland) ermöglicht wurde.

### 2.1.13.5 Quantifizierung

Die ermittelten Signalintensitäten wurden wie oben beschrieben densitometrisch ausgewertet und die Einzelwerte, die auf Doppelbestimmung beruhten, anhand der Standardgeraden der gepoolten RNA quantifiziert und als prozentualer Anteil dieses RNA-Pools zusammengefasst. Die Standardgeraden wurden durch eine aufsteigende Reihe des RNA-Pools (1, 2, 3, 5, 10, 15  $\mu\text{g}$  RNA in Doppelbestimmung) erstellt. Eventuell vorhandene Beladungsunterschiede wurden normalisiert, indem HCN2 auf den internen  $G_{s\alpha}$ -Standard korrigiert wurde. Dafür wurden die ermittelten Werte für HCN2 durch den Quotienten aus dem entsprechenden  $G_{s\alpha}$ -Wert derselben Spur und dem durchschnittlichen  $G_{s\alpha}$ -Wert des gesamten Versuches geteilt. Zur anschließenden absoluten Quantifizierung wurden drei RNase Protection Assays mit sense-RNA-Sonden von HCN2 durchgeführt. Aus diesen Ergebnissen wurden das arithmetische Mittel und der zugehörige Standardfehler des Mittelwertes berechnet.

## 2.2 Gewebeentnahme und klinische Daten

### 2.2.1 Myokardiales Gewebe

Für die Untersuchung stand Myokardgewebe von explantierten terminal insuffizienten menschlichen Herzen zur Verfügung, das von Mitarbeitern des Pharmakologischen Institutes durch Kooperation mit Herzchirurgischen Abteilungen des Universitätsklinikums Eppendorf und des Umlandes über Jahre akquiriert worden war und tiefgefroren gelagert wurde. Die Patienten waren auf Grund einer dilatativen (DCM) oder ischämischen Kardiomyopathie (ICM) therapierefraktär terminal herzinsuffizient und mussten transplantiert werden. Als Kontrolle wurde Gewebe aus gesunden explantierten Spenderherzen verwendet, die wegen technischer oder medizinischer Probleme nicht transplantiert werden konnten.

Zur Gewebeasservierung wurden die Herzen jeweils unmittelbar im Anschluss an die Explantation in einer eiskalten, modifizierten Tyrodelösung, die kontinuierlich bei pH 7,4 mit 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> begast wurde, ins Labor transportiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert.

### 2.2.2 Patientencharakteristik

In Tabelle 2.1 auf Seite 21 sind die klinischen und hämodynamischen Daten der Patienten mit Herzinsuffizienz sowie die Todesursachen der herzgesunden Kontrollpersonen zusammengefasst, von denen das Myokard stammte.

Insgesamt stand das Herzgewebe von 36 verschiedenen Personen für diese Arbeit zur Verfügung. Davon hatten 14 Patienten eine dilatative Kardiomyopathie (DCM), 11 Patienten eine ischämische Kardiomyopathie (ICM), weitere 11 Personen waren herzgesunde Organspender (NF).

Das Geschlechterverhältnis war in allen drei Gruppen deutlich zu Gunsten männlicher Patienten verschoben (m/w bei DCM: 12/2, ICM: 10/1, NF: 7/2). Der Median des Alters der Personen bei Explantation des Herzens unterschied sich bei den beiden herzinsuffizienten Patientengruppen kaum; er lag für die DCM-Gruppe bei 55,5 Jahren und für die ICM-Gruppe bei 56 Jahren. Der Altersmedian der herzgesunden Kontrollgruppe betrug 44 Jahre.

## 2.3 Statistische Methoden

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde der U-Test von Mann-Whitney herangezogen. Dieser nonparametrische – oder auch verteilungsfreie – Test eignet sich für Vergleiche zweier unabhängiger Stichproben, die jeweils wenig Messwerte (bis ca. 20) aufweisen. Im Gegensatz zum Student's t-Test entfällt beim U-Test die Voraussetzung, dass die Stichproben normalverteilt sein müssen. Die Nullhypothese  $H_0$  besagt, dass zwei zu vergleichende Stichproben aus formgleich verteilten Populationen mit identischem Medianwert stammen. Wird der U-Test signifikant, ist davon auszugehen, dass sich die Mediane der zu Grunde liegenden Populationen unterscheiden ( $H_1$ ) [Bortz und Lienert 1998]. Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha = 0,05$  festgelegt.

Lfd. Nr.	Geschl. [m/w]	Alter [Jahre]	NYHA	PCP [mm Hg]	EF [%]	CI [l/min·m <sup>-2</sup> ]	Präoperative Medikation	
Dilatative Kardiomyopathie	1	m	15	IV	–	–	2,19	A, D, G, N
	2	w	22	III–IV	12	16,3	1,9	A, D, G
	3	m	43	III	30	–	2,35	A, D, N
	4	m	48	III–IV	35	–	1,73	A, C, D, G, N
	5	m	50	III	–	–	–	A, D, N
	6	m	51	IV	30	25	1,5	A, D, G, N
	7	m	54	–	25	23	2,3	A, D, G, N, S
	8	m	57	III	24	25	2,8	A, C, D, G, N
	9	m	58	III	–	10–20	–	A, B, D, G, N
	10	w	58	III–IV	42	–	1,9	A, D, G, N
	11	m	59	III	39	–	1,7	A, C, D, G, N
	12	m	59	IV	–	–	–	A, C, D, G, N
	13	m	61	IV	6	<20	2,2	A, D, G
	14	m	64	III	6	32	2,8	A, C, D, G, N
Ischämische Kardiomyopathie	1	m	38	IV	20	25–20	3,17	A, D, G, N, S
	2	m	46	–	–	–	1,7	A, G, N
	3	m	50	–	21	35	3,00	A, G, N
	4	m	55	III	15	20	2,87	D, G, N
	5	m	55	III	30	10–15	1,5	A, D, G
	6	w	56	III	27	20	2,31	A, C, D
	7	m	57	II–III	–	–	1,9	A, B, D, G
	8	m	57	III–IV	–	–	–	D, G, N
	9	m	61	–	–	20	–	D, G
	10	m	62	III–IV	–	–	1,6	A, D, G
	11	m	64	III–IV	30	–	1,8	A, D, G, S
Gesunde Kontrollen	1	m	16	Gesundes Transplantatherz 2 Tage nach Transplantation				
	2	m	18	Suizid durch Kopfschuss				
	3	m	19	Wahrscheinlich Unfalltod / Hirnmassenblutung				
	4	m	36	Akute Hirnblutung bei Verdacht auf Aneurysma				
	5	m	44	Subarachnoidalblutung				
	6	w	46	Hirnblutung bei Schädel-Hirn-Trauma				
	7	w	50	SAB bei Verdacht auf Basilarisaneurysma				
	8	m	53	Hirntod durch Hirnblutung im rechten Ventrikel				
	9	m	56	Subarachnoidale und intrazerebrale Blutung				
	10	–	–	–				
	11	–	–	–				

Tabelle 2.1: Klinische und hämodynamische Daten der Patienten

NYHA: Klinische Klassifikation nach der New York Heart Association; m: männlich; w: weiblich; PCP: Pulmonarkapillardruck; EF: Ejektionsfraktion; CI: Herzindex; A: ACE-Inhibitoren; B: Betablocker; C: Ca<sup>2+</sup>-Kanalinhibitoren; D: Diuretika; G: Herzglykoside; N: Organische Nitrate; S: Sympathomimetika; –: Keine Daten vorhanden

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Qualitativer Nachweis der HCN2-Expression im menschlichen Myokard

Zum Nachweis des HCN2-Kanals wurden zwei verschiedene spezifische HCN2-Fragmente mit einer Polymerasekettenreaktion aus Gesamt-RNA aus menschlichen Herzen amplifiziert. Als Matrize diente dabei cDNA, die aus Gesamt-RNA des linksventrikulären menschlichen Myokards revers transkribiert wurde (siehe 2.1.3). Durch Verwendung zwei verschiedener Primerpaare sollten dabei Fragmente aus der 5'-Region und der Mitte des HCN2 mit den jeweiligen Längen 309 bp sowie 222 bp entstehen. Die Fragmente entsprachen den Positionen 85–393 (309-HCN2; 5'-Region) und 1087–1308 (222-HCN2; Mitte) innerhalb der für HCN2 kodierenden Gensequenz, die unter dem Zugriffscode AF064877 in der EMBL-Gendatenbank hinterlegt ist. Als Positivkontrolle wurde die mRNA des Enzyms Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) verwendet, da diese ubiquitär in menschlichen Zellen vorkommt. Als Negativkontrolle wurde in einem Reaktionsansatz keine cDNA zugesetzt.

Die Überprüfung der Reaktionsansätze durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel zeigte die erwarteten Fragmente (Abb. 3.1): Das 309 bp-Fragment aus der 5'-Region (Spur 3) und das 222 bp-Fragment aus der Mitte des HCN2 (Spur 4). Die Positivkontrolle (Spur 2) wies eine deutliche Bande bei 356 bp auf (ein Fragment der GAPDH). In der Leerkontrolle (Spur 5) fanden sich erwartungsgemäß keine Banden.

Zur Kontrolle wurden die amplifizierten DNA-Fragmente von HCN2 sequenziert (Firma MediGenomix, Planegg-Martinsried). Die Sequenzierung bestätigte, dass die Sequenzen der Amplifikate der menschlichen Sequenz von HCN2 entsprachen – mit Ausnahme einer einzigen Base an der Stelle 1208, die in der Gendatenbank ein Cytosin trug, während die hier hergestellte Sequenz ein Thymin enthält. Durch mehrmalige Wiederholungen der Versuche und Rücksprache mit dem Erstbeschreiber der Sequenz stellte sich heraus, dass die in der Gendatenbank enthaltene Sequenz fehlerhaft war.

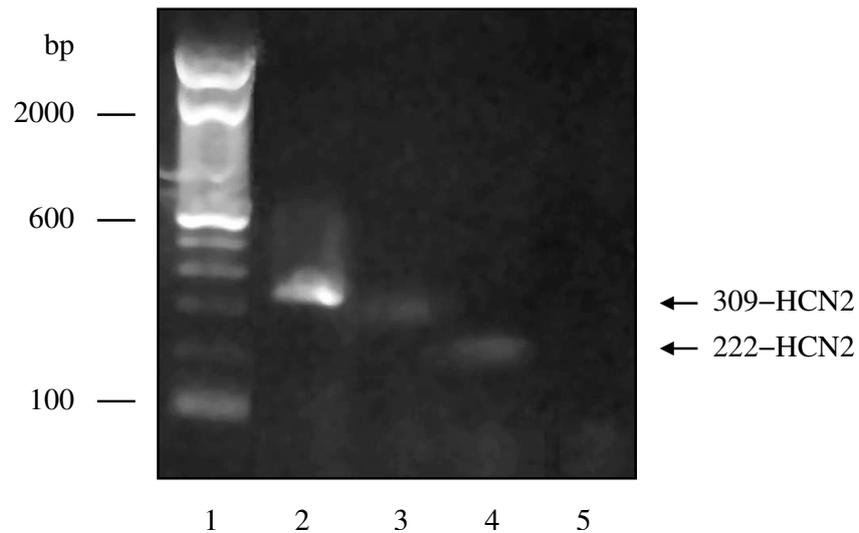


Abbildung 3.1: Gelelektrophoretische Auftrennung der HCN2-Fragmente aus der PCR-Amplifikation

Spur 1: DNA-Molekulargewichtsstandard (100 bp Leiter); Spur 2: GAPDH (356 bp); Spur 3: 309-HCN2 (309 bp); Spur 4: 222-HCN2 (222 bp); Spur 5: Leerkontrolle

Mit diesem Experiment konnte der qualitative Nachweis erbracht werden, dass HCN2 tatsächlich im menschlichen Myokard exprimiert wird.

## 3.2 Quantitative Bestimmungen der HCN2-mRNA-Expression im menschlichen Herzen mittels RPA

Auf Grund des bei Ionenkanälen zu erwartenden relativ niedrigen Expressionsniveaus wurde für die Quantifizierung der HCN2-mRNA der RNase Protection Assay als sehr sensitives und spezifisches Nachweisverfahren gewählt. Die Nachweisgrenze beim RPA liegt für mRNA bei etwa 0,1 pg.

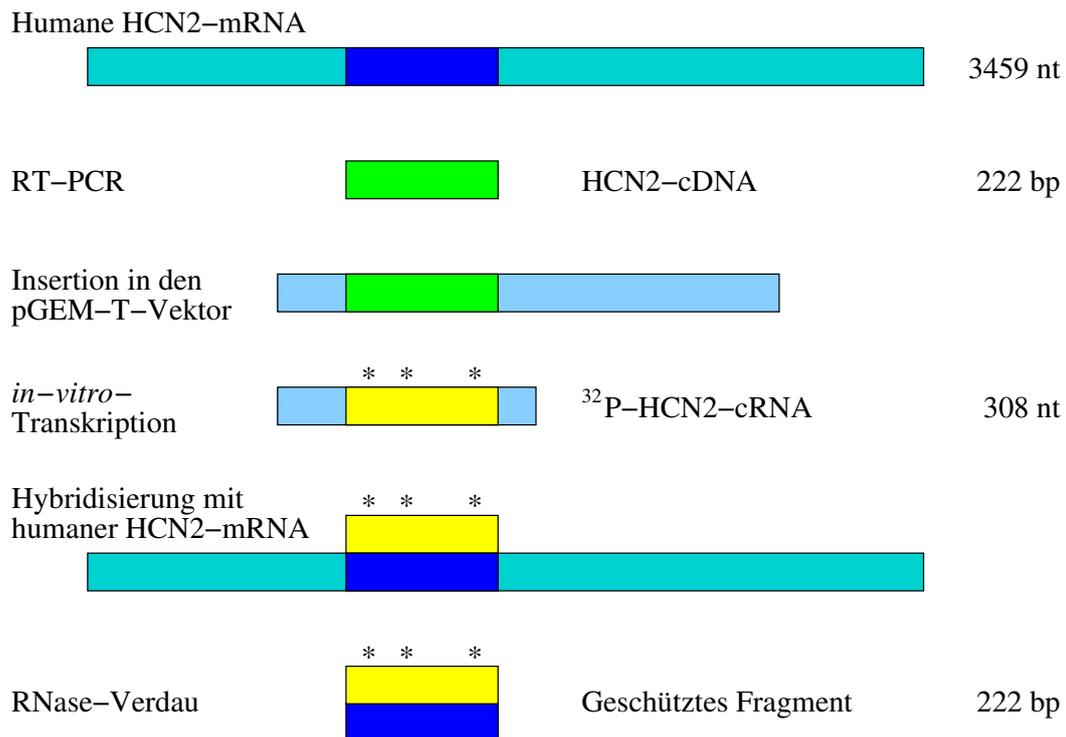


Abbildung 3.2: Schematischer Ablauf der Vorbereitung und Durchführung eines RNase Protection Assay

### 3.2.1 Schematische Zusammenfassung des Ablaufs eines RPA

Als Voraussetzung für die Durchführung der RNase Protection Assays wurde zunächst aus menschlicher myokardialer mRNA durch eine reverse Transkription eine zum 222-HCN2-Fragment komplementäre cDNA in der Polymerasekettenreaktion hergestellt (Abbildung 3.2). Diese wurde in den pGEM-T-Vektor ligiert. Anschließend wurde eine *in-vitro*-Transkription des linearisierten Plasmids durchgeführt, wobei radioaktiv markiertes UTP eingesetzt wurde. Die daraus entstandene komplementäre cRNA-Sonde (»antisense-Sonde«) konnte mit den entsprechend passenden RNA-Strängen aus den Gewebeproben des humanen Myokards hybridisieren, so dass sich eine doppelsträngige RNA ausbildete. Beim anschließenden RNase-Verdau war die doppelsträngige RNA nun geschützt, da das RNA-spaltende Enzym lediglich einzelsträngige RNA abbaut – daher der Name *RNase Protection Assay*. Die Menge an geschützter RNA-antisense-Sonde ist dabei proportional zur Menge der mRNA (1:1). Abschließend erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung der Reaktionsansätze, so dass mittels Autoradiografie die gewünschten Banden qualitativ und quantitativ detektiert werden konnten.

