Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Aus dem Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie Zentrum für Experimentelle Medizin Direktor: Prof. Dr. med. Heimo Ehmke

Frequenz und Morphologie der Ca²⁺-Transienten von Sinusknotenzellen HCN4-defizienter Mäuse und ihre Einbindung in die sinoatriale Automatie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Jana Christina Müller aus Paderborn

Hamburg, 2014

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:	Prof. Dr. Heimo Ehmke
Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:	Prof. Dr. Friederike Cuello
Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:	Prof. Dr. Sonja Schrepfer

Meinen Eltern und meiner Schwester

Inhaltsverzeichnis

1.	Eir	nleitur	ng	7
	1.1.	Einf	ührung in die Thematik	7
	1.2.	Elek	ctrophysiologische Grundlagen	. 10
	1.2	.1.	Das Aktionspotential im Sinusknoten	. 10
1.2.2.		.2.	Die Diastolische Depolarisierung	. 10
	1.2	.3.	I _f -Strom zentrierte Schrittmachertheorie	. 12
	1.2	.4.	Erweiterung des Ansatzes durch die Ca ²⁺ -Uhr:	. 17
	1.3.	Visu	ualisierung und Einteilung der Ca ²⁺ -"Bewegungen"	. 19
	1.4.	Stuc	liendesign:	. 20
	1.4	.1.	hHCN4-CNBD und hHCN4-AYA	. 21
	1.5.	Ziel	setzung der Arbeit	. 24
2.	Ma	terial	und Methoden	. 25
	2.1.	Tier	e	. 25
	2.2.	Tier	haltung	. 25
	2.3.	Isola	ation des Sinusknotens	. 26
	2.4.	Isola	ation der Sinusknotenzellen	. 29
	2.4	.1.	Enzymverdau	. 29
	2.4	.2.	Waschung und manuelle Dissoziation	. 29
	2.4	.3.	Readaptation	. 29
	2.4	.4.	Lagerung der Zellen	. 31
	2.5.	Calc	cium-Imaging mittels konfokaler Mikroskopie	. 32
	2.6.	Stat	istische Analyse und Auswertungsprogramme	. 36
	2.7.	Lösi	ungen	. 36
	2.7	.1.	Zellisolation	. 36
	2.7	.2.	Anästhesie	. 37
	2.7	.3.	Ca ²⁺ -Imaging	. 37
3.	Erg	gebnis	sse	. 38
	3.1. hHCN	Alle N4-CN	e Sinusknotenzellen der drei untersuchten Genotypen (Wildtyp, hHCN4-AYA und IBD) zeigten Ca ²⁺ -,,Bewegungen" unterhalb der Zellmembran	. 38
	3.2.	Free	quenz der Transienten	. 43
	3.2 Stir	.1. mulati	Ähnliche spontane Häufigkeit der Transienten in den drei Genotypen unter on mit 2 nM Isoprenalin	. 43
	3.2 3µl	.2. M Rya	Spontane Häufigkeit der Transienten in den drei Genotypen nach Stimulation mit anodin im zeitlichen Verlauf des Versuchs und im Vergleich des Kontrollzeitpunkts	
	mit	dem	gemittelten Wert aller Versuchszeitpunkte unter Ryanodin-Superfusion	. 44

3	.3. Morphologie der Transienten	47	
	3.3.1. Ähnlichkeit in der Zeit bis zum Aufstrich (s) der Transienten in allen drei Genotypen unter Stimulation mit 2nM Isoprenalin	47	
	3.3.2. Signifikanter Unterschied in der Zeit bis zum Aufstrich (s) der Transienten zwische den drei Genotypen unter Stimulation mit 2nM Isoprenalin und 3µM Ryanodin	n 48	
	3.3.3. Zeit bis zum Aufstrich (s) der Transienten in den drei Genotypen im Vergleich des Kontrollzeitpunkts mit dem gemittelten Wert aller Versuchszeitpunkte unter Ryanodin-Superfusion.	51	
	3.3.4. Ähnliche Halbwertsbreite (s) der Transienten zwischen den drei Genotypen zum Kontrollzeitpunkt unter Stimulation mit 2nM Isoprenalin	52	
	3.3.5. Signifikanter Unterschied in der Halbwertsbreite (s) der Transienten zwischen den drei Genotypen unter Stimulation mit 2nM Isoprenalin und 3µM Ryanodin	53	
	3.3.6. Signifikanter Unterschied in der Halbwertsbreite der Transienten zwischen den drei Genotypen im Vergleich des Kontrollzeitpunkts mit dem gemittelten Wert aller Versuchszeitpunkte unter Ryanodin-Superfusion.	i 56	
	3.3.7. Signifikanter Unterschied in F/F_0 der Transienten zwischen den hHCN4-CNBD- Zellen und der hHCN4-AYA-Zelllinie unter Stimulation mit 2nM Isoprenalin	58	
	3.3.8. Signifikanter Unterschied in F/F_0 der Transienten zwischen den drei Genotypen unter Stimulation mit 2 nM Isoprenalin und 3µM Ryanodin	59	
	3.3.9. Signifikanter Unterschied in F/F_0 der Transienten zwischen den drei Genotypen im Vergleich des Kontrollzeitpunkts mit dem gemittelten Wert aller Versuchszeitpunkte unter		
	Ryanodin-Superfusion	61	
4.	Diskussion	63	
4	.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	63	
4	.2. Transienten-Frequenz	65	
	4.2.1. Autonome Regulation zellulärer Schrittmachermechanismen	65	
	4.2.2. Der Einfluss von Ryanodin – Hochregulation anderer Interakteure oder Verlust der Ryanodin-Wirkung?	71	
4	.3. Morphologie der Transienten	73	
	4.3.1. Zeitliche Parameter	73	
	4.3.2. F/F ₀	78	
	4.3.3. Zeitliche Entwicklung von F/F ₀	81	
5.	Zusammenfassung	82	
6.	Literaturverzeichnis	84	
7.	Abbildungsverzeichnis	92	
8.	Tabellenverzeichnis		
9.	Abkürzungsverzeichnis	95	
10.	Danksagung	98	
		00	

1. Einleitung

1.1. Einführung in die Thematik

Die rhythmische und gerichtete Abfolge der Herzmuskelkontraktion ist Voraussetzung für die Lebensfähigkeit von Säugetieren. Für eine adäquate Reaktion auf Umweltreize ist neben der autonomen Regulation durch das vegetative Nervensystem und die dadurch garantierte unmittelbare Anpassung an sich schnell verändernde äußere und innere Anforderungen, die Aktivität des primären kardialen Schrittmacherzentrums, des Sinusknotens, ausschlaggebend (DiFrancesco & Borer, 2007; Mangoni & Nargeot, 2008).



Abbildung 1: Vier-Kammer-Blick auf das Herz des Säugetiers modifiziert nach Moorman & Christoffels, 2003.

Über die obere und untere Hohlvene (SCV, ICV) gelangt das Blut in den rechten Vorhof (RA). Es fließt über die Trikuspidalklappe in den rechten Ventrikel (RV) und wird über die Pulmonalarterien der Lunge zugeführt. Das dort oxygenierte Blut kommt über die Pulmonalvenen (PV) in den linken Vorhof (LA) und passiert die Mitralklappe (MV), um in den linken Ventrikel (LV) zu gelangen. Von dort fließt es über die Aorta in den Körperkreislauf. Die Schrittmacherzentren und die Reizweiterleitung setzen sich zusammen aus dem Sinusknoten (SAN), dem AV-Knoten (AVN), dem AV-Bündel (AVB), dem rechten und linken Kammerschenkel (BB) und der peripheren ventrikulären Reizleitung (PVCS). EPI: Epikard. CFB: Zentraler fibröser Körper. END: Endokard. MYO: Myokard.