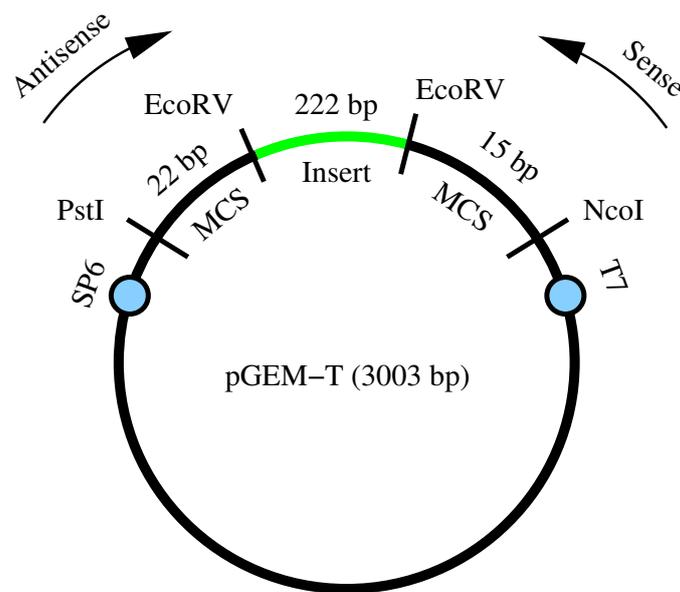


Abbildung 3.3: 222-HCN2 im Plasmidvektor pGEM-T

SP6: Promotorregion für die SP6-RNA-Polymerase; T7: Promotorregion für die T7-RNA-Polymerase; EcoRV, PstI, NcoI: Schnittstellen der jeweiligen Restriktionsenzyme; MCS: Multi-Cloning-Site; Insert: cDNA-Fragment 222-HCN2

## 3.2.2 Ergebnisse der vorbereitenden Experimente für den RPA

### 3.2.2.1 Herstellung der RNA-Sonde für HCN2

Zur Vorbereitung der Insertion wurde das mittels PCR amplifizierte cDNA-Fragment 222-HCN2 in einem Low-melting-point-Gel aufgereinigt und extrahiert. Dieses cDNA-Fragment wurde dann über die EcoRV-Schnittstelle in pGEM-T ligiert (siehe 2.1.7).

Der schematische Aufbau dieses Plasmidvektors ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Die Gesamtlänge des Vektors ohne Insert beträgt 3003 bp; dadurch ergibt sich für die Länge des Vektors inklusive Insert 3225 bp (3003 bp + 222 bp). Da das DNA-Fragment 222-HCN2 keine Erkennungssequenz für die Restriktionsenzyme PstI und NcoI besitzt, konnten diese in einem späteren Schritt zum Linearisieren des Vektors für die *in-vitro*-Transkription verwendet werden. Dadurch sollten sich zwei Fragmente ergeben, zum einen von 259 bp Länge (222-HCN2-DNA flankiert von je einem Stück der Multi-Cloning-Site des pGEM-T, insgesamt 22 bp + 222 bp + 15 bp), zum anderen von 2966 bp Länge (restlicher Vektor).

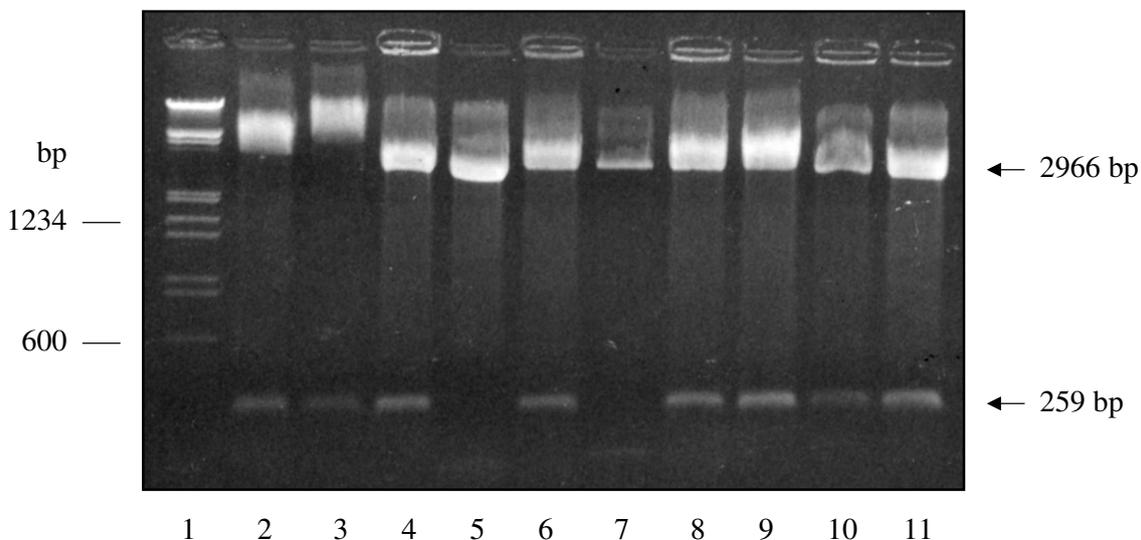


Abbildung 3.4: Gelelektrophorese eines Restriktionsverdau zur Überprüfung des Vorhandenseins des HCN2-Fragments im Vektor pGEM-T  
Spur 1: DNA-Molekulargewichtsstandard (EcoRI / HindIII); Spuren 2–11: Plasmide verschiedener Kolonien, die mit NcoI und PstI verdaut wurden

Zur Überprüfung, ob die Insertion des 222-HCN2-Fragments in den Plasmidvektor erfolgreich verlaufen war, wurde das Plasmid in kompetente *E. coli* DH<sub>5</sub> $\alpha$  transformiert (siehe 2.1.8) und auf Selektivnährböden vermehrt. Von den gewachsenen Bakterienstämmen wurden 16 Kolonien ausgewählt und die Plasmid-DNA mit einer TELT-Minipräparation isoliert. Anschließend wurde die DNA des Plasmidvektors und Inserts in einem Restriktionsverdau überprüft. Die Abbildung 3.4 zeigt die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente von elf repräsentativen Restriktionsansätzen. Alle Proben wurden mit den Restriktionsenzymen PstI und NcoI geschnitten, wodurch – wie oben ausgeführt – zwei Fragmente entstehen sollten; einerseits mit 259 bp, andererseits mit 2966 bp Länge.

Das Ergebnis der Gelelektrophorese zeigt, dass die meisten Bakterienkolonien den Plasmidvektor pGEM-T inklusive der inserierten HCN2-cDNA aufgenommen hatten. Damit war die Insertion des HCN2-Fragments in den Vektor erfolgreich.

Für die nachfolgenden RPAs wurde die Kolonie gewählt, deren Plasmid in Spur 11 abgebildet ist. Die Kolonie wurde in einer Übernachtskultur vermehrt (siehe 2.1.9). Anschließend wurde sie mit einer Großpräparation (Large Scale) isoliert und aufgereinigt, so dass für alle RPAs ausreichend Plasmid zur Herstellung <sup>32</sup>P-markierter RNA-Sonden zur Verfügung stand. Es ergab sich dabei eine Ausbeute von 0,78  $\mu$ g DNA/ $\mu$ l.

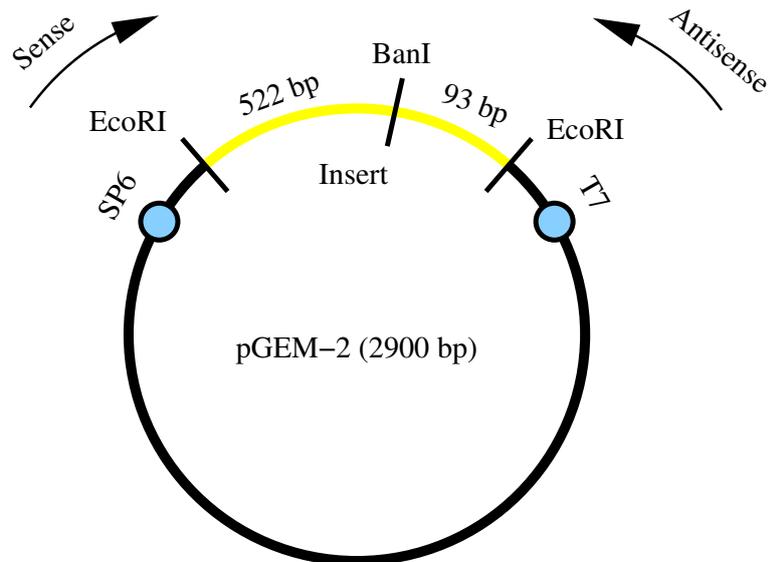


Abbildung 3.5:  $G_{s\alpha}$  im Plasmidvektor pGEM-2

SP6: Promotorregion für die SP6-RNA-Polymerase; T7: Promotorregion für die T7-RNA-Polymerase; EcoRI, BanI: Schnittstellen der jeweiligen Restriktionsenzyme; Insert: cDNA-Fragment  $G_{s\alpha}$

### 3.2.2.2 Herstellung der RNA-Sonde für $G_{s\alpha}$

Als interner Standard für den RNase Protection Assay wurde die  $\alpha$ -Untereinheit des menschlichen stimulatorischen G-Proteins ( $G_s$ ) benutzt, weil die Expression dieser RNA bei Herzinsuffizienz unverändert bleibt [Eschenhagen et al. 1992]. Dadurch war es möglich, interexperimentelle Unterschiede sowie Beladungsunterschiede auszugleichen. Zum Einsatz kam ein DNA-Fragment, das für die  $\alpha$ -Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins ( $G_{s\alpha}$ ) der Ratte kodierte. Die Tatsache, dass cDNA der Ratte verwendet werden kann, obgleich die zu bestimmende  $G_{s\alpha}$ -mRNA aus menschlichem Myokard stammt, ist darin begründet, dass die  $G_{s\alpha}$ -Gensequenzen der Ratte und des Menschen eine große Homologie aufweisen. In der kodierenden Region des Gens findet man insgesamt eine Übereinstimmung der Basenpaare von etwa 95 % [Kozasa et al. 1988]. Der 615 bp lange ausgewählte Abschnitt für den RPA stimmte zu 100 % mit der menschlichen Sequenz überein.

In Abbildung 3.5 ist der Plasmidvektor pGEM-2 schematisch dargestellt, der für die Insertion der  $G_{s\alpha}$ -Sequenz benutzt wurde. Die Gesamtlänge des Vektors ohne Insert beträgt 2900 bp; dadurch ergibt sich für die Länge des Vektors inklusive Insert 3515 bp (2900 bp + 615 bp). Innerhalb der Sequenz von  $G_{s\alpha}$  existiert eine Schnittstelle für das Restriktions-

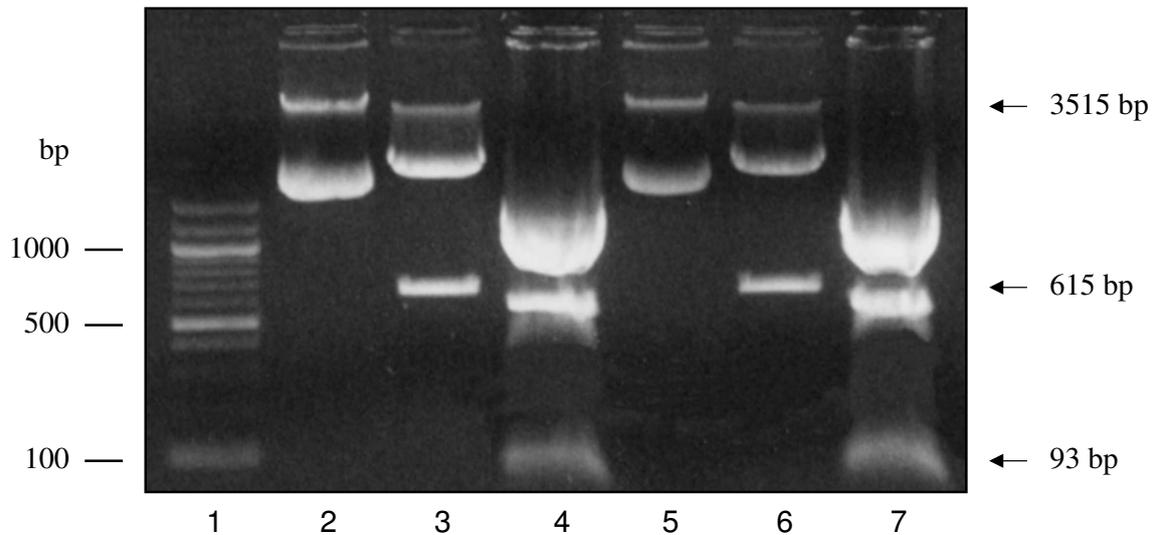


Abbildung 3.6: Überprüfung des Restriktionsverdaus von  $G_{s\alpha}$  in pGEM-2 durch Gelelektrophorese

Spur 1: DNA-Molekulargewichtsstandard (100 bp Leiter); Spur 2: Unverdauter Vektor pGEM-2; Spur 3: Verdau mit EcoRI; Spur 4: Verdau mit EcoRI und BanI; Spur 5–7: Analog zu Spur 2–4, jedoch andere Kolonie

enzym BanI, wodurch das Fragment in zwei kleinere Teile von 522 bp und 93 bp Länge zerteilt werden kann.

Die Insertion des  $G_{s\alpha}$ -Fragments in den Vektor pGEM-2 wurde analog zu 3.2.2.1 durchgeführt.

In Abbildung 3.6 ist das Ergebnis einer elektrophoretischen Auftrennung eines solchen Restriktionsverdaus dargestellt. Zur Interpretation der Fragmentlänge wurde in Spur 1 als DNA-Molekulargewichtsstandard die 100 bp Leiter mitgeführt. In Spur 2 wurde zur Kontrolle der unverdaute Vektor pGEM-2 aufgetragen; rechnerisch ergibt sich eine erwartete Fragmentlänge von 3515 bp. Beim Verdau des Plasmids mit EcoRI sollte das aufgenommene Insert aus dem Plasmid wieder herausgeschnitten werden, so dass zwei Fragmente bei 615 bp bzw. 2900 bp entstehen, zu sehen in Spur 3. Ein weiterer Restriktionsverdau mit EcoRI und zusätzlich BanI liefert ebenfalls den Vektor bei 2900 bp, außerdem wird das 615 bp lange cDNA-Fragment durch BanI in zwei kleinere Teile zerschnitten, die 522 bp bzw. 93 bp lang sind.

Nachdem die Insertion des cDNA-Fragments von  $G_{s\alpha}$  in den Vektor erfolgreich war, wurde auch hier eine plasmidtragende Kolonie in einer Übernachtskultur stark vermehrt und anschließend durch eine Großpräparation (Large Scale; 2.1.9) die Plasmid-DNA isoliert.

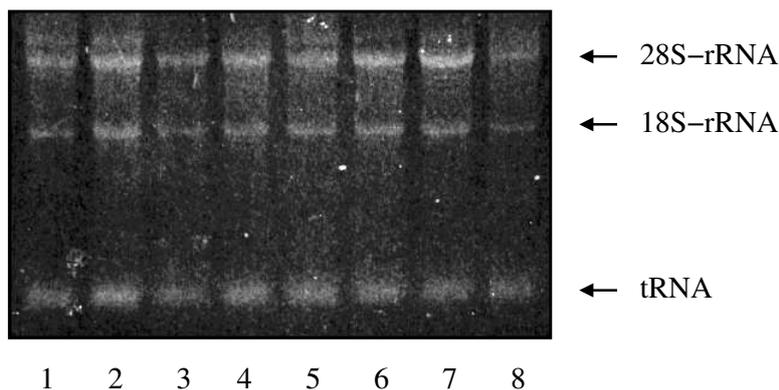


Abbildung 3.7: Elektrophorese präparierter RNA aus menschlichem Myokard  
Spuren 1–6: ICM; Spur 7: NF; Spur 8: DCM

### 3.2.2.3 RNA-Präparation aus verschiedenen Regionen terminal insuffizienter und gesunder menschlicher Herzen

Die Gesamt-RNA aus menschlichem Vorhof- und Ventrikelgewebe wurde mit der APGC-Methode [Chomczynski und Sacchi 1987] isoliert (siehe 2.1.1). Das eingesetzte myokardiale Gewebe stammte aus insuffizienten, bedingt durch ischämische ( $n = 11$ ) bzw. dilatative ( $n = 14$ ) Kardiomyopathie, und nichtinsuffizienten Herzen ( $n = 11$ ). Die durchschnittliche RNA-Ausbeute aus dem Gewebe insuffizienter Herzen betrug 0,45 ‰ des eingewogenen Gewichtes, bei nichtinsuffizienten Herzen lag sie im Mittel bei 1 Promille. Zur Präparation standen fünf verschiedene Herzregionen zur Verfügung, die jeweils separat behandelt wurden: Linker ( $n = 6$ ) und rechter Vorhof ( $n = 10$ ), linker ( $n = 17$ ) und rechter ( $n = 18$ ) Ventrikel sowie das Interventrikularseptum ( $n = 13$ ).

Die präparierten RNA-Proben wurden durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel überprüft. In Abbildung 3.7 ist exemplarisch ein solches Gel dargestellt. Es wurden pro Spur 5  $\mu\text{g}$  präparierte Gesamt-RNA aufgetragen. Die untere Bande entspricht der Transfer-RNA (tRNA). Die beiden mittleren Banden entsprechen der 18S- und 28S-rRNA. Die scharfen und deutlich erkennbaren Banden sprachen für die gute Qualität der RNA-Präparation. Demnach war die RNA während der Präparation nicht denaturiert, sondern intakt geblieben und konnte für spätere RNase Protection Assays eingesetzt werden.

Die in den Spuren 1–4 gezeigte RNA wurde später gepoolt und in den RNase Protection Assays als Standardreihe eingesetzt. Es handelte sich um Gewebe aus dem Interventrikularseptum eines Herzens mit ischämischer Kardiomyopathie (Spur 1) sowie um Gewebe aus dem rechten (Spur 2) und linken (Spuren 3 und 4) Ventrikel zweier verschiedener Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie. Die Ausbeute dieser Präparation betrug 3.782  $\mu\text{g}$

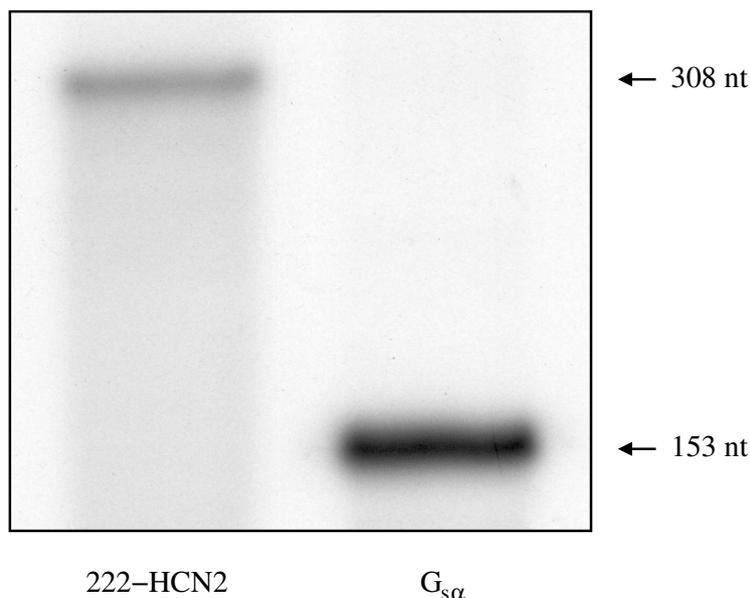


Abbildung 3.8: Autoradiografie der  $^{32}\text{P}$ -markierten cRNA antisense-Sonden von HCN2 und  $G_{s\alpha}$  nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Long-Ranger-Gel

RNA, was rechnerisch für etwa 50 RPAs genügte und damit ausreichend für alle geplanten Assays war.

#### 3.2.2.4 RNase Protection Assay und Auswertung

Das Plasmid HCN2/pGEM-T wurde für die *in-vitro*-Transkription durch einen Restriktionsverdau mit NcoI linearisiert;  $G_{s\alpha}$ /pGEM-2 wurde mit BanI linearisiert. Zur Durchführung jedes RPA wurden jeweils mit  $^{32}\text{P}$ -UTP markierte cRNA-Sonden hergestellt. Für HCN2 ergab sich eine 308 nt lange antisense-Sonde; d. h. 86 nt vektorielle Multi-Cloning-Site und 222 nt spezifische antisense-Sonde. Analog ergab sich für  $G_{s\alpha}$  eine 153 nt lange antisense-Sonde (60 nt Multi-Cloning-Site und 93 nt spezifische antisense-Sonde).

Die elektrophoretische Auftrennung der beiden einzelsträngigen RNA-Sonden in einem 5%igen Long-Ranger Sequenziergel ist exemplarisch in Abbildung 3.8 dargestellt. In der linken Spur ist die antisense-Sonde für HCN2 zu sehen, die ein deutlich schwächeres Signal aufweist als die  $G_{s\alpha}$ -Sonde (rechte Spur).

Nach der Extraktion der Sonden aus dem Gel wurden diese mit jeweils 10  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA aus verschiedenen Proben hybridisiert. Die verbliebenen – weder zu HCN2 noch zu  $G_{s\alpha}$  komplementären – einzelsträngigen RNA-Moleküle wurden durch Zugabe des

Enzyms RNase abgebaut. Anschließend wurde der Reaktionsansatz in einer Long-Ranger-Gelelektrophorese aufgetrennt und eine Autoradiografie des getrockneten Gels angefertigt und ausgelesen.

Abbildung 3.9 zeigt eine solche Autoradiografie eines repräsentativen RPA. In der linken Spur ist die unverdaute Probe zu sehen (»undigested«, beschriftet mit »u«), in der nur die antisense-Sonden ohne myokardiale RNA enthalten waren. Die einzelsträngigen Sonden von HCN2 und  $G_{s\alpha}$  lieferten erwartungsgemäß ein Signal bei 308 bzw. 153 nt. Die vollständig verdauten Sonden (in der Abbildung in der zweiten Spur von links, beschriftet mit »d« – »digested«) zeigten kein spezifisches Signal. In allen weiteren Spuren waren das spezifische HCN2-mRNA-Signal bei 222 nt und das Signal für  $G_{s\alpha}$  bei 93 nt erkennbar. Bei den eingesetzten Proben dieses RNase Protection Assays handelte es sich um die RNA dreier verschiedener Herzen mit ischämischer Kardiomyopathie, wobei die RNA in den ersten beiden Spuren (linker und rechter Ventrikel) und in den nächsten drei Spuren (linker und rechter Ventrikel, Interventrikularseptum) jeweils aus demselben myokardialen Gewebe stammte. Insgesamt wurden 16 RNase Protection Assays zur Untersuchung der HCN2-mRNA-Expression im menschlichen Myokard durchgeführt.

Der Größenunterschied in der Höhe des HCN2- und  $G_{s\alpha}$ -mRNA-Signals im Vergleich zur einzelsträngigen Sonde ist darauf zurückzuführen, dass bei der *in-vitro*-Transkription der antisense-Sonde ein Teil der Multi-Cloning-Site des Vektors transkribiert und radioaktiv markiert wird, welcher aber nicht komplementär zu der nachzuweisenden nativen mRNA ist, daher nicht hybridisiert und durch die RNase A/T<sub>1</sub> verdaut wird.

### 3.2.2.5 Quantitative Auswertung des RPA

Abbildung 3.10 zeigt die Standardgeraden zur Quantifizierung der HCN2-mRNA (a) und  $G_{s\alpha}$  (b). Bei jedem RPA wurde eine aufsteigende Standardreihe von 1, 2, 3, 5, 10 und 15  $\mu\text{g}$  RNA (jeweils in Doppelbestimmung) mit aufgetragen. Anschließend konnte die Linearität der gemessenen mRNA-Signale bestimmt werden, indem die Korrelation der Einzelwerte berechnet wurde. Es handelte sich bei dieser Standardreihe um gepoolte RNA, die aus menschlicher myokardialer Gesamt-RNA verschiedener Herzen stammte (siehe 3.2.2.3).

Bei beiden Graphen lässt sich erkennen, dass die Linearität sehr gut gegeben ist. Der Determinationskoeffizient  $r^2$  beträgt für die HCN2-Standardgerade 0,9976 und für die  $G_{s\alpha}$ -Standardgerade 0,9992. Demnach war die Intensität der Hybridisierungssignale der Standard-RNA für HCN2 und  $G_{s\alpha}$  im untersuchten Bereich der eingesetzten RNA-Menge (10  $\mu\text{g}$ ) linear.

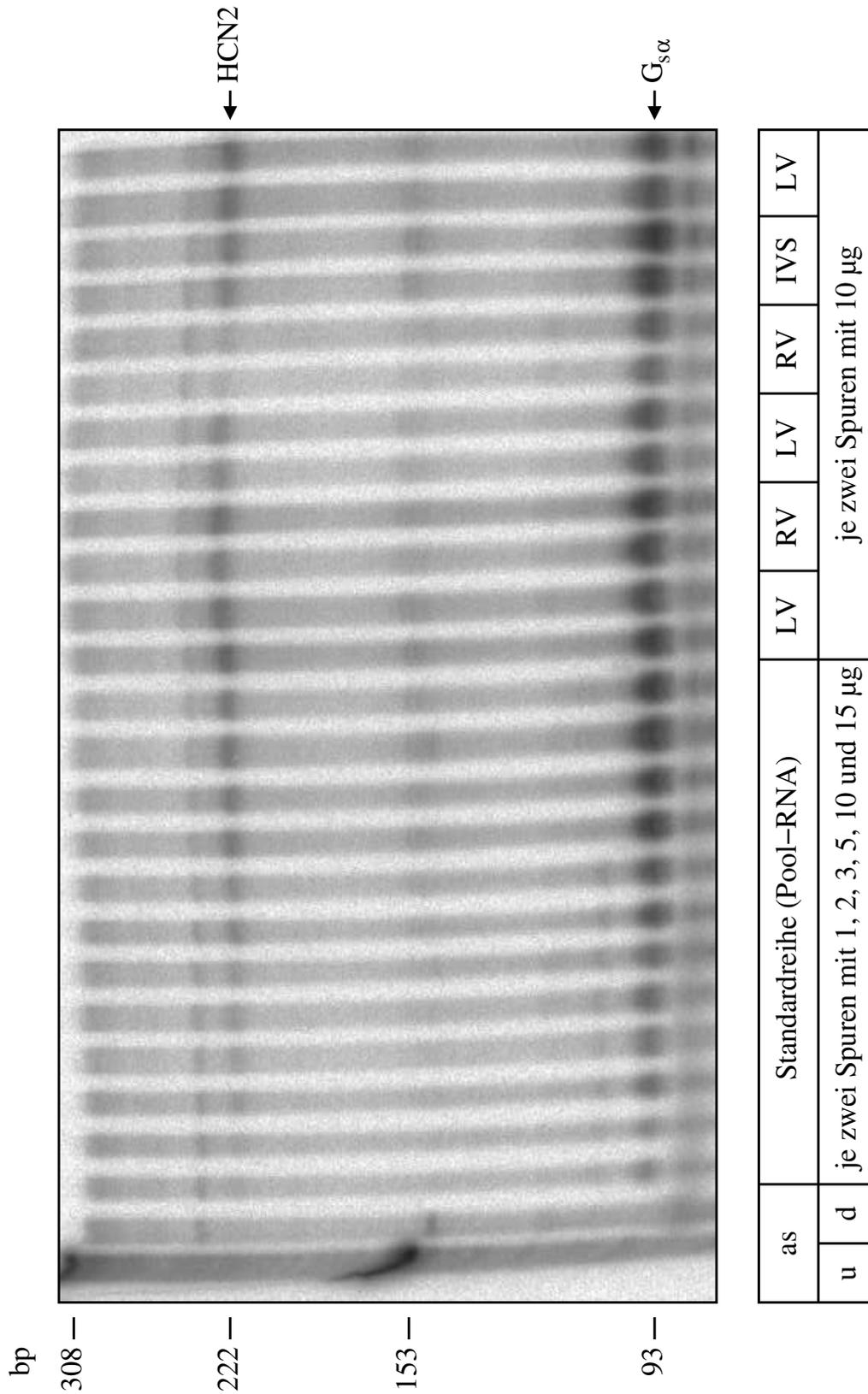
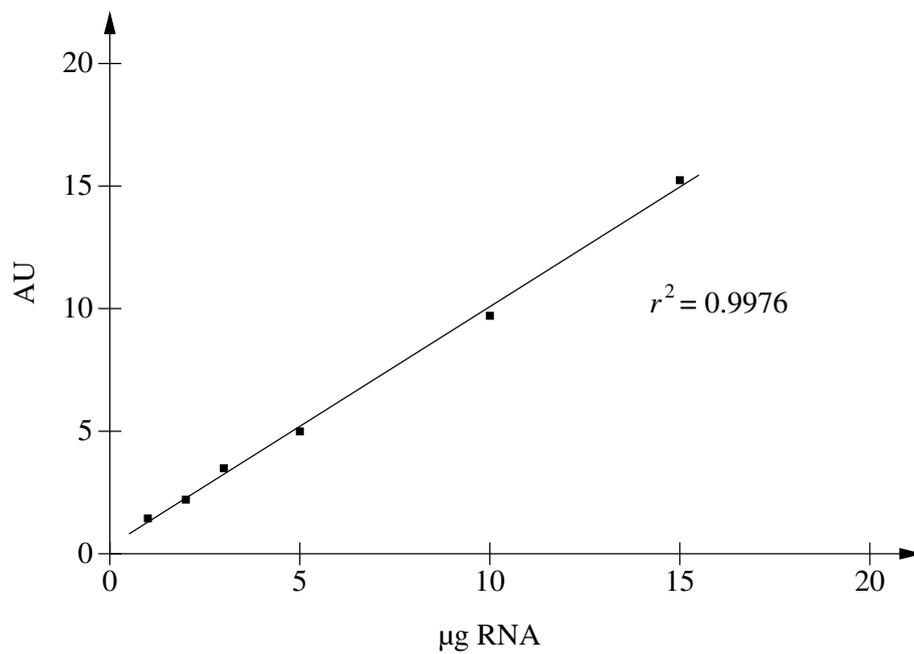
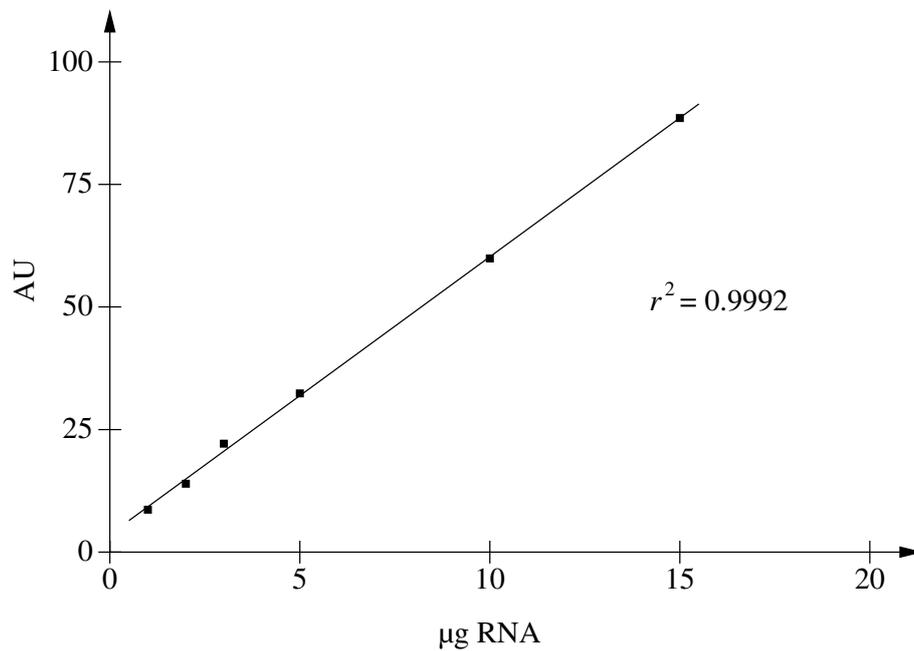


Abbildung 3.9: Autoradiografie eines repräsentativen RPA für HCN2 und G<sub>sα</sub>  
 as: antisense; u: unverdaut (»undigested«); d: verdaut (»digested«);  
 LV: Linker Ventrikel; RV: Rechter Ventrikel; IVS: Interventrikularseptum



(a) HCN2-Standardgerade

(b) G<sub>sα</sub>-StandardgeradeAbbildung 3.10: Standardgeraden für HCN2 und G<sub>sα</sub>

Die Standardgeraden zeigen auf der Ordinate den mRNA-Gehalt in Pixeleinheiten (»Arbitrary Units«) und auf der Abszisse die eingesetzte RNA-Menge der gepoolten menschlichen RNA in µg

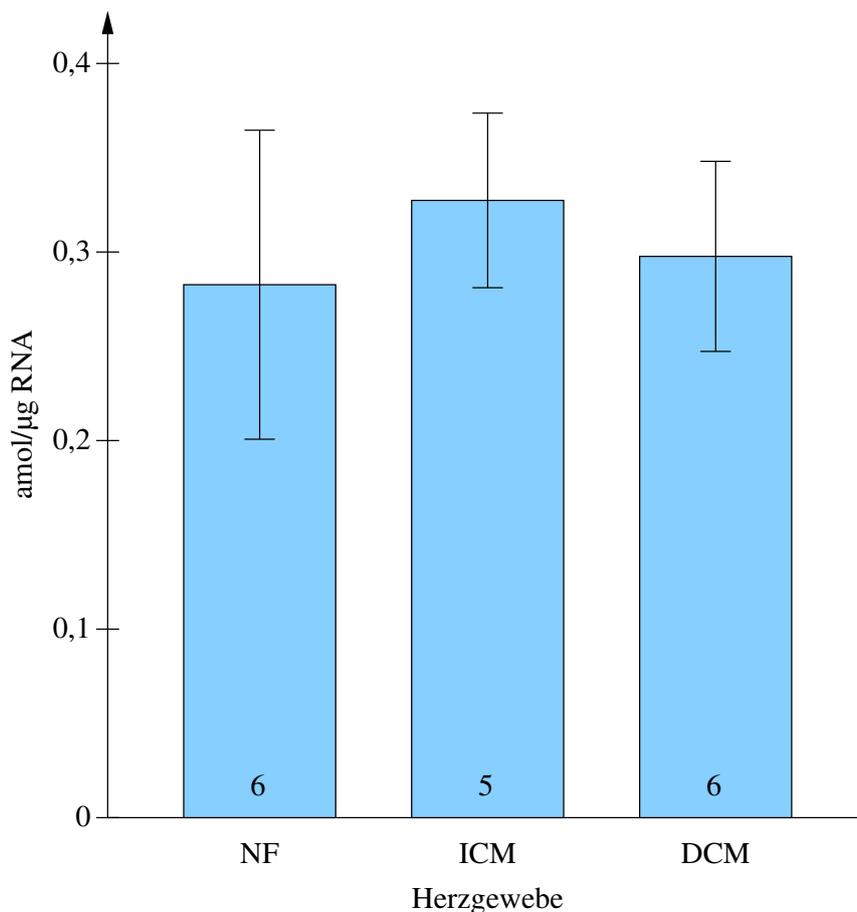


Abbildung 3.11: HCN2-mRNA-Expression im linksventrikulären Myokard ( $\text{amol}/\mu\text{g}$  Gesamt-RNA). Die Zahlen in den Säulen stehen für die jeweilige Anzahl der Proben. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert der Messungen sowie der Standardfehler.