Wie in **Abbildung 1** deutlich wird, spielen zusätzlich weitere, sekundäre und tertiäre Schrittmacherregionen wie z.B. der Atrioventrikularknoten (AV-Knoten) und die Purkinje-Fasern sowie die Erregungsweiterleitung innerhalb der Herzkammern eine große Rolle (Mangoni & Nargeot, 2008). Die klinische Bedeutung genauer Kenntnis der Automatie und Rhythmogenese im Herzen ergibt sich u.a. aus Beobachtungen zu vererbbaren Herzkrankheiten wie beispielsweise abnormen Herzfrequenzen und Arrhythmien. So sind Tachykardien beispielsweise mit einer Steigerung der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität im Allgemeinen assoziiert, während eine Bradykardie mit Erschöpfung und Leistungsknick, Palpitationen und vermehrten Synkopen einhergehen und im Extremfall die Implantation eines Herzschrittmachers nötig machen kann (Fox et al., 2008a; Reil & Böhm, 2008).



Abbildung 2: Sinusknotenzellen der Maus unterschiedlicher Morphologie modifiziert nach Mangoni & Nargeot, 2001.

Neben den spindel- und spinnenförmigen, sowie den elongierten Zellen finden sich auch atriale Zellen im Sinusknotenverbund.

molekularbiologischer Auf histologischer und Ebene zeichnen sich die Schrittmacherzentren des adulten Herzens bei Säugetieren durch spezialisierte Herzmuskelzellen aus, die sich in ihrer Gestalt, ihrer Funktion und ihren elektrophysiologischen Eigenschaften von Arbeitsmyokardzellen stark unterscheiden (siehe Abbildung 2). Während bei Arbeitsmyokardzellen die Kontraktilität im Vordergrund steht und sie durch bestimmte morphologische Kriterien von den anderen Zelltypen im kardialen Verbund abzugrenzen sind, finden sich bei Schrittmacherzellen neben einer relativ geringen Kontraktilität zudem ein spezielles Aktionspotential (AP) (Mangoni & Nargeot, 2008, siehe unten). Alles in allem führen viele Determinanten zu einem oszillierenden Membranpotential der Sinusknotenzellen. Dieser Befund ist wiederum richtungsweisend für die vom Sinusknoten getragene Funktion: Die rhythmische Generierung elektrischer Aktivität und deren Weiterleitung an den gesamten Zellverbund im kardialen System.

Auf übergeordneter Ebene hat die autonome Regulation des kardiovaskulären Systems eine große Bedeutung. Repräsentiert wird diese von einer Vielzahl neuronaler Komplexe, die über afferente und efferente Effektoren Stress adaptierte Reaktionen des Organismus gewährleisten. Diese sind eingebunden in die Herzfrequenzmodulation, die Erhöhung des peripheren Widerstandes, die Anpassung der kardialen Auswurfleistung sowie viele andere Parameter. Inner- und extrakardiale Ganglien nehmen gemeinsam mit zentralen Einheiten auf spinaler Ebene und im Hirnstamm an dieser Regulation teil (Ardell, 2011; Mangoni & Nargeot, 2008). Zu den innerkardialen Innervationsstrukturen zählt z.B. der intrinsische kardiale neuronale Plexus (ICNP) (Batulevicius et al., 2003; Beaumont et al., 2013), während das Ganglion Stellatum im Thorax lokalisiert ist (Shen et al., 2011). Die Koordination dieser peripheren, zentralen und Reflex induzierten neuronalen Kontrolle ist Dreh- und Angelpunkt für eine physiologische Herzaktion, bei deren Ungleichgewicht atriale und ventrikuläre Arrhythmien sowie ein plötzlicher Herztod die Folge sein können (Shen et al., 2011). Strukturelle Läsionen wie sie beispielsweise nach Myokardinfarkten oder einer chronischen Druckbelastung auftreten können, tragen über ein neuronales Remodeling zur Ausbildung von Arrhythmien bei. Es konnte gezeigt werden, dass eine myokardiale Überinnervation durch sympathische Neurone mit einem solchen Remodeling vergesellschaftet ist (Hardwick et al., 2009; Ogawa et al., 2009).

Welche Mechanismen ausschlaggebend für die kardiale Automatie sind, bleibt jedoch weiterhin Objekt vielfältiger biomedizinischer Forschung und wird kontrovers diskutiert (Lakatta & DiFrancesco, 2009; Maltsev & Lakatta, 2012).

1.2. Elektrophysiologische Grundlagen

1.2.1. Das Aktionspotential im Sinusknoten

Die herausragende Besonderheit des Aktionspotentials von Sinusknotenzellen ist das spontane Auftreten. Die Bedingungen für dieses spontan oszillierende Membranpotential sind ausschlaggebend für die gesamte kardiale Funktion. Abbildung 3 zeigt eine detaillierte Schemazeichnung der charakteristischen Phasen des Aktionspotentials der Sinusknotenzellen. Insgesamt sind drei Phasen beschrieben worden.

- So findet sich zu Anfang eine von einem Calcium-Einstrom (I_{Ca}) getragene Depolarisierung der Zellmembran. Dieser Aufstrich fällt im Vergleich zu atrialen oder ventrikulären Zellen langsamer aus (Maltsev & Lakatta, 2008).
- Hieran schließt sich die rasche Repolarisierung an, die bis zur Hyperpolarisierung fortschreitet und von einer Zunahme des spannungsabhängigen Kalium-Ausstroms (I_K) geprägt ist (Cho et al., 2003).
- 3. Das Erreichen des Maximalen Diastolischen Potentials (MDP) markiert sodann den Übergang zur Phase der Diastolischen Depolarisierung (DD), die für das sinoatriale Aktionspotential sehr charakteristisch ist. Diese trägt das Membranpotential zur Depolarisierungsschwelle, wodurch ein weiteres Aktionspotential ausgelöst wird und der gesamte Zyklus mit dem oben beschriebenen I_{Ca} erneut seinen Anfang findet (Dobrev, 2009; Mangoni et al., 2003).

1.2.2. Die Diastolische Depolarisierung

Eine frühe lineare und eine späte nicht-lineare Phase prägen die Diastolische Depolarisierung. Es wird angenommen, dass die Abnahme der K⁺-Leitfähigkeit am Ende

der Repolarisierung des Aktionspotentials die Aktivierung von einwärts gerichteten Strömen zur Folge hat.



Abbildung 3: Idealisiertes Aktionspotential einer Sinusknotenzelle mit den beteiligten Ionenströmen und den intrazellulären Ca²⁺-Bewegungen modifiziert nach Maltsev & Lakatta, 2008 und Mangoni & Nargeot, 2008.

APD: Aktionspotentialdauer. **DD**: Diastolische Depolarisierung. **LDD**: Linearer Anteil der Diastolischen Depolarisierung, der vor allem dem I_f-Strom zugeschrieben wird. **EDD**: Exponentieller Anteil der Diastolischen Depolarisierung, in dem verschiedene Ca²⁺-Kanäle aktiv sind. **E**_{th}: Schwellenpotential zur Auslösung eines neuen Aktionspotentials. **CICR**: Ca²⁺-induzierte Ca²⁺-Freisetzung.

Diese sind wiederum der Lage, das Membranpotential bis in zu einer Depolarisierungsschwelle (Eth) zu bringen, ab der ein erneutes Aktionspotential generiert wird (Maltsev & Lakatta, 2008). Die frühe lineare Phase wird von vielen Autoren dem If-Strom ("funny current") zugeordnet, der von HCN-Kanälen vermittelt wird (DiFrancesco, 2010; Severi et al., 2012). Der If-Strom stellt an dieser Stelle einen depolarisierenden Einwärtsstrom dar, der das MDP begrenzt. Darüber hinaus wird aus den intrazellulären

Ca²⁺-Speichern (Sarkoplasmatisches Retikulum, SR) Ca²⁺ freigesetzt, was wiederum den Na⁺-/Ca²⁺-Austauscherstrom (I_{NCX}) in der Zellmembran aktiviert (Severi et al., 2012). Auch hier wird ein depolarisierendes Signal gesetzt, das zur nicht-linearen Phase der Diastolischen Depolarisierung überleitet. Spannungsabhängige T-Typ- und L-Typ-Ca²⁺- Kanäle tragen zur weiteren Depolarisierung der Zellmembran bei (Mangoni et al., 2006). Insgesamt steigt die Ca²⁺-Konzentration im intrazellulären Kompartiment. Auch die über Ryanodin-Rezeptoren (RyR) vermittelte Ca²⁺-induzierte Ca²⁺-Freisetzung (CICR) aus dem SR trägt zum Trigger eines neuen Aktionspotentials bei (Lakatta et al., 2008).

Es ist Gegenstand kontroverser Diskurse, welche molekularbiologischen und elektrophysiologischen Mechanismen ausschlaggebend für die Initiierung der Schrittmacheraktivität von Sinusknotenzellen sind. Die zwei etablierten dichotom anmutenden Theoriekomplexe sollen im Folgenden genauer erläutert werden.

1.2.3. I_f-Strom zentrierte Schrittmachertheorie

Der I_f-Strom ist ein bei Hyperpolarisation der Plasmamembran aktivierter, nicht-selektiver Kationenstrom, dessen elektrophysiologische Eigenschaften den vermittelnden Kanälen ihren Namen gegeben haben. In seiner Aktivität ist er abhängig von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Es bestehen vier Isoformen der als Heterotetramere in Erscheinung tretenden HCN-Kanäle (Biel et al., 2009; Herrmann et al., 2007a). **Abbildung 4** zeigt den Aufbau einer HCN-Untereinheit. Die Kanäle sind vornehmlich permeabel für monovalente Ionen, nämlich für Na⁺ und K⁺. Die K⁺-Leitfähigkeit spielt im ganzen Aktionspotential nur eine untergeordnete Rolle. Auch wurde von einer Ca²⁺-Leitfähigkeit des Kanals berichtet, deren Anteil am gesamten I_f-Strom jedoch gering ist und nicht mehr als ein Prozent beträgt. Dieser Betrag kann die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration allerdings signifikant erhöhen und die empfindliche Ca²⁺-Homöostase der Zelle beeinflussen (Bers, 2008; Yu et al., 2007).

Die N⁺-Leitfähigkeit kommt bei Hyperpolarisation der Zellmembran von -40 bzw.-45 mV und in der Diastolischen Depolarisierung zum Tragen. Ansonsten ist der I_f-Strom *silent* (DiFrancesco, 2010). Seine volle Aktivität entfaltet sich bei einem Membranpotential von -100 mV, während sein Umkehrpotential bei -10 bzw. -20 mV liegt (Mangoni & Nargeot, 2008). Von den vier Isoformen des Kanals (HCN1-4) wird vor allem die HCN4-Isoform im Sinusknoten und in den sekundären kardialen Schrittmacherzentren exprimiert (Herrmann et al., 2007a). Die verschiedenen Isoformen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken, ihrer Sensibilität für cAMP und ihrer Strom-Spannungsbeziehung (Mangoni & Nargeot, 2008).



Abbildung 4: Darstellung einer der vier Untereinheiten eines HCN-Kanals modifiziert nach Baruscotti et al., 2010.

Jede Untereinheit ist zusammengesetzt aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6), von denen S4 den Spannungssensor darstellt. Am C-Terminus kann der Second Messenger cAMP an die "Cyclic nucleotide binding"-Domäne (CNBD) binden und so die Aktivierung des Kanals bei weniger negativen Membranpotentialen bewirken.



Abbildung 5: Darstellung der Zellmembran einer Sinusknotenzelle mit einem HCN-Kanal und einem Rezeptor für Noradrenalin und Acetylcholin moduliert nach DiFrancesco & Borer, 2007.

Über die Stimulierung und Hemmung der Bildung von cAMP wird die Aktivität des HCN-Kanals reguliert. Erhöht sich durch noradrenerge Stimulation die cAMP-Konzentration, bindet das Molekül vermehrt an die cAMP-Bindungsdomäne am C-Terminus des Kanals und verschiebt die Strom-Spannungskurve nach rechts, wodurch die diastolische Offenwahrscheinlichkeit des Kanals zunimmt. Die Bindung von Acetylcholin an den muscarinergen Rezeptor bewirkt Gegenteiliges. **ACh:** Acetylcholin. **AC:** Adenylatcyclase. **β-AR:** β-Adrenorezeptor. **G**_i: Inhibitorisches G-Protein zur Inhibierung von AC. **G**_s: Stimulierendes G-Protein zur Stimulierung von AC. **M2-R:** Muskarinerger Rezeptor Typ 2. **NA:** Noradrenalin. Nordrenerg und muscarinerg über cAMP-abhängige Signalkaskaden vermittelt, nimmt das vegetative Nervensystem Einfluss auf die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals (Mangoni & siehe Abbildung 5). Mit seiner Entdeckung und richtigen Nargeot, 2008, Charakterisierung rückte der I_f-Strom als Akteur für die Initiierung der Schrittmachertätigkeit in den Vordergrund. So spricht z.B. seine Aktivierung bei Hyperpolarisierung der Zellmembran am Ende der Repolarisierungsphase des Aktionspotentials für eine Einbindung in den Schrittmacherzyklus. Als depolarisierendes Moment ist er notwendig für die Steilheit der Diastolischen Depolarisierung, die ausschlaggebend für das nächste Aktionspotential ist. Damit beeinflusst er die Schrittmacherfrequenz des Sinusknotens (Severi et al., 2012). Die Einbindung in die autonomen Regulationsmechanismen der Herzfrequenz über cAMP vermittelte Signalkaskaden spricht für die Wichtigkeit des Stroms in der Herzfrequenzregulierung (DiFrancesco, 2010). Wie in Zusammenarbeit mit der Montpellier-Arbeitsgruppe publiziert, lässt sich durch die fluoreszierende Anfärbung des Herzens mit HCN4-Antikörpern die Sinuskotenregion gezielt darstellen und vom restlichen Myokard abgrenzen (siehe Abbildung 6, (Mesirca et al., 2013)).

Weiterhin spielt der I_r-Strom auch eine pathophysiologische Rolle. Neben der Etablierung des Pharmakons Ivabradin als spezifischem I_r-Kanal-Blocker in der Behandlung der stabilen Angina pectoris (Fox et al., 2008b), sind im HCN4-Ionenkanal-Gen gelegene Mutationen mit schweren Herzrhythmusstörungen beim Menschen assoziiert (Baruscotti et al., 2010). Der Einsatz konditioneller Knockouts in Tierlinien konnte der Diskussion um die Rolle des I_r-Stroms als primärem, kardialem Schrittmacher neue Impulse geben. So wurde gezeigt, dass die cAMP-abhängige Regulation von HCN4-Kanälen zwar die maximale und basale Herzfrequenz beeinflusst, doch trotz der Ausschaltung dieses Signalwegs das relative Ausmaß der Herzfrequenzadaptation erhalten bleibt (Alig et al., 2009). Darüber hinaus schätzen einige Autoren das durch den Strom vermittelte depolarisierende Signal als viel zu gering ein, um eine wirkliche Rolle im normalen Aktionspotential spielen zu können. Zudem sei der Strom erst bei zu negativen Membranpotentialen aktiv genug (Lakatta & DiFrancesco, 2009). Damit ist die alleinige Relevanz des I_r-Stroms für den Schrittmacherzyklus infrage gestellt und Erweiterungen der bislang etablierten Modelle sind gefordert.



Abbildung 6 A und B: Repräsentative Darstellung der Sinusknotenregion nach Färbung mit HCN4-Antikörpern in Zusammenarbeit mit Mesirca et al., 2013.

SVC: V. cava superior. **SAN:** Sinusknoten. **CT:** Crista terminalis. **RA:** Rechter Vorhof. **IVC:** V. cava inferior.