NF: Gesundes Herzgewebe (Non-Failing); ICM: Ischämische Kardiomyopathie; DCM: Dilatative Kardiomyopathie

### 3.2.3 HCN2-mRNA-Expression in terminal insuffizienten im Vergleich zu nichtinsuffizienten Herzen

Für den Vergleich der HCN2-mRNA-Expression in Geweben aus insuffizientem versus nichtinsuffizientem Myokard wurde als repräsentative Region der linke Ventrikel betrachtet, da dieser bei Kardiomyopathien den stärksten Veränderungen unterworfen ist. Abbildung 3.11 zeigt die absolute HCN2-mRNA-Menge in  $\text{amol}/\mu\text{g}$  Gesamt-RNA. Für die Untersuchung stand das Gewebe aus nichtinsuffizienten menschlichen Herzen ( $n = 6$ ) sowie terminal insuffizienter Herzen mit ischämischer ( $n = 5$ ) und dilatativer Kardiomyo-

	Region				
	RA	LA	RV	IVS	LV
NF	0,465	0,132	0,180	0,224	0,283
SEM	–	0,028	0,072	0,079	0,082
n	1	3	4	5	6
ICM	0,324	0,144	0,157	0,188	0,327
SEM	0,071	–	0,034	0,022	0,046
n	3	1	7	3	5
DCM	0,389	0,145	0,097	0,233	0,298
SEM	0,059	0,014	0,020	0,057	0,050
n	6	2	7	5	6
Gesamt	0,377	0,138	0,139	0,219	0,301
SEM	0,041	0,013	0,022	0,036	0,035
n	10	6	18	13	17

Tabelle 3.1: HCN2-mRNA-Expression in verschiedenen Regionen des menschlichen Myokards, angegeben in  $\text{amol}/\mu\text{g}$  Gesamt-RNA, normalisiert auf  $G_{s\alpha}$ .

RA: Rechter Vorhof; LA: Linker Vorhof; RV: Rechter Ventrikel; IVS: Interventrikularseptum; LV: Linker Ventrikel; NF: Gesundes Herzgewebe (Non-Failing); ICM: Ischämische Kardiomyopathie; DCM: Dilatative Kardiomyopathie; SEM: Standardfehler; n: Anzahl der Proben

pathie ( $n = 6$ ) zur Verfügung. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der HCN2-Expression ( $p > 0,05$ ).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Verteilungsmuster der Expression von HCN2 in den verschiedenen Herzregionen im insuffizienten Myokard unverändert bleibt (Abbildung 3.12, Tabelle 3.1).

Die Unterschiede zwischen den Herzregionen waren bei allen drei untersuchten Stichproben – d. h. gesundes Herzgewebe, ischämische und dilatative Kardiomyopathie – weitestgehend gleich. Demnach konnte an den zur Verfügung stehenden Proben kein Einfluss einer ischämischen oder dilatativen Kardiomyopathie auf die Menge der detektierten HCN2-mRNA nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wurden bei der Untersuchung von nichtinsuffizientem und insuffizientem Myokard erwartungsgemäß keine signifikanten Unterschiede in der Menge der  $G_{s\alpha}$ -mRNA-Konzentration gefunden (Abbildung 3.13).

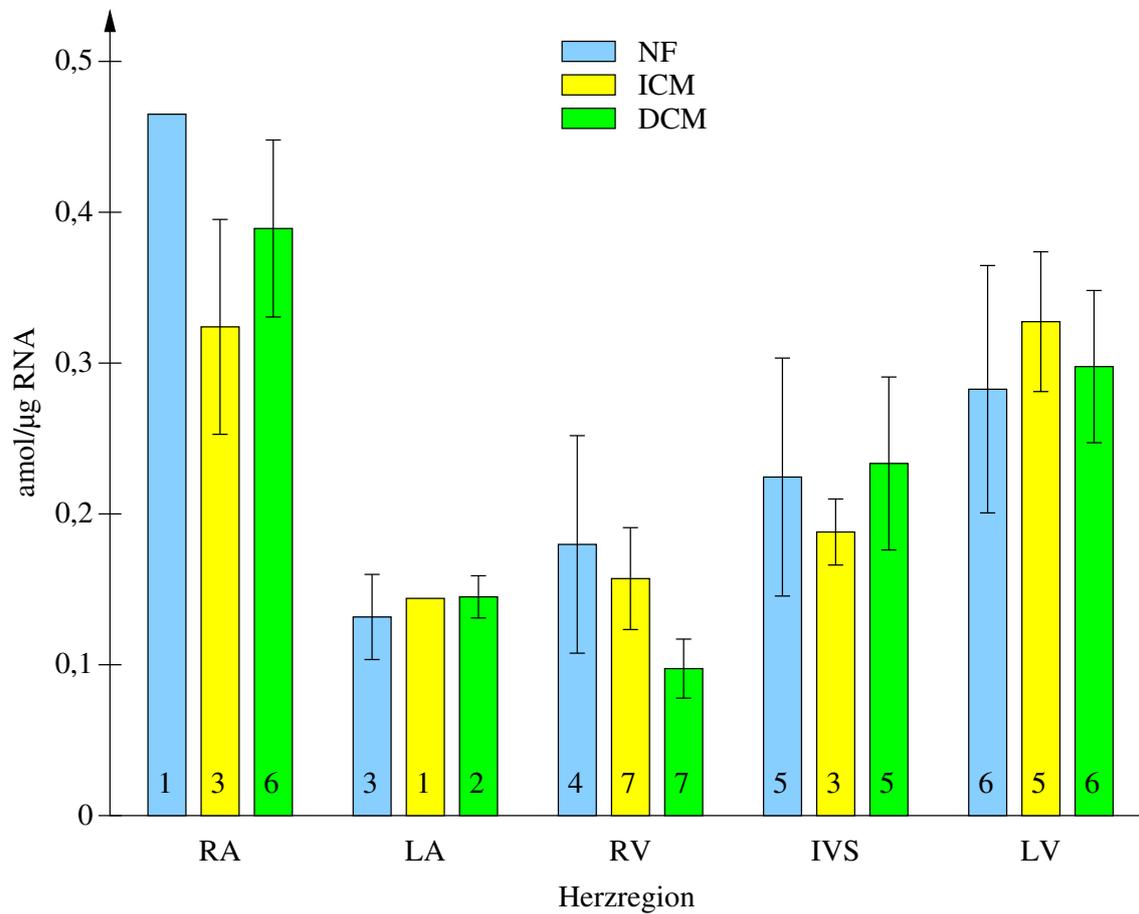


Abbildung 3.12: HCN2-mRNA-Expression in verschiedenen Regionen des menschlichen Myokards ( $\text{amol}/\mu\text{g}$  Gesamt-RNA). Die Zahlen in den Säulen stehen für die jeweilige Anzahl der Proben. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert der Messungen sowie der Standardfehler. Die Werte sind in Tabelle 3.1 angegeben.

RA: Rechter Vorhof; LA: Linker Vorhof; RV: Rechter Ventrikel; IVS: Interventrikularseptum; LV: Linker Ventrikel; NF: Gesundes Herzgewebe (Non-Failing); ICM: Ischämische Kardiomyopathie; DCM: Dilatative Kardiomyopathie

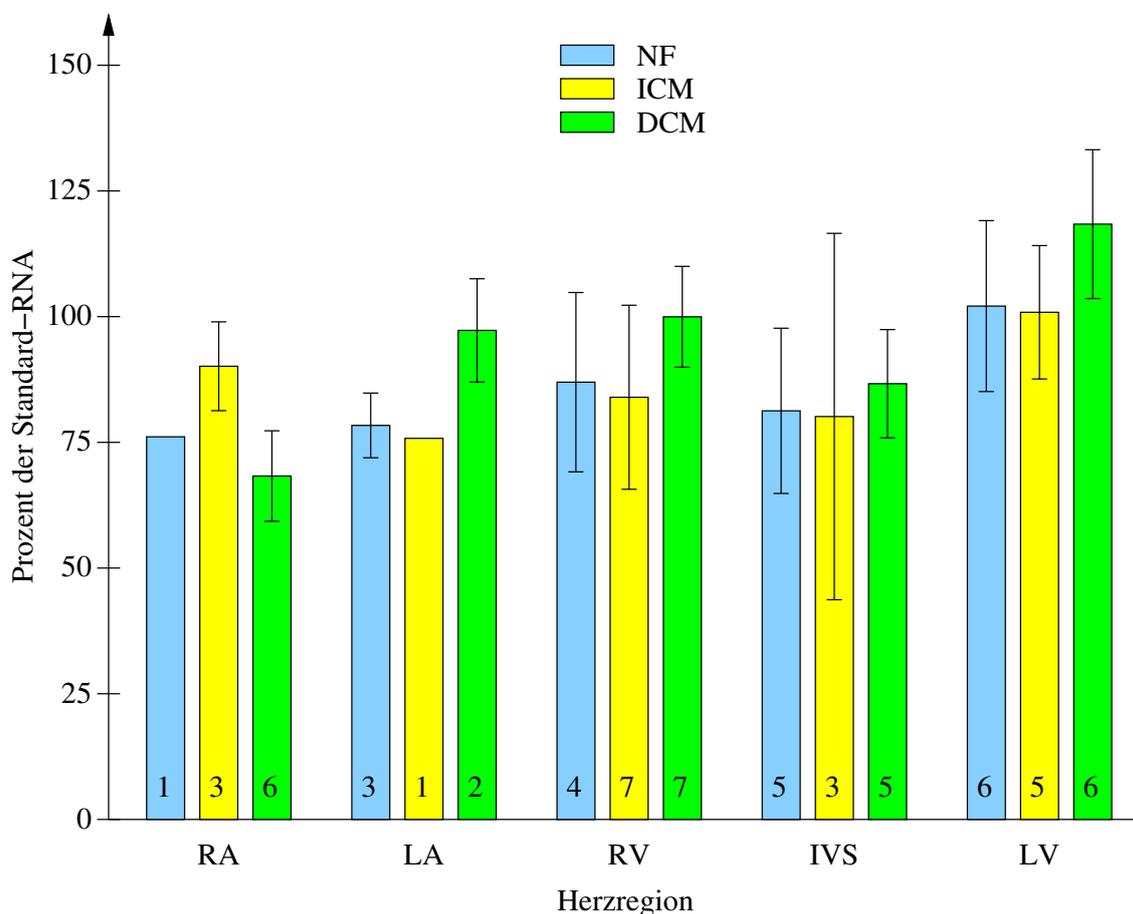


Abbildung 3.13:  $G_{s\alpha}$ -mRNA-Expression in verschiedenen Regionen des menschlichen Myokards (Prozent der Standard-RNA). Die Zahlen in den Säulen stehen für die jeweilige Anzahl der Proben. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert der Messungen sowie der Standardfehler. RA: Rechter Vorhof; LA: Linker Vorhof; RV: Rechter Ventrikel; IVS: Interventrikularseptum; LV: Linker Ventrikel; NF: Gesundes Herzgewebe (Non-Failing); ICM: Ischämische Kardiomyopathie; DCM: Dilatative Kardiomyopathie

### 3.2.4 Regionale Unterschiede der HCN2-Expression im menschlichen Herzen

Da sich in den drei untersuchten Kollektiven keine signifikanten Unterschiede in der HCN2-mRNA-Konzentration fanden, konnten die Gruppen für die Analyse der regionalen Verteilung gepoolt werden. Dies erschien sinnvoll, um die statistische Aussagekraft bei den zum Teil sehr kleinen Fallzahlen zu verbessern. Auf diese Weise ergaben sich Zahlen zwischen  $n = 6$  (LA) und  $n = 18$  (RV).

Diese Analyse zeigte eindeutige regionale Unterschiede in der Expression von HCN2 (Abb. 3.14): Im rechten Vorhof war sie fast dreimal höher als im linken Vorhof und im rechten Ventrikel. In den Ventrikeln konnte ein aufsteigender Gradient vom rechten Ventrikel über das Septum zum linken Ventrikel aufgezeigt werden. Die Werte im linken Ventrikel unterschieden sich nicht signifikant vom linken Vorhof.

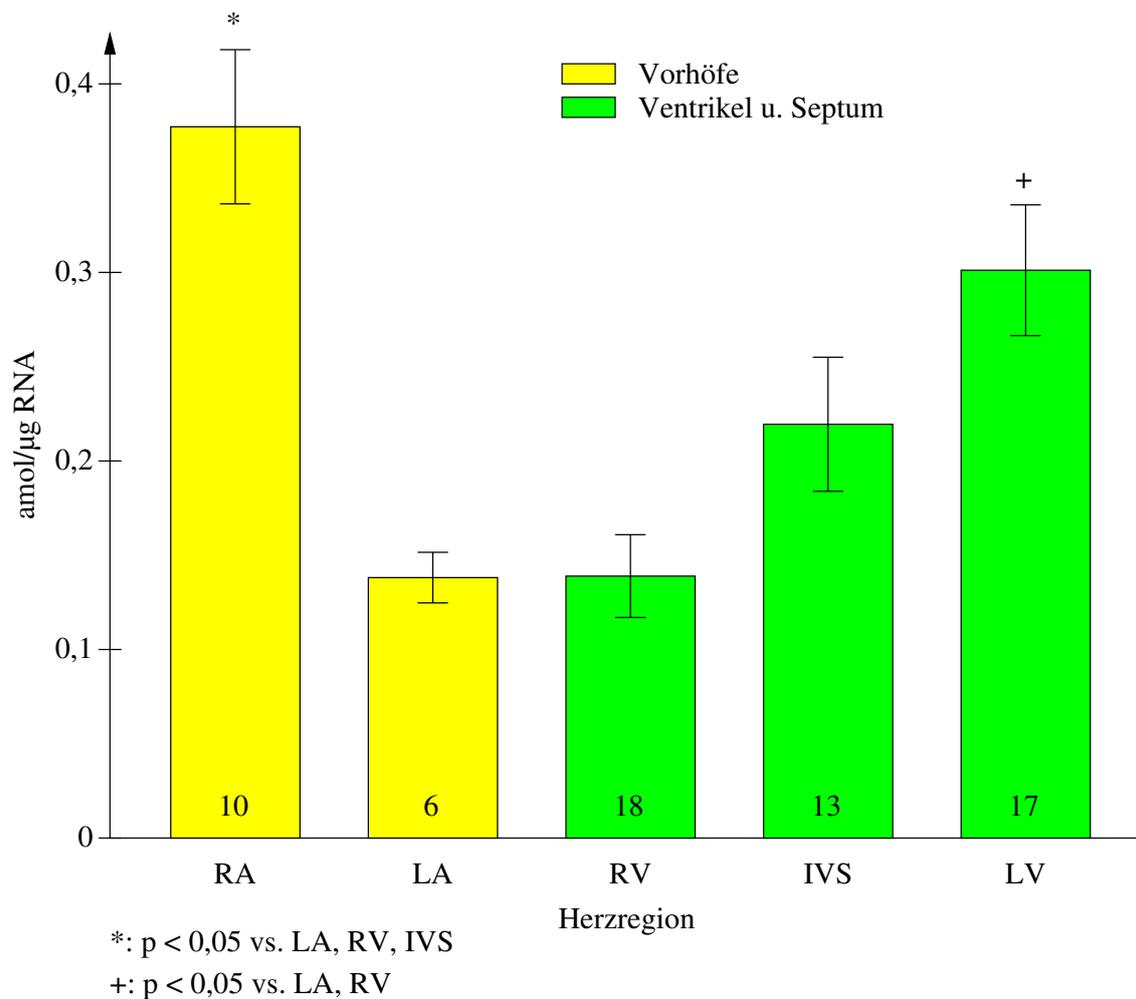


Abbildung 3.14: HCN2-mRNA-Expression in verschiedenen Regionen des menschlichen Myokards (amol/μg Gesamt-RNA). Die Zahlen in den Säulen stehen für die jeweilige Anzahl der Proben. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert der Messungen sowie der Standardfehler.