1.2.4. Erweiterung des Ansatzes durch die Ca²⁺-Uhr:

Getragen von verschiedenen Ionenkanälen, Ionenaustauschern, dem zellulären Ca²⁺-Speicher in Form des SR und der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ist die intrazelluläre, rhythmische und spontane Ca²⁺-Freisetzung in die physiologischen Vorgänge in Sinusknotenzellen während eines Aktionspotentials eingebunden (Maltsev & Lakatta, 2008, 2012). Der Ionenaustauscherkanal NCX nimmt im Schrittmacherzyklus und in der intrazellulären Ca²⁺-Homöostase eine entscheidende Position ein (Kurata et al., 2012). Ca²⁺-Einstrom führt während der Diastole und des Aktionspotential-Aufstrichs zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und stimuliert dabei die Aktivität des Ionenaustauschers. Es kommt zum Netto-Einwärtsstrom (drei Na⁺-Ionen werden importiert, ein Ca²⁺-Ion wird exportiert) und damit zur Depolarisierung der Zellmembran. An der Senkung des Ca²⁺-Spiegels während der Repolarisierungsphase ist neben I_{NCX} die ATP-abhängige Ca²⁺-Pumpe des Sarkoplasmatischen und Endoplasmatischen Retikulums (SERCA) beteiligt. Diese gewährleistet die Rückbeförderung des Ca²⁺ ins SR und kann über ihre Aktivität ebenfalls die Schrittmacherfrequenz modulieren (Maltsev & Lakatta, 2009; Mangoni & Nargeot, 2008).

Auch im Ca²⁺-Rhythmus der Zellen ist das vegetative Nervensystem von entscheidender Bedeutung. Die Aktivität von I_{NCX} wird mittels β-adrenerger Stimulation hochreguliert und spricht sehr empfindlich auf steigende intrazelluläre Ca²⁺-Spiegel an. Die lokalen rhythmischen, über RyR vermittelten Ca²⁺-Freisetzungen (LCRs) aktivieren den Ionenaustauscher und erwirken damit wiederum den exponentiellen Aufstrich des Aktionspotentials, der mit einer zusätzlichen Ca²⁺-Freisetzung einhergeht (Bogdanov et al., 2001). Bei der Blockade des Austauschers kommt es zu einer schnellen Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels und zur Einstellung der zellulären Schrittmacheraktivität. Es scheint somit evident, dass eine ungestörte Tätigkeit von NCX notwendig für eine intakte Schrittmachertätigkeit ist (Mangoni & Nargeot, 2008).

Daneben erweisen sich spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle als relevant, die in L-Typ- und in T-Typ-Kanäle eingeteilt werden. Sie unterscheiden sich sowohl in ihren Kinetiken als auch in ihrer Pharmakologie voneinander. Die ubiquitäre myokardiale Expression von L-Typ-Ca²⁺-Kanälen (die Untereinheit Ca_v1.2 im Ventrikel und die Untereinheit Ca_v1.3 im Atrium, AV- und Sinusknoten) spricht für ihre Bedeutung für den Herzmuskel (Christel et al., 2012). Die Gene alpha1c und alpha1d kodieren für sie (Bers, 2008). Dihydropyridine

wie Nifedipin und BAYK 8644 hemmen und eine Proteinkinase A (PKA)-abhängige Phosphorylierung stimuliert ihre Aktivität (Mangoni & Nargeot, 2008). Ab einer Depolarisierung der Zellmembran von -30 bis -50 mV öffnen die Kanäle, während sie durch Ca²⁺ und spannungsabhängig inaktiviert werden. Diese Regulation kann sowohl über die PKA als auch über die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) vermittelt werden (Bogdanov et al., 2001; Mangoni et al., 2005). Sowohl L-Typ- als auch T-Tvp-Ca²⁺-Kanäle sind für die Aufrechterhaltung der normalen Schrittmacherfunktion relevant. Bei selektivem Knockout des für L-Typ-Ca²⁺-Kanäle kodierenden Gens in Mäusen zeigt sich die Schrittmachertätigkeit der Sinusknotenzellen verlangsamt. Darüber hinaus kommt es zu einer Häufung spontaner Arrhythmien. Ähnlich wie If trägt auch I_{Ca.L} zur Phase der Diastolischen Depolarisierung bei (Mangoni et al., 2003). Vergleichbares zeigt sich bei Knockout des für T-Typ-Ca²⁺-Kanäle kodierenden Gens in Mäusen. Hier finden sich phänotypisch bradykarde Herzfrequenzen und eine Verlangsamung der atrioventrikulären Reizweiterleitung. Dieses wird auf die verringerte Anstiegssteilheit der Diastolischen Depolarisierung in den einzelnen Sinusknotenzellen zurückgeführt (Mangoni et al., 2006). Auch hier greift das vegetative Nervensystem regulierend ein: ß-adrenerge Stimulierung führt beispielsweise zu einem Shift in der Aktivierungskurve von I_{Ca}^{2+} , wodurch es zu einer früheren Stromaktivierung schon bei negativeren Membranpotentialen kommt (Bers, 2008).

Aus dem intrazellulär verfügbaren Ca²⁺, der Ionenpumpe SERCA, den RyR am SR und der Modellierung des SR über cAMP-, CaMKII- und PKA-abhängige Phosphorylierung ergibt sich ein hochkomplexes biologisches System aus Feedback- und Feedforward-Mechanismen, die in den Ca²⁺-Zyklus regulatorisch eingreifen und als ein stabiles Rückgrat für das Aktionspotential dienen können. Jeder Ca²⁺-Einstrom führt zur Vergrößerung des intrazellulären Ca²⁺-Speichers und stellt damit den Übergang der Diastolischen Depolarisierung zum nächsten Aktionspotential sicher. Es ergibt sich eine präzise Feineinstellung der Dauer und Frequenz der Aktionspotentiale. Die Beteiligung der intrazellulären Ca²⁺-Signalwege an Rhythmus, Frequenz und Initiierung der Automatie in Sinusknotenzellen liegt damit nahe (Lakatta & DiFrancesco, 2009; Lakatta et al., 2008; Maltsev & Lakatta, 2012), wenngleich bei einer Blockierung der Ca²⁺-Transienten dennoch eine rhythmische elektrische Aktivität vorhanden ist (Himeno et al., 2011; Severi et al., 2012). Die detaillierte Aufklärung dieser komplexen Strukturen bleibt somit ein spannendes Feld für weitere Forschung.

1.3. Visualisierung und Einteilung der Ca²⁺-"Bewegungen"

Die Rezeptoren am SR, die an der Ca²⁺-Freisetzung während des Schrittmacherzyklus beteiligt sind, können durch Ryanodin blockiert werden. Die Blockade bewirkt initial eine erhöhte Freisetzung von Ca²⁺ aus dem SR. Durch den Abtransport der intrazellulär nun erhöhten Ca²⁺-Konzentration nach extrazellulär über den NCX und den Rücktransport ins SR über die Ca²⁺-Pumpe SERCA erfolgt langfristig eine Abnahme der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Die Blockade der RyR führt zu einem Leck in den Ca²⁺-Kanälen des SR, wodurch es dann konsekutiv zu einer Depletierung der intrazellulären Ca²⁺-Speicher kommt. Diese führt weiterhin zu einer Abnahme der spontanen Schlagfrequenz in den Schrittmacherzellen (Bogdanov et al., 2001; Zucchi & Ronca-Testoni, 1997). Es zeigen sich viele der im Aktionspotential relevanten Parameter reduziert, was auf die intrazelluläre Ca²⁺-Depletion zurückgeführt wird (Lakatta & DiFrancesco, 2009; Lakatta et al., 2008).

Mittels konfokaler Mikroskopie können die beschriebenen Ca^{2+} -, Bewegungen" visualisiert werden. Hierbei handelt es sich streng genommen nicht um Bewegungen, sondern um spontan vom SR ausgehende, transiente Änderungen der Ca²⁺-Konzentration im subsarcolemmalen Kompartiment. Sie können anhand ihrer Charakteristika als Ca²⁺- Transienten oder als Ca²⁺-Sparks in Erscheinung treten (Cheng et al., 1993; Maltsev & Lakatta, 2009). Während bei Ca²⁺-Transienten davon ausgegangen werden kann, dass sie im gesamten subsarcolemmalen Raum stattfinden, treten Ca²⁺-Sparks lokal begrenzt auf. Luminal hohe Ca²⁺-Konzentrationen, wie sie sich nach einem stattgehabten Aktionspotential einstellen, führen zu diesen "Sparks" lokal begrenzter Ca²⁺-Freisetzungen (LCR), die wiederum CICR auslösen (siehe **Abbildung 7**). Damit aktivieren sie den einwärts gerichteten I_{NCX}, der dann über seine Elektrogenität ein depolarisierendes Signal setzt (Bers, 2008).

Experimentell wird auf Änderungen der Ca²⁺-Konzentration durch die Änderung des mittels der konfokalen Mikroskopie detektierten Fluoreszenzsignals geschlossen, das als Pixelintensität gemessen wird (Hancox et al., 1994).



Abbildung 7: Linescan-Abbildung von lokalen Ca²⁺-Freisetzungen (LCRs) in einer Sinusknotenzelle des Hasen modifiziert nach Lakatta et al., 2010.

Die spontanen Aktionspotentiale sind über das Fluoreszenzsignal gelegt. Die weißen Pfeilspitzen deuten auf die LCRs.

1.4. Studiendesign:

Haben Stieber et al. den letalen Ausgang der für diese Arbeit wichtigen hHCN4-Mutationen in der embryologischen Entwicklung muriner Tierlinien zeigen können, so ist für die Erforschung der Schrittmachermechanismen in adulten Organismen ein anderes Studiendesign gefragt (Stieber et al., 2003). Mittels des binären Tet-on/off-Systems zur konditionellen Expression bestimmter Zielgene konnte ein solches Design realisiert werden. Hierbei wird ein reversibles Knockout-System in das Genom des Versuchsobjekts implementiert, das einer sowohl räumlich als auch zeitlich strengen Kontrolle des mutierten Genprodukts unterliegt (Furth et al., 1994; Gossen & Bujard, 1992). Damit können verschiedene Probleme umgangen werden, die sich bei sonst bewährten Verfahren als für den Versuchsablauf hinderlich erweisen. So wird beispielsweise der oben bereits erwähnte letale Ausgang einer Mutation in der embryologischen Entwicklung der Tierlinien vermieden. Außerdem können weiteren Nebeneffekten der gezielten Mutation auf die Qualität und/oder die Quantität anderer, nativer Genprodukte durch für den Genverlust induzierte Kompensationsmaßnahmen vorgebeugt werden. Insgesamt rückt damit eine genauere und sicherere Interpretation der Versuchsergebnisse ins Möglichkeitsfeld der Forschenden (Bockamp et al., 2002).

1.4.1. hHCN4-CNBD und hHCN4-AYA

Die Mäuselinien hHCN4-CNBD und hHCN4-AYA fallen auf diesen transgenetischen Hintergrund im Tet-on/off-System zurück. Durch die Einführung der Mutationen im Teton/off-System können sich die Tiere in ihrer Fetalzeit unbeeinflusst von der jeweiligen Mutation entwickeln. Erst im adulten Stadium wird die Doxycyclin-Diät arretiert und die Mutationen kommen zu ihrer vollen Ausprägung. Beide Mutationen wirken sich auf molekularer Ebene auf die Integrität des HCN4-Kanals aus.

Die hHCN4-CNBD-Mutation des HCN4-573X-Proteins wurde in einer Patientin mit einer Sinusknotendysfunktion entdeckt und konnte erfolgreich in ein Mausmodell überführt werden (Schulze-Bahr et al., 2003). Durch die Mutation fehlt die CNBD-Domäne der HCN4-Untereinheit. Normalerweise bindet hierüber cAMP, welches nach ß-adrenerger Stimulation intrazellulär gebildet wird und die Aktivierungskinetiken des Kanals zu negativeren Membranpotentialen verschiebt (Mangoni & Nargeot, 2008). Dieser wird dadurch bereits zu einem früheren Zeitpunkt im Aktionspotential leitfähig. Eine Mutation der Bindungsdomäne hat also zur Folge, dass der Kanal weniger sensibel auf einen sympathischen Zugriff des vegetativen Nervensystems reagiert und einen Teil seines möglichen Beitrags zur Schrittmacheraktivität der Sinusknotenzellen einbüßt (Alig et al., 2009).

Die hHCN4-AYA-Mutation befindet sich hingegen auf Porenniveau des Kanals. Hierbei wurde die Aminosäuresequenz –GYG- durch –AYA- ausgetauscht, wodurch die gesamte Leitfähigkeit und Funktionstüchtigkeit des Kanals eingeschränkt ist. Der Austausch der Aminosäuresequenz in der HCN2-Untereinheit übt einen dominant-negativen Effekt sowohl auf die nativen HCN2- als auch auf die nativen HCN4-Untereinheiten aus (Er et al., 2003). Hierdurch konnte zudem gezeigt werden, dass sich die HCN2- und HCN4-Untereinheiten zur Bildung von Heterotetrameren zusammenfinden und zur Bildung eines funktionellen HCN-Kanals führen (Ye & Nerbonne, 2009). Eine vergleichbare Mutation konnte im Menschen identifiziert werden, die ebenfalls die leitende Region der Pore des HCN-Kanals betrifft. Über die autosomal-dominant vererbte Missense-Mutation G480R in

der HCN4-Untereinheit kommt es zu Einschränkungen in der Synthese, dem Membrantransport und der Funktionalität des Kanals. Betroffene zeigen allerdings nur eine milde Symptomatik mit einer höchstens leichten Sinusknotendysfunktion bei einer guten Langzeitprognose (Nof et al., 2007).

Wie in **Abbildung 8** schematisch illustriert, werden beim Tet-on/off-System zusätzlich zum Transgen der hHCN4-Untereinheit sowohl eine Promotor-Linie mit einem "Tetracycline dependenten Transactivator" (tTA) als auch eine Responder-Linie mit einem "Tetracyclin Responsiven Element" (TRE) in das Genom eingefügt. Das tTA koppelt an das TRE und erlaubt damit die Expression der transgenetischen Variante des HCN4-Genprodukts. In Gegenwart von Doxycyclin jedoch wird eine Konformationsänderung des tTA erzwungen, die die Transgenexpression verhindert. Hierfür wird das Medikament der Nahrung der Tiere zugeführt. Die Promotorlinie ist bei beiden Tierlinien identisch. Die Expression von tTA wird durch die schwere Kette des α -Myosins des Promotors kontrolliert, was eine konditionelle Expression des Transgens auf kardialer Ebene erlaubt. Durch die Koppelung der Mutation mit dem autofluoreszierenden Protein EGFP kann die Transgenexpression detailliert exploriert werden. Haben die Tiere die kritischen Phasen ihrer embryonalen Entwicklung überstanden, wird die Doxycyclindiät arretiert und es kommt nach vier bis sechs Wochen zur maximalen Transgenexpression (Alig et al., 2009).



Abbildung 8: Schematische Illustrierung der im Text beschriebenen Mutationen modifiziert nach Alig et al., 2009.

A: hHCN4-CNBD-Mutation im Tet on/off-System. B: hHCN4-AYA-Mutation im Tet on/off-System. Die Gabe von Doxycyclin (**Dox**) verhindert die Transgenexpression. Sobald sie arretiert wird, kommt das Transgen zur Ausprägung.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Zur differenzierten Aufklärung aller am Schrittmacherzyklus beteiligten Strukturen ist es essentiell festzustellen, ob und inwieweit die beiden HCN4-Kanal mutierten Zelltypen sich von den Wildtypzellen hinsichtlich ihrer Ca²⁺-Dynamiken unterscheiden. Die beiden Mutationen beeinträchtigen auf unterschiedliche Weise den Ionenstrom I_f, einen der Hauptakteure in der zellulären Automatie des Sinusknotens. Hierbei ist die differenzierte Betrachtung der Kanalfunktion von großer Relevanz, die lediglich über unterschiedliche funktionelle Beeinträchtigungen gewährleistet werden kann. Während die hHCN4-CNBD-Mutation den direkten Zugriff des autonomen Nervensystems auf den Kanal ausschaltet, beeinträchtigt die hHCN4-AYA-Mutation die generelle Leitfähigkeit des Kanals. Hieraus könnten sich demnach auch unterschiedliche Kompensationsstrategien für den Verlust des I_f-Stroms in den beiden Genotypen ergeben und Rückschlüsse auf die Einbindung anderer und möglicherweise sogar übergeordneter Regulationsmechanismen zulassen.