RA: Rechter Vorhof; LA: Linker Vorhof; RV: Rechter Ventrikel; IVS: Interventrikularseptum; LV: Linker Ventrikel

## 4 Diskussion

Bei Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz stellt der plötzliche Herztod ein klinisch relevantes Risiko dar [Messerli et al. 1984, Kannel et al. 1988, Tomaselli et al. 1994]. Die Mechanismen, die zum plötzlichen Herztod führen, sind äußerst vielschichtig.

Das insuffiziente Herz durchläuft eine komplexe Abfolge von Veränderungen sowohl in den Myozyten als auch in den nichtmyozytären Elementen. Beim Versuch, die abnehmende Pumpfunktion zu kompensieren, werden verschiedene neurohumorale Mechanismen aktiviert, unter anderem das sympathische Nervensystem und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Die Veränderungen im Herzen selbst, aber auch in der Peripherie beeinflussen die Elektrophysiologie des Herzens und prädisponieren herzinsuffiziente Patienten für den plötzlichen Tod durch Arrhythmien. Mit zunehmender Schwere der Herzinsuffizienz nehmen sowohl die Häufigkeit als auch die Komplexität der ventrikulären Ektopie zu [Chakko und Gheorghiu 1985, Kjekshus 1990]. Zur Entwicklung einer wirksamen Therapie – besser noch einer effektiven Prävention – sind weitere Grundlagenerkenntnisse über ektopie Automatismen im erkrankten Myokard notwendig.

Diese abnormen Automatismen im hypertrophierten und insuffizienten Herzen können dadurch begünstigt werden, dass das Aktionspotenzial in der spontanen diastolischen Depolarisation verlängert ist [Tomaselli et al. 1994]. Weiterhin spielt die Verminderung der Stromdichte des repolarisierenden Auswärtsstroms  $I_{to}$  sowie wahrscheinlich auch eine Erhöhung des depolarisierenden Einwärtsstroms  $I_f$  eine wichtige Rolle [Cerbai et al. 1996, Cerbai et al. 2001].

Allerdings wird kontrovers diskutiert, ob  $I_f$  im atrialen und ventrikulären Arbeitsmyokard insuffizienter Herzen tatsächlich zur gesteigerten Arrhythmieneigung beitragen kann. Der Ionenkanal wird durch Hyperpolarisation aktiviert; im Ventrikelmyokard von Hunden beispielsweise bei  $-110$  mV [Yu et al. 1993]. Ein solch negatives Aktivierungspotenzial wird unter physiologischen Bedingungen sicherlich nicht erreicht, weshalb die Autoren vermuteten, dass die Schrittmacherfunktion des Kanals über diesen Mechanismus gleichsam »inaktiviert« wird. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse von Cerbai et al., die im Ventrikelmyokard von Ratten ein Aktivierungspotenzial für  $I_f$  von  $-88$  mV feststellten [Cerbai

et al. 1994b, Cerbai et al. 1996]. Dies liegt deutlich näher am physiologischen diastolischen Depolarisationspotenzial, so dass hier eine Beteiligung von  $I_f$  an ventrikulären Automaten möglich erscheint. Die Hypothese, dass  $I_f$  für die abnorme Erregungsbildung im Arbeitsmyokard eine Bedeutung besitzt, ist also zumindest lückenhaft und bislang nicht vollständig geklärt.

Die Ionenströme, die für die spontane diastolische Depolarisation verschiedener Myokardzellen verantwortlich sind ( $I_f$ ,  $I_{Ca-T}$  und  $I_{K(ACh)}$ ), wurden in den letzten Jahren elektrophysiologisch gut untersucht und charakterisiert [Yu et al. 1993, Cerbai et al. 1997, Carbone und Lux 1984, Hess et al. 1986]. Allerdings sind die Kenntnisse über die molekularen Mechanismen wesentlich unvollständiger als das elektrophysiologische Wissen – nicht zuletzt deshalb, weil die Aufklärung der Gensequenzen von  $I_f$  und vom T-Typ-Kalziumkanal erst 1998 gelang [Ludwig et al. 1998, Cribbs et al. 1998].

Basierend auf diesen Arbeiten war es möglich, den Nachweis zu erbringen, dass die Isoformen HCN2 und HCN4 tatsächlich das molekulare Korrelat zu  $I_f$  sind. Moroni et al. ligierten HCN2-DNA in ein Plasmid und transformierten dieses in HEK293-Zellen, um anschließend die elektrophysiologischen Eigenschaften von  $I_{hHCN2}$  zu untersuchen. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der entstandene Ionenstrom die gleichen Charakteristika aufweist wie  $I_f$  [Moroni et al. 2000]. Weitere Arbeitsgruppen konnten durch die gezielte Mutation der G-Y-G-Sequenz in der Porenregion die Natrium- und Kaliumpassage des Kanals unterbinden; als Folge konnte  $I_f$  nicht mehr detektiert werden [Qu et al. 2001, Xue et al. 2002, Er et al. 2003].

Er et al. erzeugten eine GYG<sub>402–404</sub>AYA-Mutation der Porenregion von HCN2. Der dadurch entstandene Kanal war nicht mehr funktionsfähig; außerdem wurden die Wildtypen HCN2 und HCN4 dominant-negativ unterdrückt. Mittels Überexpression des mutierten Kanals in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte konnte festgestellt werden, dass die Stromdichte des nativen  $I_f$  deutlich reduziert war und die Zellen die Fähigkeit zur spontanen diastolischen Depolarisation verloren hatten [Er et al. 2003]. Die Autoren folgerten daraus, dass HCN2 und HCN4 sich zu heteromeren Komplexen zusammenlagern können und entscheidende Bedeutung für die Erzeugung eines spontanen Aktionspotenzials besitzen.

Während es einige Publikationen über die Verteilung der mRNA einzelner HCN-Isoformen in den Herzen verschiedener Tierspezies gibt [Shi et al. 1999, Moosmang et al. 2001, Moroni et al. 2001], existieren bislang keine Untersuchungen, die sich speziell mit der Expression der HCN-Kanäle im menschlichen Myokard befassen.

Auch im Hinblick auf den möglichen Einfluss einer Herzinsuffizienz auf das mRNA-Expressionsmuster der HCN-Kanäle gibt es bislang keine Untersuchungen an menschlichem Myokard. Es ist nach wie vor lediglich der Vergleich mit Daten möglich, die aus dem Herzgewebe diverser Tierarten erhoben wurden [Hiramatsu et al. 2002, Fernández-Velasco et al. 2003].

Die vorliegende Arbeit liefert daher erstmals Erkenntnisse sowohl über die Verteilung der Isoform HCN2 im Gewebe humaner Herzen als auch über mögliche Veränderungen bei schwerer Herzinsuffizienz auf dem Boden einer dilatativen oder ischämischen Kardiomyopathie.

## 4.1 Einfluss der Herzinsuffizienz

Die Expression der HCN2-mRNA wurde für gesunde Kontrollherzen sowie terminal insuffiziente Herzen mit ischämischer oder dilatativer Kardiomyopathie getrennt betrachtet. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der jeweiligen HCN2-Konzentration in den drei Gruppen festgestellt werden.

Es gibt bislang lediglich zwei Arbeiten an Tiermodellen, in denen die Expression von HCN-Kanälen im Gewebe von gesunden und insuffizienten Herzen direkt miteinander verglichen wird. Hiramatsu et al. stellten fest, dass die Menge der HCN2- und HCN4-mRNA bei druckbelasteten Rattenherzen zunimmt [Hiramatsu et al. 2002], und auch in einer jüngeren Arbeit konnten diese Ergebnisse bestätigt werden [Fernández-Velasco et al. 2003]. Ähnlich wie bei Hiramatsu entstand auch die Herzinsuffizienz in dem von Fernández-Velasco et al. verwendeten Tiermodell durch Druckbelastung des linken Ventrikels, indem ein Clip um die Aorta der Ratten platziert wurde. In jener Untersuchung wurde außerdem erstmals die Änderung der mRNA-Menge von HCN2 und HCN4 sowie die Stromdichte von  $I_f$  in Myozyten derselben Herzen miteinander verglichen. Dabei ergab sich, dass bei druckbelasteten Rattenherzen sowohl die Stromdichte von  $I_f$  als auch die Menge der HCN-mRNA zunimmt [Fernández-Velasco et al. 2003]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte eine parallele Erhöhung der mRNA-Expression in insuffizienten menschlichen Herzen nicht gefunden werden. Eine mögliche Erklärung dieses zum oben genannten Tiermodell unterschiedlichen Ergebnisses könnte sein, dass die verschiedenen Pathomechanismen der Herzinsuffizienz (Druckbelastung, ischämische und dilatative Kardiomyopathie) entsprechend Einfluss auf die mRNA-Expression nehmen.

Capuano et al. stellten fest, dass verschiedene Techniken, eine Herzinsuffizienz bei Ratten zu induzieren, durchaus Einfluss auf die Genexpression nehmen. Die Arbeitsgruppe

behandelte die Tiere der einen Gruppe mit Deoxycorticosteronacetat-Salz (DOCA-Salz), was zu einer Volumenbelastung der Herzen führte. In der anderen Gruppe wurde die Aorta operativ stenosiert und somit die Herzinsuffizienz durch eine Druckbelastung des linken Ventrikels herbeigeführt. Die resultierende Abnahme der Stromdichte von  $I_{to}$  sowie die Verminderung der Expression der für den Kanal kodierenden Kv4.3-mRNA [Dixon et al. 1996] war in beiden Gruppen messbar – allerdings wies die Gruppe mit der Volumenbelastung eine stärker reduzierte Genexpression auf als die Vergleichsgruppe, die durch Druckbelastung herzinsuffizient wurde [Capuano et al. 2002].

Es ist bekannt, dass Kardiomyozyten durch Hypertrophie und Insuffizienz ihre elektrophysiologischen Eigenschaften verändern, zusammengefasst unter dem Begriff des so genannten *elektrophysiologischen Remodelings* [Tomaselli und Marbán 1999].

Eine charakteristische Veränderung in Ventrikelzellen insuffizienter Herzen ist die Verlängerung des Aktionspotenzials, die sich durchgängig und unabhängig vom Mechanismus in verschiedensten Tiermodellen nachweisen lässt [Rossner 1985, Nordin et al. 1989, Cerbai et al. 1994a, Kääh et al. 1996]. Auch Ventrikel menschlicher Herzen zeigen diese Verlängerung des Aktionspotenzials [Beuckelmann et al. 1993]. Die Verlängerung der Repolarisationsphase stellt die wichtigste Veränderung hinsichtlich der Arrhythmogenese bei der Herzinsuffizienz dar [Tomaselli et al. 1994].

Die Verlängerung des Aktionspotenzials ist das Resultat eines veränderten Expressionsmusters depolarisierender und repolarisierender Ionenkanäle. Die Veränderungen auf der Ebene der Ionenkanäle erfolgen nicht gleichförmig. Die elektrophysiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen an verschiedenen Ionenkanälen ergaben sowohl Speziesunterschiede als auch eine Abhängigkeit von der Pathogenese, dem gewählten Tiermodell sowie dem Schweregrad der Herzinsuffizienz [Benitah et al. 1993, Brooksby et al. 1993, Cerbai et al. 1994a]. Während elektrophysiologische Untersuchungen an Rattenherzen einheitlich gezeigt haben, dass die Stromdichte von  $I_f$  im insuffizienten Herzen erhöht ist [Cerbai et al. 1994a, Cerbai et al. 1996, Fernández-Velasco et al. 2003], ist die Datenlage im menschlichen Herzen unklar.

Zwei Arbeitsgruppen führten elektrophysiologische Untersuchungen des Schrittmacherkanals  $I_f$  an ventrikulären Kardiomyozyten von insuffizienten menschlichen Herzen mit ischämischer (ICM) bzw. dilatativer Kardiomyopathie (DCM) durch. Hoppe et al. wiesen qualitativ die Anwesenheit von  $I_f$  in ventrikulären Myozyten nach. Die Stromdichte von  $I_f$  war aber in Myozyten aus terminal insuffizienten Herzen und gesunden Kontrollen gleich. Es fand sich auch kein Unterschied der  $I_f$ -Stromdichte zwischen Myozyten von insuffizienten Herzen mit ICM oder DCM [Hoppe et al. 1998].

Cerbai et al. konnten bei einem vergleichbaren Patientenkollektiv  $I_f$  ebenfalls qualitativ in allen ventrikulären Kardiomyozyten der erkrankten ICM- und DCM-Herzen messen, aber nur in 76 % der Kontrollzellen [Cerbai et al. 2001]. Im Gegensatz zu Hoppe et al. fand diese Arbeitsgruppe in ventrikulären Myozyten von Herzen mit ischämischer Kardiomyopathie eine signifikante Zunahme der Stromdichte von  $I_f$  im Vergleich zu Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie sowie gesunden Kontrollherzen. In den insuffizienten Herzen beider Ätiologien war die Aktivierungskurve von  $I_f$  zu positiveren Werten hin angehoben.

Die elektrophysiologischen Messungen warfen die Frage auf, ob die als erhöht gefundene Stromdichte von  $I_f$  in insuffizienten Herzen [Cerbai et al. 2001, Fernández-Velasco et al. 2003] mit einer ebenfalls erhöhten mRNA-Expression von HCN2 verbunden ist. Die vorliegende Arbeit konnte dies nicht bestätigen. Daher liegt es nahe, andere Mechanismen zu vermuten, die eine erhöhte Stromdichte von  $I_f$  bewirken.

Posttranslationale Veränderungen an den Ionenkanälen sind durch Bestimmungen der mRNA nicht detektierbar, können aber durchaus für qualitative Auswirkungen auf die Funktion der synthetisierten Kanalproteine sorgen [Akar et al. 2005]. Ferner ist vorstellbar, dass der Umsatz der fertigen Proteine in den Myozyten sehr langsam ist, so dass trotz hoher Proteinspiegel eine niedrige mRNA-Menge gemessen wird.

Weiterhin kann es sein, dass die Isoform HCN4 – analog zum Kaninchenherz [Shi et al. 1999] – im menschlichen Herzen entgegen früherer Untersuchungen [Ludwig et al. 1999] doch den Hauptanteil der Ionenkanäle für  $I_f$  stellt, statt in etwa gleicher Menge wie HCN2 vorzukommen. Eine mögliche Konsequenz wäre dann, dass bei der Herzinsuffizienz lediglich die Expression von HCN4 hochreguliert wird, nicht aber die von HCN2.

Die elektrophysiologisch gemessene Zunahme von  $I_f$  im insuffizienten menschlichen Herzen ohne parallele Erhöhung der HCN2-mRNA-Expression könnte auch in der Bildung von heteromultimeren Komplexen der HCN-Kanäle begründet sein. Bereits sehr früh nach der Erstbeschreibung der HCN-Gensequenz wurde die Existenz von heteromultimeren Zusammenlagerungen verschiedener HCN-Subtypen zu einer funktionellen Einheit postuliert [Biel et al. 1999]. Erste Hinweise auf die Existenz solcher Komplexe wurden dann vor wenigen Jahren veröffentlicht [Moroni et al. 2000]. In der Zwischenzeit konnte für HCN1 und HCN2 in Hirnzellen genau diese Art der heteromultimeren Kanalbildung gezeigt werden [Chen et al. 2001, Ulens und Tytgat 2001]. Auch für HCN2 und HCN4 gibt es Befunde, die darauf hindeuten, dass diese beiden Isoformen sich im Rattenmyokard zu einem größeren Verbund zusammenlagern [Er et al. 2003]. Für den Sinusknoten im Kaninchenherz wurde nachgewiesen, dass HCN4 und HCN1 ein Multi-

mer bilden [Altomare et al. 2003]. Interessanterweise entscheidet dabei die Zusammensetzung des Heteromultimers über die funktionellen Eigenschaften des entstandenen Ionenkanals [Ulens und Tytgat 2001, Altomare et al. 2003]. So stellten Altomare et al. fest, dass die cAMP-Sensitivität eines HCN4-HCN1-Tandemkanals geringer ist als die eines HCN1-HCN4-Tandemkanals [Altomare et al. 2003]. Diese Tandemkanäle wurden hergestellt, indem einerseits der Carboxyterminus von HCN4 mit dem Aminoterminus von HCN1 (HCN4-HCN1-Tandem) bzw. der Carboxyterminus von HCN1 mit dem Aminoterminus von HCN4 ligiert wurde (HCN1-HCN4-Tandem). Weiterhin beeinflusst die Stöchiometrie des Heteromultimers die Aktivierungsgeschwindigkeit des entstandenen Kanals [Ulens und Tytgat 2001, Altomare et al. 2003]. Im menschlichen Herzgewebe wurde eine Homo- bzw. Heteromultimerisation von HCN2 und HCN4 unlängst experimentell bestätigt [Michels et al. 2005]. Die erhöhte Stromdichte von  $I_f$  in insuffizienten Herzen ist dann zum Beispiel durch eine veränderte Zusammensetzung des multimeren Kanals erklärbar. Der funktionelle Unterschied der Kanäle kann dann größer sein, ohne sich jedoch in der RNA-Bestimmung abzubilden.

Eine andere Arbeitsgruppe stellte fest, dass sich nicht nur die einzelnen HCN-Isoformen zu einem größeren Verbund zusammenlagern können, sondern auch andere Proteine beteiligt sein können. Das »MinK-Related Peptide 1« (MiRP1) kann als  $\beta$ -Untereinheit sowohl für HCN1 als auch HCN2 fungieren und ändert zum einen die Stromdichte, zum anderen die Aktivierungsgeschwindigkeit des Kanals [Yu et al. 2001]. Die im genannten Artikel erhobenen Daten beziehen sich auf das Kaninchenherz, dennoch ist eine ähnliche Konstellation für das menschliche Herz denkbar.

Analog zu den hier vorgestellten Befunden an HCN-Kanälen gibt es auch bei spannungsabhängigen Kaliumkanälen im Myokard die Konstellation, dass die Stromdichte des Kaliumkanals nicht mit der zugehörigen Menge der für den Kanal kodierenden mRNA korreliert. Im Rattenmyokard beispielsweise bleibt die Stromdichte von  $I_K$  innerhalb der ersten Wochen nach der Geburt nahezu unverändert; die Menge der kodierenden mRNA Kv2.1 nimmt jedoch ab [Xu et al. 1996]. In einer weiteren Arbeit konnte trotz eines messbaren  $I_K$  in allen untersuchten Myozyten nicht in jeder Zelle die mRNA von Kv2.1 nachgewiesen werden [Schultz et al. 2001].

Beim Menschen fanden zwei Arbeitsgruppen trotz einer Abnahme der Stromdichte von  $I_{K1}$  in insuffizientem Herzgewebe [Beuckelmann et al. 1993] unveränderte mRNA-Mengen des Kanals Kir2.1 in den untersuchten Kardiomyozyten [Käab et al. 1998, Wang et al. 1998].

Schließlich kann auch ein Einfluss der Dauermedikation der herzinsuffizienten Patienten nicht ausgeschlossen werden (siehe Tabelle 2.1 auf Seite 21). Einen ersten Hinweis da-

rauf gibt eine Untersuchung am Modell des druckbelasteten Rattenherzens. Dabei wurde festgestellt, dass durch die Gabe eines Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten (Candesartan) bzw.  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalinhibitors (Amlodipin) die zunächst erhöhte Expression der HCN-Kanäle im linken Ventrikel wieder auf ein Niveau sank, das mit dem der normotensiven Ratten nahezu identisch war [Hiramatsu et al. 2002].

## 4.2 Regionale Verteilung

Die Expression der HCN2-mRNA wurde qualitativ in allen Regionen des menschlichen Herzens nachgewiesen, auch in ventrikulärem Gewebe.

Die Quantifizierung der mRNA-Mengen in den unterschiedlichen Bereichen des menschlichen Herzens ergab, dass der Gehalt von HCN2 im rechten Vorhof und linken Ventrikel signifikant höher ist als im linken Vorhof und rechten Ventrikel ( $p < 0,05$ ). Das Interventrikularseptum nimmt eine Mittelstellung ein, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Diese Ergebnisse könnten damit erklärt werden, dass im rechten Vorhof der Sinusknoten als wichtiger Schrittmacher lokalisiert ist. Dabei ist aber einschränkend zu sagen, dass die Vorhofpräparate, die im Rahmen von Herztransplantationen gewonnen wurden, in der Regel kein Sinusknotengewebe enthalten sollten.

Es gibt bislang keine Untersuchungen, die die regionale Verteilung der HCN-Kanäle im menschlichen Herzen zum Gegenstand hatten. Die hier vorliegende Dissertation beschreibt erstmals die Menge der HCN2-mRNA in verschiedenen Regionen des menschlichen Herzens. Dagegen existieren einige Arbeiten, in denen die Menge der HCN-mRNA in unterschiedlichen Tierspezies bestimmt wurde. So stellt im Sinusknoten des Kaninchenherzens die Isoform HCN4 den größten Anteil der mRNA, gefolgt von HCN1 [Shi et al. 1999, Moroni et al. 2001]. In den Purkinjefasern stellte die Arbeitsgruppe eine etwa gleich große Menge von HCN4 und HCN1 fest (49 % bzw. 40 % der Gesamt-RNA); im Ventrikelmyokard war dann die Isoform HCN2 vorherrschend [Shi et al. 1999]. Bei der Maus ist im Sinusknoten ebenfalls HCN4-mRNA enthalten, die zweitgrößte Fraktion in diesem Gewebe ist HCN2 [Moosmang et al. 2001, Stieber et al. 2003]. Im Ventrikelmyokard der Ratte wurde HCN2 als weit überwiegende Isoform ermittelt. Anschließend folgt HCN4, wobei das Verhältnis von HCN2 zu HCN4 bei adulten Ratten im Vergleich zu neonatalen Tieren noch zunimmt [Shi et al. 1999].

Eine Untersuchung der verschiedenen Regionen von insuffizienten Rattenherzen kommt zu dem Ergebnis, dass deutlich mehr HCN2-mRNA im linken Ventrikel und Interventrikularseptum vorhanden ist als im rechten Ventrikel [Fernández-Velasco et al. 2003]. Dies

deckt sich mit den hier gemessenen Werten. Weiterhin fand die Arbeitsgruppe eine zwei- bis dreifach höhere mRNA-Expression von HCN2 im linken gegenüber dem rechten Ventrikel; die hier vorgestellten Ergebnisse weisen deckungsgleich sowohl bei insuffizienten als auch bei gesunden Herzen für dieses Verhältnis etwa den Faktor 2 auf. Die Menge der HCN-mRNA in den Vorhöfen wurde in jener Arbeit nicht bestimmt.

Unter physiologischen Bedingungen ist der Sinusknoten im rechten Vorhof der primäre Schrittmacher der spontanen diastolischen Depolarisation. Die Erregung breitet sich über das atriale Leitungssystem weiter bis zum AV-Knoten aus, um von dort über das His-Bündel und die Purkinje-Fasern schließlich im Ventrikelmyokard zu enden [Klinge 1997].

Der Kationenstrom  $I_f$  ist in allen genannten Geweben nachweisbar, allerdings gibt es nicht für jeden Abschnitt Daten aus dem humanen Myokard. Im Sinusknoten des Menschen konnte  $I_f$  gefunden werden [DiFrancesco 1993, Irisawa et al. 1993], genauso wie im Vorhof [Porciatti et al. 1997]. Für den AV-Knoten sind bislang keine Daten für menschliches Myokard verfügbar, allerdings wurde der Kanal beim Kaninchen in den Myozyten des AV-Knotens beschrieben [Munk et al. 1996]. In humanen Purkinje-Fasern konnten Han et al. zwar einen Strom nachweisen, dessen Eigenschaften vollständig denen von  $I_f$  entsprechen, allerdings bezeichnete die Arbeitsgruppe den Strom als  $I_H$ , weil sie auf Grund der geringen Anzahl untersuchter Zellen die Merkmale des Stroms nicht bis ins Detail biophysikalisch charakterisieren konnten [Han et al. 2002]. Im Ventrikelmyokard schließlich beschreiben Cerbai et al. den Strom in Myozyten von insuffizienten humanen Herzen [Cerbai et al. 1997].

Die Verteilung der Stromdichte von  $I_f$  in den verschiedenen Herzregionen ist bislang nur wenig untersucht. Fernández-Velasco et al. stellten fest, dass  $I_f$  in gesunden Rattenherzen etwa gleich große Stromdichten im linken und rechten Ventrikel aufweist; auch die Stromdichte im Interventrikularseptum zeigt lediglich eine nicht signifikante leichte Erhöhung gegenüber den Ventrikeln [Fernández-Velasco et al. 2003]. Anders ist die Situation im insuffizienten Herzgewebe: Dort fand die Arbeitsgruppe eine mehr als dreifache Erhöhung von  $I_f$  im Septum, bezogen auf den rechten Ventrikel. Im linken Ventrikel betrug die Stromdichte etwa das Doppelte des Wertes aus dem rechten Ventrikel. Während sich diese Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen von  $I_f$  in Rattenherzen recht gut mit den Daten der Arbeitsgruppe zur mRNA-Expression von HCN2 und HCN4 decken, bestehen doch deutliche Unterschiede zu den hier erhobenen Werten für die HCN2-mRNA-Expression in menschlichen Herzen. Dies unterstützt die oben diskutierte Auffassung, dass im humanen Herzgewebe die Stromdichte von  $I_f$  noch von anderen Faktoren als nur der HCN2-Expression beeinflusst wird.

### 4.3 Auswahl der Methode

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass mit der Herzinsuffizienz sowohl quantitative als auch qualitative Veränderungen in der Expression verschiedener Gene einhergehen. Als Erklärung dient die Aktivierung diverser neurohumoraler Systeme [Hasenfuss und Just 1994]. Welche pathophysiologische Rolle die Änderung der Genexpression spielt, ist bislang allerdings noch nicht vollständig verstanden; nicht zuletzt, weil gesundes humanes Myokard verständlicherweise kaum für experimentelle Zwecke zur Verfügung steht.

Aus der modifizierten Genexpression resultiert ein veränderter mRNA-Gehalt in der Zelle, der oftmals eine Änderung der Proteinmenge und -funktion mit sich bringt. Allerdings erfasst die Bestimmung der mRNA-Menge natürlich keine quantitativen Veränderungen, die nach der Translation auf Proteinebene noch stattfinden können.

Zur qualitativen und quantitativen Messung von mRNA in Geweben stehen grundsätzlich drei verschiedene Verfahren zur Verfügung; der RNase Protection Assay, der Northern Blot sowie die Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR).

Als die Experimente der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, war es schwierig, mit der letztgenannten Methode eine absolute Quantifizierung der mRNA-Menge vorzunehmen. Es gibt Untersuchungen, in denen sich die gemessene mRNA-Konzentration desselben Gens um den Faktor 180 unterscheidet [Bristow et al. 1993, Ihl-Vahl et al. 1996]. Dadurch war die Identifikation von geringen Unterschieden zwischen zwei Kollektiven problematisch. In den letzten Jahren hat sich die Situation jedoch geändert. Durch so genannte Real-time-Verfahren der RT-PCR kann die Quantifizierung von mRNA mittlerweile verlässlich und reproduzierbar durchgeführt werden [Bustin 2000].

Der Northern Blot ist ein hochspezifisches Verfahren zur mRNA-Bestimmung, jedoch ist die erreichte Sensitivität geringer als die der RT-PCR und des RNase Protection Assays. Beim RPA ist die Nachweisgrenze für RNA gegenüber dem Northern Blot ca. um den Faktor 10 geringer, wodurch bereits RNA-Mengen im Bereich von 0,1 – 0,2 pg detektiert und quantifiziert werden können [Mittmann et al. 1998]. Ferner ist das Signal der zu bestimmenden RNA-Menge über eine große Breite linear, was auch in dieser Dissertation validiert werden konnte.

Aus den genannten Gründen wurde für diese Arbeit der RNase Protection Assay ausgewählt. Untersucht wurde myokardiales Gewebe von Patienten mit ischämischer oder idiopathisch dilatativer Kardiomyopathie sowie von gesunden Spenderherzen, die nicht für eine Transplantation geeignet waren.

## 4.4 Ausblick

Auf Grund der Tatsache, dass Veränderungen auf RNA-Ebene nicht immer mit einer gleichsinnigen Änderung auf Proteinebene verbunden sind, wäre eine Bestimmung der HCN-Kanalproteine, z. B. mittels Immunoblot, eine sinnvolle und wünschenswerte Ergänzung zu dieser Arbeit. Leider existierte weder zum Zeitpunkt der Experimente noch aktuell ein entsprechender Antikörper für HCN2 bzw. für die anderen drei Isoformen. Die Verteilung der Ionenkanäle auf Proteinebene kann nach wie vor nicht bestimmt werden.

Die Relevanz des Ionenstroms  $I_f$  für die diastolische Depolarisation und damit die Steuerung der Herzfrequenz machen den Kanal zu einem sinnvollen Ziel für die Entwicklung neuer pharmakologischer Substanzen. Seit einigen Jahren gibt es Wirkstoffe (Zatebradin, Cilobradin, Ivabradin), die spezifisch  $I_f$  im menschlichen Myokard inhibieren und dadurch eine Reduktion der Herzfrequenz erreichen, ohne Einfluss auf die Inotropie des Herzens zu nehmen [Simon et al. 1995]. Eines der jüngeren Medikamente, Ivabradin, zeichnet sich durch eine hohe Affinität zu  $I_f$  sowie verstärkte Wirksamkeit bei höheren Frequenzen aus [Bucchi et al. 2002]. Die klinischen Tests der Substanz beschränken sich zurzeit auf das Krankheitsbild der stabilen Angina pectoris [Borer et al. 2003], allerdings gibt es erste Ergebnisse im Tiermodell, die den Einsatz von Ivabradin bei Patienten mit Herzinsuffizienz sinnvoll erscheinen lassen [Mulder et al. 2004].

## 5 Zusammenfassung

Der plötzliche Herztod ist bei Patienten mit Herzinsuffizienz eine häufige Todesursache. Auslöser sind oftmals ventrikuläre Arrhythmien. Der Hyperpolarisations-aktivierte Einwärtsstrom  $I_f$  ist ein wesentlicher Schrittmacher der spontanen diastolischen Depolarisation im Sinusknoten. Seine Rolle im ventrikulären und atrialen Arbeitsmyokard ist zurzeit unklar. Die Dichte von  $I_f$  ist in verschiedenen Tiermodellen der Herzinsuffizienz und möglicherweise auch beim Menschen erhöht, was zu der Hypothese geführt hat, dass ein erhöhter  $I_f$ -Strom zu der erhöhten Automatiebereitschaft des insuffizienten Herzens beiträgt. Das molekulare Äquivalent des  $I_f$ -Stroms stellen die Hyperpolarisations-aktivierten Kationenkanäle (HCN) dar.

Ziele dieser Arbeit waren einerseits die regionale Verteilung der HCN2-mRNA im menschlichen Herzen zu untersuchen, andererseits gesundes mit insuffizientem Myokard im Hinblick auf die mRNA-Konzentration zu vergleichen.

Die Resultate wurden mittels RNase Protection Assays gewonnen, mit denen RNA hochspezifisch und -sensitiv quantifiziert werden kann. Das Expressionsniveau der HCN2-mRNA war im rechten Vorhof und linken Ventrikel signifikant höher als im linken Vorhof und dem rechten Ventrikel. Das Interventrikularseptum lag bei der RNA-Konzentration zwischen diesen Werten. Beim Vergleich von gesundem Herzgewebe mit ischämisch oder dilatativ geschädigtem Myokard stellte sich heraus, dass sich die Expression von HCN2 nicht veränderte.