Welche Kompensationsstrategien zeigen sich hierfür innerhalb der Sinusknotenzellen? Welche Rolle nehmen dabei die intrazellulären Ca²⁺-Signalwege während des Schrittmacherzyklus ein? Und weiterhin: Was passiert, wenn auch die Ca²⁺-Signalwege mittels Ryanodin beeinträchtigt werden?

Um diese Fragen zu beantworten, sollen in der vorliegenden Studie die folgenden Punkte beleuchtet werden:

- Untersuchung der Ryanodin-Rezeptor abhängigen Ca²⁺-Freisetzung in murinen Sinusknotenzellen mittels konfokaler Mikroskopie zur Ca²⁺-Visualisierung.
- Vergleich der Frequenz und Morphologie der Ca²⁺-Transienten der zwei im I_f-Ionenkanal-Gen mutierten Mäuselinien hHCN4-CNBD- und hHCN4-AYA mit dem Wildtyp und untereinander.
- Analyse der Auswirkungen einer Superfusion mit hochdosiertem Ryanodin auf Frequenz und Morphologie der Ca²⁺-Transienten in den Zellen der beiden mutierten Genotypen im Vergleich mit dem Wildtyp und untereinander.

2. Material und Methoden

2.1. Tiere

Wie in der Einleitung beschrieben, wurden zwei Mäuselinien erzeugt, die zwei unterschiedliche Mutationen im HCN4-Kanal-Gen aufwiesen. Während die in dieser Arbeit als hHCN4-AYA bezeichnete Mauslinie das pWHERETre-HA-hHCN4-AYA-Konstrukt trug, exprimierte die hier als hHCN4-CNBD bezeichnete Mauslinie das pWHERETre-hHCN4-573X Konstrukt. Die Kreuzung erfolgte durch pronukleare Injektion der Genkonstrukte durch standardisierte Technik. Die Genotypisierung der Tiere und ihres Nachwuchses fand durch die PCR von Ohr- bzw. Schwanzbiopsien der Tiere statt. Herz-spezifische Promotor-Mäuse (FVB.Cg-Tg(Myh6-tTA)6Smbf/J) (Yu et al., 1996) wurden von den Jackson Laboratories (Bar Harbor, MA, USA) bezogen und zum C57BL/6J-Stamm für mehr als vier Generationen zurückgekreuzt. Zur Kenntlichmachung der _MHC-getragenen Transgenexpression wurden Indikatormäuse eingesetzt, die GFP und Galaktosidase von einem bidirektionalen DOX-sensitiven Element [Tg(GFPtetO7lacZ)] exprimierten. Die Generierung der Mäuselinien erfolgte von der Arbeitsgruppe "Experimentelle Neuropädiatrie" unter der Leitung von Dirk Isbrandt (ZMNH, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf). In enger Kooperation wurden uns die Tiere freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.2. Tierhaltung

Tiere gleichen Geschlechts wurden in Gruppen gemischten Genotyps von nicht mehr als fünf Tieren in Standardkäfigen unter spezifisch pathogen-freien Bedingungen gehalten. Weiterhin wurde ein regelmäßiger Tag-Nacht-Zyklus von jeweils zwölf Stunden bei konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit (ca. 50-55%) eingehalten. Wasser und Futter wurde den Tieren ad libitum zur Verfügung gestellt. Die doppelt transgenen Mäuse und ihre tTA-transgenen Wurfgeschwister, die als Kontrolle dienten, erhielten entweder normales Futter oder Futter, das mit 50 mg/kg Doxycyclin Hydrochlorid (Ssniff Spezialdiäten, Soest, Germany; Graymore Chemical, Hamburg, Germany) versetzt war, sobald die Zuchtpärchen zusammengesetzt wurden. Die Tierhaltung und die experimentelle Verwendung der Tiere erfolgten in Einklang mit dem Deutschen Tierschutzgesetz und waren von der Hamburger Behörde für Wissenschaft und Gesundheit bewilligt. Die Studie ist richtlinienkonform zur Haltung und Verwendung von Labortieren (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*), veröffentlicht durch das nationale Institut für Gesundheit der Vereinigten Staaten (US National Institutes of Health; NIH Publication No. 85-23, 1996), sowie in Übereinstimmung mit der Europäischen Verordnung (86/609/CEE).

2.3. Isolation des Sinusknotens

Alle in den folgenden Abschnitten benutzten Lösungen werden unter Punkt 2.7. in ihrer Zusammensetzung beschrieben.

Den unter Generalanästhesie stehenden Mäusen wurden die noch kontrahierenden Herzen entnommen. Die Anästhesie beinhaltete 0.01 mg/g Xylazin und 0.1 mg/g Ketamin. Nach ausreichender Analgesie und Heparinisierung wurden sie rücklings auf einer festen Unterlage fixiert und der Thorax vom Diaphragma aus eröffnet.

Nach vorsichtigem Entfernen der Lungenflügel konnte das Herz unter Sicht ausreichend mobilisiert und schließlich durch Kappen des Gefäßnetzes aus dem Organismus entnommen werden. Hierbei war unter anderem darauf zu achten, die untere und die obere Hohlvene gemeinsam mit dem gesamten Herzen unbeschädigt zu lassen.

Bereits im Thorax war das Gewebe mit der auf konstant 36°C erwärmten Tyrode-Lösung umspült worden. Im Anschluss an die Entnahme wurde das Herz in einer mit Silikon beschichteten Plastikschale durch kleine Nadeln (Minutien) fixiert und mit der bereits erwähnten Tyrode-Lösung komplett umspült. Hierbei kam es von ventral zu liegen, sodass die dorsale Seite im binokularen Mikroskop (Olympus, SZX16) zu sehen war und der Gefäßbaum sich in seiner Gänze untersuchen ließ.

Um nach und nach den Sinusknoten freizulegen, wurden vorerst die Ventrikel von den Vorhöfen getrennt und dabei weiterhin darauf Acht gegeben, die obere und untere Hohlvene nicht zu verletzen. Nach erfolgreicher Trennung wurden die Vorhöfe gemeinsam mit dem Gefäßbaum in der sogenannten Schmetterlingsformation auf der Silikonunterlage aufgespannt (Mangoni & Nargeot, 2008). Um die Sinusknotenregion freizulegen, wurden sodann die Einmündungen der oberen und unteren Hohlvenen von endokardial aufgesucht

und vorsichtig eingeschnitten. Markiert durch eine feine epikardiale Fettstraße und die Ansammlung von Melanozyten im Bereich der Sinusknotenzellen konnte die Sinusknotenregion identifiziert werden. In **Abbildung 9** ist schematisch die Lokalisation des Sinusknotens im Herzen (**A**) und die von den Ventrikeln getrennten Vorhöfe in der Schmetterlingsformation dargestellt (**B**). **Abbildung 10** zeigt die Schmetterlingsformation der Vorhöfe während einer Präparation. Zur Orientierungshilfe sind die relevanten anatomischen Strukturen eingezeichnet.

Während der gesamten Prozedur zeigten sowohl das Herz und im weiteren Verlauf auch die in der Schmetterlingsformation aufgespannten Vorhöfe spontane Kontraktionen. Der Ursprung und die Frequenz dieser Kontraktionen waren zusätzlich hinweisgebend für die richtige Identifizierung der Sinusknotenregion. Nach vorsichtiger Säuberung des Gewebes von zusätzlichen Fettsträngen, wurde der Sinusknoten aus dem atrialen Verbund gelöst und in den unten beschriebenen Enzymverdau zur Isolierung der Einzelzellen gegeben.