Die Arbeit liefert einerseits erstmals Daten über die HCN2-mRNA-Expression bei Herzinsuffizienz und andererseits über die regionale Verteilung im menschlichen Herzen. Sie trägt somit zu den grundlegenden Kenntnissen über den Schrittmacherkanal  $I_f$  im humanen Myokard bei.

## 6 Literaturverzeichnis

- Akar FG, Wu RC, Juang GJ, Tian Y, Burysek M, DiSilvestre D, Xiong W, Armoundas AA, Tomaselli GF (2005) Molecular mechanisms underlying  $K^+$  current downregulation in canine tachycardia-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288(6)**: H2887–2896. DOI: 10.1152/ajpheart.00320.2004
- Altomare C, Terragni B, Brioschi C, Milanesi R, Pagliuca C, Viscomi C, Moroni A, Baruscotti M, DiFrancesco D (2003) Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J Physiol* **549(2)**: 347–359. DOI: 10.1113/jphysiol.2002.027698
- Beck-Bornholdt HP, Dubben HH (2001) Der Schein der Weisen. Hoffmann und Campe Verlag, Hamburg
- Benitah J, Gomez A, Bailly P, Da Ponte J, Berson G, Delgado C, Lorente P (1993) Heterogeneity of the early outward current in ventricular cells isolated from normal and hypertrophied rat hearts. *J Physiol* **469**: 111–138
- Beuckelmann D, Näbauer M, Erdmann E (1993) Alterations of  $K^+$  currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* **73(2)**: 379–385
- Biel M, Ludwig A, Zong X, Hofmann F (1999) Hyperpolarization-Activated Cation Channels: A Multi-Gene Family. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **136**: 165–181
- Bing OHL, Brooks WW, Robinson KG, Slawsky MT, Hayes JA, Litwin SE, Sen S, Conrad CH (1995) The Spontaneously Hypertensive Rat as a Model of the Transition from Compensated Left Ventricular Hypertrophy to Failure. *J Mol Cell Cardiol* **27**: 383–396
- Borer JS, Fox K, Jaillon P, Lerebours G, the Ivabradine Investigators Group (2003) Antianginal and Antiischemic Effects of Ivabradine, an  $I_f$  Inhibitor, in Stable Angina: A Randomized, Double-Blind, Multicentered, Placebo-Controlled Trial. *Circulation* **107(6)**: 817–823. DOI: 10.1161/01.CIR.0000048143.25023.87

- Bortz J, Lienert GA (1998) Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung. Springer-Verlag, Heidelberg
- Bristow MR, Minobe WA, Reynolds MV, Port JD, Rasmussen R, Ray PE, Feldman AM (1993) Reduced  $\beta_1$ -receptor messenger RNA abundance in the failing human heart. *J Clin Invest* **92**: 2737–2745
- Brooksby P, Levi A, Jones J (1993) Investigation of the mechanisms underlying the increased contraction of hypertrophied ventricular myocytes isolated from the spontaneously hypertensive rat. *Cardiovasc Res* **27(7)**: 1268–1277
- Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ (1979) How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* **280**: 235–236
- Bucchi A, Baruscotti M, DiFrancesco D (2002) Current-dependent Block of Rabbit Sino-Atrial Node  $I_f$  Channels by Ivabradine. *J Gen Physiol* **120(1)**: 1–13. DOI: 10.1085/jgp.20028593
- Bustin S (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25(2)**: 169–193
- Capuano V, Ruchon Y, Antoine S, Sant MC, Renaud JF (2002) Ventricular hypertrophy induced by mineralocorticoid treatment or aortic stenosis differentially regulates the expression of cardiac  $K^+$  channels in the rat. *Mol Cell Biochem* **237**: 1–10. DOI: 10.1023/A:1016518920693
- Carbone E, Lux H (1984) A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* **310(5977)**: 501–502. DOI: 10.1038/310501a0
- Cerbai E, Barbieri M, Li Q, Mugelli A (1994a) Ionic basis of action potential prolongation of hypertrophied cardiac myocytes isolated from hypertensive rats of different ages. *Cardiovasc Res* **28(8)**: 1180–1187
- Cerbai E, Barbieri M, Mugelli A (1994b) Characterization of the hyperpolarization-activated current,  $I_f$ , in ventricular myocytes isolated from hypertensive rats. *J Physiol* **481**: 585–591
- Cerbai E, Barbieri M, Mugelli A (1996) Occurrence and Properties of the Hyperpolarization-Activated Current  $I_f$  in Ventricular Myocytes From Normotensive and Hypertensive Rats During Aging. *Circulation* **94**: 1674–1681

- Cerbai E, Pino R, Porciatti F, Sani G, Toscano M, Maccherini M, Giunti G, Mugelli A (1997) Characterization of the Hyperpolarization-Activated Current,  $I_f$ , in Ventricular Myocytes From Human Failing Heart. *Circulation* **95**(3): 568–571
- Cerbai E, Sartiani L, DePaoli P, Pino R, Maccherini M, Bizzarri F, DiCiolla F, Davoli G, Sani G, Mugelli A (2001) The properties of the pacemaker current  $I_f$  in human ventricular myocytes are modulated by cardiac disease. *J Mol Cell Cardiol* **33**(3): 441–448. DOI: 10.1006/jmcc.2000.1316
- Chakko C, Gheorghide M (1985) Ventricular arrhythmias in severe heart failure: incidence, significance, and effectiveness of antiarrhythmic therapy. *Am Heart J* **109**(3 Pt 1): 497–504
- Chen S, Wang J, Siegelbaum SA (2001) Properties of Hyperpolarization-Activated Pacemaker Current Defined by Coassembly of HCN1 and HCN2 Subunits and Basal Modulation by Cyclic Nucleotide. *J Gen Physiol* **117**: 491–503
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem* **162**: 156–159
- Clapham DE (1998) Not So Funny Anymore: Pacing Channels Are Cloned. *Neuron* **21**: 5–7
- Cribbs LL, Lee JH, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Perez-Reyes E (1998) Cloning and Characterization of  $\alpha 1H$  From Human Heart, a Member of the T-Type  $Ca^{2+}$  Channel Gene Family. *Circ Res* **83**(1): 103–109
- DiFrancesco D (1981) A new interpretation of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J Physiol* **314**: 359–376
- DiFrancesco D (1982) Block and activation of the pacemaker  $I_f$  channel in calf Purkinje fibres: effects of potassium, caesium and rubidium. *J Physiol* **329**: 485–507
- DiFrancesco D (1993) Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol* **55**: 455–472
- DiFrancesco D (1995) The pacemaker current ( $I_f$ ) plays an important role in regulating SA node pacemaker activity. *Cardiovasc Res* **30**: 307–308
- DiFrancesco D, Tortora P (1991) Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* **351**: 145–147. DOI: 10.1038/351145a0

- Dixon JE, Shi W, Wang HS, McDonald C, Yu H, Wymore RS, Cohen IS, McKinnon D (1996) Role of the Kv4.3 K<sup>+</sup> Channel in Ventricular Muscle: A Molecular Correlate for the Transient Outward Current. *Circ Res* **79(4)**: 659–668
- Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K<sup>+</sup> Conduction and Selectivity. *Science* **280(5360)**: 69–77
- Er F, Larbig R, Ludwig A, Biel M, Hofmann F, Beuckelmann DJ, Hoppe UC (2003) Dominant-Negative Suppression of HCN Channels Markedly Reduces the Native Pacemaker Current  $I_f$  and Undermines Spontaneous Beating of Neonatal Cardiomyocytes. *Circulation* **107(3)**: 485–489. DOI: 10.1161/01.CIR.0000045672.32920.CB
- Escande D, Coraboeuf E, Planche C, Lacour GF (1986) Effects of potassium conductance inhibitors on spontaneous diastolic depolarization and abnormal automaticity in human atrial fibers. *Basic Res Cardiol* **81**: 244–257
- Eschenhagen T, Mende U, Nose M, Schmitz W, Scholz H, Haverich A, Hirt S, Döring V, Kalmár P, Höppner W, Seitz HJ (1992) Increased messenger mRNA level of the inhibitory G-Protein  $\alpha$ -subunit  $G_{i\alpha-2}$  in human end-stage heart failure. *Circ Res* **70**: 688–696
- Fernández-Velasco M, Goren N, Benito G, Blanco-Rivero J, Boscá L, Delgado C (2003) Regional distribution of hyperpolarization-activated current ( $I_f$ ) and hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel mRNA expression in ventricular cells from control and hypertrophied rat hearts. *J Physiol* **553(2)**: 395–405. DOI: 10.1113/jphysiol.2003.041954
- Han W, Zhang L, Schram G, Nattel S (2002) Properties of potassium currents in Purkinje cells of failing human hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283(6)**: H2495–H2503. DOI: 10.1152/ajpheart.00389.2002
- Hasenfuss G, Just H (1994) Myocardial phenotype changes in heart failure: cellular and subcellular adaptations and their functional significance. *Br Heart J* **72(suppl)**: S10–S17
- Hess P, Lansman J, Nilius B, Tsien R (1986) Calcium channel types in cardiac myocytes: modulation by dihydropyridines and beta-adrenergic stimulation. *J Cardiovasc Pharmacol* **8(Suppl 9)**: S11–S21

- Hiramatsu M, Furukawa T, Sawanobori T, Hiraoka M (2002) Ion Channel Remodeling in Cardiac Hypertrophy is Prevented by Blood Pressure Reduction without Affecting Heart Weight Increase in Rats with Abdominal Aortic Banding. *J Cardiovasc Pharmacol* **39(6)**: 866–874
- Ho W, Brown H, Noble D (1994) High selectivity of the  $I_f$  channel to  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  in rabbit isolated sinoatrial node cells. *Pflugers Arch* **426(1–2)**: 68–74
- Holmes DS, Quigley M (1981) A Rapid Boiling Method for the Preparation of Bacterial Plasmids. *Anal Biochem* **114**: 193–197
- Hoppe UC, Beuckelmann DJ (1998) Characterization of the hyperpolarization-activated inward current in isolated human atrial myocytes. *Cardiovasc Res* **38**: 788–801
- Hoppe UC, Jansen E, Südkamp M, Beuckelmann DJ (1998) Hyperpolarization-Activated Inward Current in Ventricular Myocytes From Normal and Failing Human Hearts. *Circulation* **97**: 55–65
- Ihl-Vahl R, Eschenhagen T, Kübler W, Marquetant R, Nose M, Schmitz W, Scholz H, Strasser RH (1996) Differential regulation of mRNA specific for  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptors in human failing hearts. Evaluation of the absolute cardiac mRNA levels by two independent methods. *J Mol Cell Cardiol* **28**: 1–10
- Irisawa H, Brown H, Giles W (1993) Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. *Physiol Rev* **73(1)**: 197–227
- Kääb S, Dixon J, Duc J, Ashen D, Näbauer M, Beuckelmann DJ, Steinbeck G, McKinnon D, Tomaselli GF (1998) Molecular Basis of Transient Outward Potassium Current Downregulation in Human Heart Failure: A Decrease in Kv4.3 mRNA Correlates With a Reduction in Current Density. *Circulation* **98(14)**: 1383–1393
- Kääb S, Nuss HB, Chiamvimonvat N, O'Rourke B, Pak PH, Kass DA, Marbán E, Tomaselli GF (1996) Ionic Mechanism of Action Potential Prolongation in Ventricular Myocytes From Dogs With Pacing-Induced Heart Failure. *Circ Res* **78(2)**: 262–273
- Kannel WB, Plehn JF, Cupples LA (1988) Cardiac failure and sudden death in the Framingham Study. *Am Heart J* **115(4)**: 869–875
- Kjekshus J (1990) Arrhythmias and mortality in congestive heart failure. *Am J Cardiol* **65(19)**: 42I–48I
- Klinge R (1997) Das Elektrokardiogramm. Leitfaden für Ausbildung und Anwendung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

- Kozasa T, Itoh H, Tsukamoto T, Kaziro Y (1988) Isolation and characterization of the human  $G_{s\alpha}$  gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **85(7)**: 2081–2085
- Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M (1998) A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* **393(6685)**: 587–591. DOI: 10.1038/31255
- Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M (1999) Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J* **18(9)**: 2323–2329. DOI: 10.1093/emboj/18.9.2323
- McLenachan JM, Henderson E, Morris KI, Dargie HJ (1987) Ventricular arrhythmias in patients with hypertensive left ventricular hypertrophy. *NEJM* **317(13)**: 787–792
- Messerli F, Ventura H, Elizardi D, Dunn F, Frohlich E (1984) Hypertension and Sudden Death. Increased Ventricular Ectopic Activity in Left Ventricular Hypertrophy. *Am J Med* **77(1)**: 18–22
- Michels G, Er F, Khan I, Südkamp M, Herzig S, Hoppe UC (2005) Single-Channel Properties Support a Potential Contribution of Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels and  $I_f$  to Cardiac Arrhythmias. *Circulation* **111(4)**: 399–404. DOI: 10.1161/01.CIR.0000153799.65783.3A
- Mittmann C, Münstermann U, Weil J, Böhm M, Herzig S, Nienaber C, Eschenhagen T (1998) Analysis of gene expression patterns in small amounts of human ventricular myocardium by a multiplex RNase protection assay. *J Mol Med* **76**: 133–140
- Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (2001) Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem* **268**: 1646–1652
- Moroni A, Barbuti A, Altomare C, Viscomi C, Morgan J, Baruscotti M, DiFrancesco D (2000) Kinetic and ionic properties of the human HCN2 pacemaker channel. *Pflugers Arch* **439**: 618–626. DOI: 10.1007/s004249900225
- Moroni A, Gorza L, Beltrame M, Gravante B, Vaccari T, Bianchi ME, Altomare C, Longhi R, Heurteaux C, Vitadello M, Malgaroli A, DiFrancesco D (2001) Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Channel 1 Is a Molecular Determinant of the Cardiac Pacemaker Current  $I_f$ . *J Biol Chem* **276(31)**: 29233–29241. DOI: 10.1074/jbc.M100830200

- Mulder P, Barbier S, Chagraoui A, Richard V, Henry JP, Lallemand F, Renet S, Lerebours G, Mahlberg-Gaudin F, Thuillez C (2004) Long-Term Heart Rate Reduction Induced by the Selective  $I_f$  Current Inhibitor Ivabradine Improves Left Ventricular Function and Intrinsic Myocardial Structure in Congestive Heart Failure. *Circulation* **109(13)**: 1674–1679. DOI: 10.1161/01.CIR.0000118464.48959.1C
- Munk A, Adjemian R, Zhao J, Ogbaghebriel A, Shrier A (1996) Electrophysiological properties of morphologically distinct cells isolated from the rabbit atrioventricular node. *J Physiol* **493(Pt 3)**: 801–818
- Noma A, Irisawa H (1976) A time- and voltage-dependent potassium current in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflugers Arch* **366(2–3)**: 251–258
- Nordin C, Siri F, Aronson R (1989) Electrophysiologic characteristics of single myocytes isolated from hypertrophied guinea-pig hearts. *J Mol Cell Cardiol* **21(7)**: 729–739
- Porciatti F, Pelzmann B, Cerbai E, Schaffer P, Pino R, Bernhart E, Koidl B, Mugelli A (1997) The pacemaker current  $I_f$  in single human atrial myocytes and the effect of  $\beta$ -adrenoceptor and  $A_1$ -adenosine receptor stimulation. *Br J Pharmacol* **122**: 963–969
- Pye MP, Cobbe SM (1992) Mechanisms of ventricular arrhythmias in cardiac failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res* **26**: 740–750
- Qu J, Barbuti A, Protas L, Santoro B, Cohen IS, Robinson RB (2001) HCN2 Overexpression in Newborn and Adult Ventricular Myocytes: Distinct Effects on Gating and Excitability. *Circ Res* **89(1)**: e8–e14. DOI: 10.1161/hh1301.094395
- Robinson RB, Siegelbaum SA (2003) Hyperpolarization-activated Cation Currents: From Molecules to Physiological Function. *Annu Rev Physiol* **65(1)**: 453–480. DOI: 10.1146/annurev.physiol.65.092101.142734
- Rossner K (1985) Isoprenaline-evoked disturbances in action potentials from hearts of young cardiomyopathic hamsters. *Cardiovasc Res* **19(9)**: 584–588
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487–491
- Santoro B, Tibbs GR (1999) The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann NY Acad Sci* **868**: 741–764

- Schultz JH, Volk T, Ehmke H (2001) Heterogeneity of Kv2.1 mRNA Expression and Delayed Rectifier Current in Single Isolated Myocytes From Rat Left Ventricle. *Circ Res* **88**(5): 483–490
- Seifert R, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P, Kaupp UB (1999) Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(16): 9391–9396
- Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT, Pan Z, Robinson RB, Dixon JE, McKinnon D, Cohen IS (1999) Distribution and Prevalence of Hyperpolarization-Activated Cation Channel (HCN) mRNA Expression in Cardiac Tissues. *Circ Res* **85**: e1–e6
- Simon L, Ghaleh B, Puybasset L, Giudicelli J, Berdeaux A (1995) Coronary and hemodynamic effects of S 16257, a new bradycardic agent, in resting and exercising conscious dogs. *J Pharmacol Exp Ther* **275**(2): 659–666
- Stieber J, Herrmann S, Feil S, Löster J, Feil R, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (2003) The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(25): 15235–15240. DOI: 10.1073/pnas.2434235100
- Tomaselli GF, Beuckelmann DJ, Calkins HG, Berger RD, Kessler PD, Lawrence JH, Kass D, Feldman AM, Marbán E (1994) Sudden Cardiac Death in Heart Failure. *Circulation* **90**: 2534–2539
- Tomaselli GF, Marbán E (1999) Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* **42**(2): 270–283. DOI: 10.1016/S0008-6363(99)00017-6
- Tritthart H, Luedcke H, Bayer R, Stierle H, Kaufmann R (1975) Right ventricular hypertrophy in the cat – an electrophysiological and anatomical study. *J Mol Cell Cardiol* **7**(3): 163–174
- Ulens C, Tytgat J (2001) Functional Heteromerization of HCN1 and HCN2 Pacemaker Channels. *J Biol Chem* **276**(9): 6069–6072
- Vaccari T, Moroni A, Rocchi M, Gorza L, Bianchi ME, Beltrame M, DiFrancesco D (1999) The human gene coding for HCN2, a pacemaker channel of the heart. *Biochim Biophys Acta* **1446**: 419–425. DOI: 10.1016/S0167-4781(99)00092-5
- Vassalle M (1995) The pacemaker current ( $I_f$ ) does not play an important role in regulating SA node pacemaker activity. *Cardiovasc Res* **30**: 309–310

- Wang Z, Yue L, White M, Pelletier G, Nattel S (1998) Differential Distribution of Inward Rectifier Potassium Channel Transcripts in Human Atrium Versus Ventricle. *Circulation* **98(22)**: 2422–2428
- Wollmuth L, Hille B (1992) Ionic Selectivity of  $I_h$  Channels of Rod Photoreceptors in Tiger Salamanders. *J Gen Physiol* **100(5)**: 749–765
- Xu H, Dixon J, Barry D, Trimmer J, Merlie J, McKinnon D, Nerbonne J (1996) Developmental Analysis Reveals Mismatches in the Expression of  $K^+$  Channel  $\alpha$  Subunits and Voltage-gated  $K^+$  Channel Currents in Rat Ventricular Myocytes. *J Gen Physiol* **108(5)**: 405–419
- Xue T, Marbán E, Li RA (2002) Dominant-Negative Suppression of HCN1- and HCN2-Encoded Pacemaker Currents by an Engineered HCN1 Construct: Insights Into Structure-Function Relationships and Multimerization. *Circ Res* **90(12)**: 1267–1273. DOI: 10.1161/01.RES.0000024390.97889.C6
- Yu H, Chang F, Cohen I (1993) Pacemaker current exists in ventricular myocytes. *Circ Res* **72(1)**: 232–236
- Yu H, Chang F, Cohen I (1995) Pacemaker current  $I_f$  in adult canine cardiac ventricular myocytes. *J Physiol* **485**: 469–483
- Yu H, Wu J, Potapova I, Wymore RT, Holmes B, Zuckerman J, Pan Z, Wang H, Shi W, Robinson RB, El-Maghrabi MR, Benjamin W, Dixon J, McKinnon D, Cohen IS, Wymore R (2001) MinK-Related Peptide 1: A  $\beta$  Subunit for the HCN Ion Channel Subunit Family Enhances Expression and Speeds Activation. *Circ Res* **88(12)**: e84–e87. DOI: 10.1161/hh1201.093511

# A Material

## A.1 Chemikalien

Agarose	Serva (Heidelberg)
Ammoniumsulfat	Bio-Rad (München)
Ampicillin	Sigma (Deisenhofen)
ATP	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Bacto Agar	Difco Laboratories (Detroit, USA)
Bacto Trypton	Difco Laboratories (Detroit, USA)
Bacto Hefeextrakt	Difco Laboratories (Detroit, USA)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
CTP	Boehringer Mannheim (Mannheim)
DTT	Sigma (Deisenhofen)
Ethidiumbromid	Fluka (Buchs, Schweiz)
GTP	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Guanidiniumthiocyanat	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Harnstoff	Merck (Darmstadt)
Long Ranger	Serva (Heidelberg)
MOPS	Fluka (Buchs, Schweiz)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
N-Laurylsarcosyl	Sigma (Deisenhofen)
Phenol	Merck (Darmstadt)
RNasin	Promega (Madison, USA)
TEMED	Merck (Darmstadt)
Tris	Merck (Darmstadt)
Triton X-100	Sigma (Deisenhofen)
UTP	Boehringer Mannheim (Mannheim)
<sup>32</sup> P-UTP	New England Nuclear Life Science Products

## A.2 Enzyme

Ban I	Boehringer Mannheim (Mannheim)
DNase I	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Eco RI	Pharmacia (Freiburg)
Nco I	NewEngland Biolabs (Schwalbach)
Pst I	Life Technologies (Eggenstein)
RNase A	Boehringer Mannheim (Mannheim)
RNase T <sub>1</sub>	Boehringer Mannheim (Mannheim)
SP6-Polymerase	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Taq-Polymerase	Life Technologies (Eggenstein)
T4-DNA-Ligase	Promega (Madison, USA)
T7-Polymerase	Boehringer Mannheim (Mannheim)

## A.3 Plasmidvektoren

pGEM-T	Promega (Madison, USA)
pGEM-2	Promega (Madison, USA)

## A.4 Bakterienstämme

Kompetente Escherichia coli DH <sub>5</sub> $\alpha$	Stratagene (Heidelberg)
--	-------------------------

## A.5 Reaktionskits

pGEM-T Vector System I	Promega (Madison, USA)
RPA II-Kit	Ambion (Austin, USA)
Superscript-II-RT	Life Technologies (Eggenstein)
Taq-DNA-Polymerase	Ambion (Austin, USA)
TdT	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)

## A.6 Verbrauchsmittel

Aqua ad iniectabilia	Pharmacia (Freiburg)
Eppendorfgefäße	Sarstedt (Nürnberg)
Falcongefäße	Becton Dickinson (Heidelberg)
Filmmaterial X-OMAT	Kodak (Stuttgart)
Kanülen	Braun (Melsungen)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nürnberg)
Sarstedt-Röhrchen	Sarstedt (Nürnberg)
Sterilfilter	Schleicher und Schuell (Dassel)

## A.7 Laborgeräte

Agarosegelkammern	Bio-Rad (München)
Analysenwaage, Mettler PH 480	Mettler Waagen (Gießen)
Digitalwaage	Mettler (Greifensee, Schweiz)
Electrophoresis Power Supply (Power Pac 3000)	Bio-Rad (München)
Eppendorfszentrifuge 5415	Eppendorf (Hamburg)
Gelkammer S2/SA	Life Technologies (Eggenstein)

Heizblock	Eppendorf (Hamburg)
Hybridisierungssofen	Appligene (München)
Inkubator für Bakterien	Heraeus (Hanau)
Kühlzentrifuge JA-20	Beckman (Palo Alto, USA)
Kühlzentrifuge J2-21	Beckman (Palo Alto, USA)
Kühlzentrifuge J6-B	Beckman (Palo Alto, USA)
Kühlzentrifuge Mikro 24-84R	Hettich (Tuttlingen)
Magnetrührer	Heidolph (Kelheim)
pH-Meter, digital	Knick (Berlin)
PCR-Heizblock Hybaid	Eppendorf (Hamburg)
Polytron, PCU	Kinematika (Luzern, Schweiz)
Schüttelinkubator	CLF (Emersacker)
Spektrophotometer	Perkin-Elmer (München)
Vortexgerät	Heidolph (Kelheim)
Wasserdeionisierungsanlage	Millipore (Eschborn)

## A.8 Lösungen

Chloropan	50	% (v/v)	Phenol
	50	% (v/v)	Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)
Denaturierungspuffer	13,3	% (v/v)	10 × MOPS
	8,7	% (v/v)	Formaldehyd, säurefrei
	63,3	% (v/v)	Formamid, deionisiert
DNA-Ladepuffer	50	% (v/v)	1 × TBE
	50	% (v/v)	Glycerin
	1	% (w/v)	Bromphenolblau
	1	% (w/v)	Xylencyanol
Elutionspuffer (Sol. F)	0,5	M	NH <sub>4</sub> OAc
	1	mM	EDTA
	0,2	% (v/v)	SDS

Hybridisierungslösung (Sol. A)	80	% (v/v)	Formamid, deionisiert
	100	mM	Natriumcitrat, pH 6,4
	300	mM	Natriumacetat, pH 6,4
	1	mM	EDTA, pH 8
Ladepuffer (Sol. E)	80	% (v/v)	Formamid, deionisiert
	1	% (v/v)	Xylencyanol
	0,1	% (v/v)	Bromphenolblau
	2	mM	EDTA, pH 8
Ladepuffer	50	% (v/v)	Glycerin
	50	% (v/v)	Bromphenolblau, gesättigt
Long-Ranger Gel 5 %	350	mM (w/v)	Harnstoff
	5	% (v/v)	Long-Ranger
	6	% (v/v)	1 × TBE
	25	μl	TEMED
	250	μl	10 % APS
10 × MOPS, pH 7	0,2	M	MOPS
	50	mM	Natriumacetat
	10	mM	EDTA, pH 8
P1-Puffer, pH 8	50	mM	Tris/HCl
	10	mM	EDTA, pH 8
	0,1	mg/ml	RNase A
P2-Puffer	0,2	M	NaOH
	1	% (v/v)	SDS
P3-Puffer, PH 5,5	3	M	KAc
QC-Waschpuffer	1000	mM	NaCl
	50	mM	MOPS
	15	% (v/v)	Ethanol

QBT-Äquilibriumspuffer, pH 7	750	mM	NaCl
	50	mM	MOPS
	15	% (v/v)	Ethanol
	0,15	‰(v/v)	Triton X-100
QF-Elutionspuffer, pH 8,5	1250	mM	NaCl
	50	mM	Tris/HCl
	15	% (v/v)	Ethanol
RNase A/T <sub>1</sub> (Sol. R)	10	mM	Tris, pH 8
	0,1	M	EDTA, pH 8
	50	% (v/v)	Glycerin
	0,5	μg/μl	RNase A
	100	U/μl	RNase T <sub>1</sub>
Lösung D (Sol. D)	4	M	Guanidiniumthiocyanat
	25	mM	Natriumcitrat, pH 7
	0,5	% (v/v)	N-Laurylsarcosyl
	0,1	M	Mercaptoethanol
1 × TBE	89	mM	Tris-Base
	10	mM	Borsäure
	2	mM	EDTA
TELT-Lysispuffer	50	mM	Tris/HCl, pH 7,5
	62,5	mM	EDTA, pH 8
	2,5	M	LiCl
	0,4	% (v/v)	Triton X-100

## A.9 Medien

LB-Medium	10	g/l	Bacto Trypton
	10	g/l	NaCl
	5	g/l	Bacto Hefeextrakt

---

LB-Amp-Platten	10	g/l	Bacto Trypton
	10	g/l	NaCl
	5	g/l	Bacto Hefeextrakt
	15	g/l	Bacto Agar
	100	$\mu\text{g/ml}$	Ampicillin

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Struktur der humanen HCN-Kanäle . . . . .	4
1.2	Dendrogramm der humanen HCN-Kanäle . . . . .	5
3.1	Gelelektrophoretische Auftrennung der HCN2-Fragmente aus der PCR-Amplifikation . . . . .	23
3.2	Schematischer Ablauf der Vorbereitung und Durchführung eines RNase Protection Assay . . . . .	24
3.3	222-HCN2 im Plasmidvektor pGEM-T . . . . .	25
3.4	Gelelektrophorese eines Restriktionsverdau zur Überprüfung des Vorhandenseins des HCN2-Fragments im Vektor pGEM-T . . . . .	26
3.5	G <sub>sα</sub> im Plasmidvektor pGEM-2 . . . . .	27
3.6	Überprüfung des Restriktionsverdau von G <sub>sα</sub> in pGEM-2 durch Gelelektrophorese . . . . .	28
3.7	Elektrophorese präparierter RNA aus menschlichem Myokard . . . . .	29
3.8	Autoradiografie der <sup>32</sup> P-markierten cRNA antisense-Sonden von HCN2 und G <sub>sα</sub> nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Long-Ranger-Gel . . . . .	30
3.9	Autoradiografie eines repräsentativen RPA für HCN2 und G <sub>sα</sub> . . . . .	32
3.10	Standardgeraden für HCN2 und G <sub>sα</sub> . . . . .	33
3.11	HCN2-mRNA-Expression im linksventrikulären Myokard . . . . .	34
3.12	HCN2-mRNA-Expression in amol/μg Gesamt-RNA in verschiedenen Regionen des menschlichen Myokards . . . . .	36
3.13	G <sub>sα</sub> -mRNA-Expression in verschiedenen Regionen des menschlichen Myokards . . . . .	37
3.14	HCN2-mRNA-Expression in verschiedenen Regionen des menschlichen Myokards . . . . .	39

# Danksagung

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1998 bis September 1999 am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätskrankenhauses Eppendorf durchgeführt.

Mein Dank gebührt folgenden Personen:

- Herrn Prof. Dr. Hasso Scholz  
... für die Überlassung des Themas.
- Herrn Prof. Dr. Thomas Eschenhagen  
... für die Betreuung der Dissertation und die kritische Durchsicht der Arbeit.
- Frau Dr. Stefanie Maas  
... für die Einführung in das Arbeitsthema, die exzellente wissenschaftliche Betreuung sowie die ständige Bereitschaft zur Diskussion.
- Herrn Dr. Clemens Mittmann  
... für die Hilfestellung bei der Durchführung der RNase Protection Assays.
- Allen Mitarbeitern des Institutes  
... für das hervorragende Arbeitsklima, die Hilfsbereitschaft, die guten Ratschläge, immer nette Worte und den Kaffee.
- Cornelia  
... für Aufmunterung, Motivation und das Korrekturlesen.
- Madeleine, Tetsche und Hannes  
... für eure Unterstützung.
- Donald E. Knuth, Leslie Lamport, Hàn Thế Thành und Oren Patashnik  
... für ihre Programme  $\text{\TeX}$ ,  $\text{\LaTeX}$ ,  $\text{\pdfTeX}$  und  $\text{\BIBTeX}$ , ohne die diese Arbeit nicht so aussehen würde.

Für die statistisch im Text verbliebenen 10 Fehler [Beck-Bornholdt und Dubben 2001] zeichne ich allein verantwortlich.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name Tobias Tödter  
Geburtsdaten 3. Januar 1974 in Hamburg

## Ausbildung

1994 Abitur am Vincent-Lübeck-Gymnasium in Stade  
1995–2002 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg  
2002 Approbation  
2003–2004 Arzt im Praktikum, Anästhesiologie, Krankenhaus Elmshorn  
Seit 2004 Assistenzarzt, Anästhesiologie, Albertinen-Krankenhaus Hamburg

## Veröffentlichungen

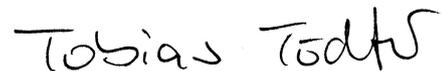
Tödter T, Gsell S, Mittmann C, Eschenhagen T (2000) Regionale Expression des hyperpolarisationsaktivierten Kationenkanals HCN2 in insuffizienten und nichtinsuffizienten menschlichen Herzen. Vortrag bei der 66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, Mannheim, 27. bis 29. April 2000

Gsell S, Mittmann C, Tödter T, Ludwig A, Biel M, Hofmann F, Eschenhagen T (1999) Differences in regional expression of the hyperpolarization-activated cation channel (HAC-1) in the rat and the failing human heart. Vortrag bei der 72nd Scientific Session, AHA, Atlanta, USA, 7. bis 10. November 1999. Abstract in: *Circulation* **100(18 suppl I)**: I-62.

Gsell S, Tödter T, Duce B, Cerbai E, Mugelli A, Zolk O, Weil J, Eschenhagen T (1999) Increased gene expression of the hyperpolarization-activated cation channel (HAC-1) correlates with hypertrophy and age in spontaneous hypertensive rats. Vortrag bei der 72nd Scientific Session, AHA, Atlanta, USA, 7. bis 10. November 1999. Abstract in: *Circulation* **100(18 suppl I)**: I-62.

# Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.



Tobias Tödter

Hamburg, 16. Oktober 2005