Abbildung 9: Herzansicht modifiziert nach Mangoni & Nargeot, 2008.

A: Idealisierte, schematische Darstellung des Herzens (Kaninchen) mit topographischer Einzeichnung der Sinusknotenregion. SCV: Vena cava superior. ICV: Vena cava inferior. Ao: Aorta. PA: Arteria pulmonalis. PV: Vena pulmonalis. RA: Rechter Vorhof. RV: Rechter Ventrikel. Cs: Sinus coronarius. B: Schematische Darstellung des linken und rechten Vorhofs mit Ausbreitung des Leitungssystems im Kaninchenherzen. Ansicht von dorsal und in Schmetterlingsformation. Ausbreitung nach Färbung mit HCN4-Marker.



Abbildung 10: Schmetterlingsformation des Sinusknotens während der Präparation (mit freundlicher Genehmigung von Matteo Mangoni).

SAN: Sinusknoten. **RA:** Rechtes Atrium. **LA:** Linkes Atrium. **SVC:** Vena Cava Superior. **IVC:** Vena Cava Inferior. **CT:** Crista Terminalis.

2.4. Isolation der Sinusknotenzellen

2.4.1. Enzymverdau

Der exzidierte und noch spontane Aktivität zeigende Sinusknoten wurde in zwei bis drei Gewebestreifen geschnitten und in eine "low-Ca²⁺ -, low-Mg²⁺ Lösung" (Kraftbrühe) überführt. Durch die niedrige Ca²⁺-Konzentration wurden die zelltoxischen Wirkungen des Ca²⁺ verhindert bzw. möglichst gering gehalten. Außerdem wurde hierdurch die Automatie der Zellen sofort verhindert.

Weiterhin wurde das Gewebe enzymatisch durch das Beifügen von "Liberase TH Research Grade", Bovine Serum Albumin (BSA) 1 mg/ml, und 200 µM CaCl₂ prozessiert (verdaut). Durch den Enzymverdau wurden die extrazelluläre Matrix zersetzt und die Schrittmacherzellen aus ihrem Verbund gelöst. Die Schwierigkeit bestand darin, das Gewebe lang genug inkubieren zu lassen, um einzelne Zellen zu erhalten. Gleichzeitig galt es zu verhindern, dass diese einzelnen Zellen von der enzymatischen Aktivität geschädigt wurden. Somit variierte die Inkubationszeit zwischen neun und 25 Minuten. Dabei befand sich das Reagenzglas in einem konstant 36°C warmen Wasserbad. Zusätzlich wurde der Enzymverdau alle vier Minuten durch manuelle Agitation ergänzt.

2.4.2. Waschung und manuelle Dissoziation

Die Gewebestücke wurden schließlich zur Arretierung des Verdauprozesses gewaschen und hierzu nachfolgend in vier Medien überführt, die auf 36°C erwärmte Kraftbrühe enthielten. In jedem Medium verblieben sie für jeweils vier Minuten. Im vierten und damit letzten Kraftbrühe enthaltenden Medium schloss sich die manuelle Dissoziation mit einer Pasteurpipette an, um die Sinusknotenzellen aus dem Gewebe zu lösen.

2.4.3. Readaptation

Da die Kraftbrühe durch das fehlende Ca^{2+} die zelluläre Automatie verhinderte, wurden die Zellen auf physiologische extrazelluläre Na⁺- und Ca²⁺-Konzentrationen durch das Hinzufügen von verschiedenen Lösungen readaptiert. Dieser Prozess war in sechs

vorsichtige Schritte unterteilt, um ein progressives Anreichern extrazellulären Ca^{2+} und Na^{+} und die gleichzeitige Abnahme des extrazellulären K^{+} zu erreichen.

Zuerst wurden mit einer jeweiligen Pause von vier Minuten zwei Volumina einer mit Ca^{2+} und Na⁺ angereicherten Lösung hinzugefügt. Nach weiteren vier Minuten folgte im Abstand von jeweils vier Minuten das Beifügen steigender Volumina (390µl, 1.25 ml, 4.4 ml) von in Tyrode gelöstem BSA (1mg/ml).

2.4.4. Lagerung der Zellen

Bis zu ihrer Verwendung wurden die Zellen in der oben beschriebenen Lösung in einem verschlossenen Gefäß bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Versuche erfolgten jeweils am gleichen Tag, 2-5 Stunden nach der Zellisolation. In **Abbildung 11** finden sich die unterschiedlichen Morphologien von Sinuszellen der Maus nach erfolgreicher Implementierung der Sinusknotenzell-Isolation am UKE in Zusammenarbeit mit dem Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie.



Abbildung 11: Sinusknotenzellen der Maus in Zusammenarbeit mit Weinberger et al., 2012.

Isolierte Sinusknotenzellen der Maus nach X-gal staining mit unterschiedlicher Morphologie. A und D: "elongated spindle-shaped Zellen". B und E: "spindle-shaped Zellen". C und F: "Vorhof-ähnliche Zellen".

2.5. Calcium-Imaging mittels konfokaler Mikroskopie

Die Calcium-Transienten wurden mittels des Calcium-Imaging durch ein konfokales Mikroskop detektiert. Die intakten Sinusknotenzellen wurden für den Versuchsablauf mit einem grün-fluoreszierenden, an Ca²⁺-bindenden Farbstoff (Fluo-4, AM, Invitrogen) geladen. Für eine optimale Sättigung inkubierte die Zellsuspension gemeinsam mit der Färbelösung in mit Laminin beschichteten Mikroskop-Schalen (Laminin Natural, Mouse; Invitrogen, FluoroDish; World Precision Instruments, Inc.).

Durch die Laminin-Beschichtung konnten sich die Zellen am Schalenboden absetzen und waren vor unvorhersehbaren Erschütterungen während des Versuchsablaufs weitestgehend geschützt.

Die Sinusknotenzellen wurden mittels ihrer Morphologie (spindelförmige bzw. spinnenförmige und elongierte Zellen) und ihrer Größe (~10 µm Durchmesser) von anderen erregbaren Zellen unterschieden (z.B. Muskelzellen des Vorhofgewebes). Unter visueller Kontrolle wurde die spontane Aktivität der untersuchten Zellen sichergestellt.

Vor und während des Versuchsablaufs befand sich die Zellsuspension in der Kontroll-Lösung, bestehend aus der Tyrode-Lösung und 2nM Isoprenalin, bzw. der Manipulationslösung, bestehend aus der Kontrolllösung und 3µM Ryanodin. Es wurden zu sechs Versuchszeitpunkten konfokale Bildaufnahmen der Versuchszellen gemacht. Die erste Aufnahme erfolgte unter der Kontrolllösung. Die zweite Aufnahme markierte den Start der Manipulationslösung. Hieran schlossen sich im jeweiligen Zeitabstand von einer Minute vier Aufnahmen unter Manipulationslösung an (siehe Abbildung 12). Es wurden für alle analysierten Parameter zwei Analysewege gewählt. Zum Einen wurde die zeitliche Entwicklung über alle sechs Versuchszeitpunkte betrachtet, zum Anderen wurde der Kontrollzeitpunkt dem gemittelten Wert aus allen fünf Versuchszeitpunkten unter Ryanodin-Superfusion gegenüber gestellt. Diese beiden unterschiedlichen Analysewege sind sinnvoll, um eine differenzierte Aussage über die Rynaodin-Wirkung auf die Zellen zu treffen. Bei der Betrachtung aller Versuchszeitpunkte standen die Entwicklung innerhalb des Versuchs und die Entfaltung der Ryanodin-Wirkung im Vordergrund. Bei der Zusammenfassung der fünf Versuchszeitpunkte unter Ryanodin-Superfusion zu einer Versuchsentität fokussierten wir einen Unterschied der Parameter zwischen dem Kontrollzeitpunkt und der globalen Ryanodin-Wirkung.



Kontrollzeitpunkt vs. Globale Ryanodin-Wirkung

Abbildung 12: Setup des Experiments mit insgesamt sechs Versuchszeitpunkten.

Markiert sind die Versuchszeitpunkte durch die sechs roten Pfeile. An jedem dieser Punkte wurde mit dem konfokalen Mikroskop ein Linescan gemacht (siehe Text). Versuchszeitpunkt 0 markiert den ersten Linescan in einer Lösung mit 2nM Isoprenalin (Kontrollzeitpunkt). Versuchszeitpunkt 1 markiert den Beginn der Superfusion mit einer Lösung aus 2nM Isoprenalin und 3 μ M Ryanodin. Versuchszeitpunkte 2-5 wurden im zeitlichen Abstand von jeweils einer Minute durchgeführt. Währenddessen bestand eine stetige Superfusion mit der Lösung aus 2nM Isoprenalin und 3 μ M Ryanodin. Markiert sind ebenfalls die beiden Analysewege für die erhobenen Parameter. Während sich der erste auf die zeitliche Entwicklung zu allen sechs Versuchszeitpunkten und damit auf die Entfaltung der Ryanodin-Wirkung konzentriert, nimmt der zweite die globale Auswirkung von Ryanodin im Vergleich zum Kontrollzeitpunkt in den Fokus.

Die Bildaufnahmen wurden mittels eines konfokalen Mikroskops aufgenommen (Meta Zeiss LSM 510 und Zeiss LSM 780). So wurden die Zellen mit einem Argon-Laser in der Linescan Konfiguration (10000 Scans pro Bildaufnahme; 1,54 ms pro Scan; damit ergibt sich eine Zeitspanne von 15,4 s pro Bildaufnahme) gescannt. Das Fluoreszenzsignal wurde bei 488 nm entsandt und die Emissionen bei einer Weite von >505 nm reabsorbiert. Ein 63x Wasser- Immersions-Objektiv und ein 63x Öl-Immersions-Objektiv wurden benutzt, um das intrazelluläre Ca²⁺ in den isolierten Sinusknotenzellen aufzuzeichnen. Die Scan-Linie wurde seitlich an den Schrittmacherzellen angelegt, da die Transienten von dort meist ihren Ausgang nahmen. Die Aufnahmen wurden für das Fluoreszenz-Hintergrundsignal korrigiert. Darüber hinaus wurden die Fluoreszenzwerte (F) zum basalen Fluoreszenzsignal (F₀) normalisiert, um das Fluoreszenzverhältnis (F/F₀) zu erhalten. Das Integral der Lichtintensität wurde mittels pClamp Software (Ver.9, Axon Instruments Inc.) gebildet. Die **Abbildungen 13-15** zeigen das Integral der Lichtintensität eines Transienten. Eingezeichnet ist jeweils die Ermittlung der untersuchten Parameter: Die Zeit bis zum Aufstrich, F/F₀ und die Halbwertsbreite.



Abbildung 13: Zeit bis zum Aufstrich.

Ermittlung der Zeit bis zum Aufstrich (s) anhand eines beispielhaften Ca²⁺-Transienten zum Kontrollzeitpunkt (Isoprenalin 2nM).



Abbildung 14: F/F₀.

Ermittlung von F/F_0 als Maß für die Amplitude der Transienten anhand eines beispielhaften Ca²⁺-Transienten zum Kontrollzeitpunkt (Isoprenalin 2nM).



Abbildung 15: Halbwertsbreite.

Ermittlung der Halbwertsbreite (s) anhand eines beispielhaften Ca²⁺-Transienten zum Kontrollzeitpunkt (Isoprenalin 2nM.

2.6. Statistische Analyse und Auswertungsprogramme

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (S.E.M, Anzahl der untersuchten Zellen) angegeben. Zur Testung des Signifikanzniveaus wurde die mehrfaktorielle Varianzanalyse angewendet (Two-Way ANOVA Test), gefolgt vom Bonferroni post-hoc-Test. Bei der Testung der statistischen Unterschiede wurden Ergebnisse als signifikant gewertet, sobald sie einen p-Wert von p<0.05 aufwiesen. In allen Abbildungen weist (*) auf p<0.05, (**) auf p<0.01, und (***) auf p<0.001 hin. Als statistisches Auswertungsprogramm wurde GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) gewählt.

2.7. Lösungen

2.7.1. Zellisolation

1. Tyrode (in mM/L):

NaCl 140; KCl 5.4; CaCl₂ 1.8; MgCl₂ 1; Hepes-NaOH 5; and D-Glukose 5.5. Adjustierung des pH auf 7,4 mit NaOH.

2. "Low Ca²⁺"-Lösung (in mM/L):

NaCl 140; KCl 5.4; MgCl2 0.5; CaCl2 0.2; KH2PO4 1.2; urine 50; D-Glucose 5.5; Bovin Serum Albumin (BSA) 1mg/ml; Hepes-NaOH 5. Adjustierung des pH auf 7,4 mit NaOH.

3. Enzymverdau:

Liberase TH Research Grade (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)

4. Kraftbrühe (in mM/L):

L-Glutaminsäure, 70; KCl, 20; KOH, 80; (\pm) D- β -OH-Buttersäure, 10; KH₂PO₄, 10; Taurin, 10; BSA, 1mg/ml und Hepes-KOH, 10. Adjustierung des pH auf 7,4 mit NaOH.

5. Readaptation (in mM/L):

Die erste Lösung enthielt: NaCl, 10; CaCl₂, 1.8.
Die finale Lösung zur Lagerung der Zellen enthielt: NaCl, 100; KCl, 35; CaCl₂, 1.3; MgCl2, 0.7; L-Glutaminsäure, 14; (\pm)D- β -OH-Buttersäure, 2; KH₂PO₄, 2; Taurin, 2; BSA 1mg/ml. Adjustierung des pH auf 7,4 mit NaOH.

2.7.2. Anästhesie

- 1. Xylazin (Rompun 2%, Bayer AG, Leverkusen Germany)
- 2. Ketamin (Imalgène, Merial, Bourgelat France)

2.7.3. Ca²⁺-Imaging

1. Färbelösung (in mM/L):

Stock-Lösung aus Acid Pluronic F-127 (Invitrogen), Fluo-4 Stock-Lösung (Fluo-4, AM/DMSO) sowie Tyrode (siehe oben).

Falls nicht anders angegeben entstammen alle Chemikalien der Firma Sigma (St. Quentin, Fallavier, France). Die $(\pm)D$ - β -OH-Buttersäure wurde von Fluka Chemika (Buchs, Switzerland) bezogen.

3. Ergebnisse

3.1. Alle Sinusknotenzellen der drei untersuchten Genotypen (Wildtyp, hHCN4-AYA und hHCN4-CNBD) zeigten Ca²⁺-"Bewegungen" unterhalb der Zellmembran.

Die aus dem Vorhofgewebe isolierten Zellen konnten mittels ihrer Morphologie und ihres spontan aktiven Verhaltens als Sinusknotenzellen identifiziert werden. Als Identifikationsmerkmale zeigten sich in der mikroskopischen Kontrolle sowohl spindel- und spinnenförmige, als auch elongierte Zellen, die sich aufgrund dieser Erscheinung deutlich von Vorhofzellen abhoben (siehe Abbildung 2 und 11 (Mangoni & Nargeot, 2008). Darüber hinaus wiesen die Sinusknotenzellen nach erfolgter Isolation in der Tyrode-Lösung spontane Kontraktionen auf und wurden u.a. aufgrund dieses spontan aktiven Verhaltens für die nachfolgenden Experimente ausgewählt. Auch unter Stimulation mit 2 nM Isoprenalin-Lösung zeigten sowohl die untersuchten Sinusknotenzellen des Wildtyps, als auch die der hHCN4-CNBD- und hHCN4-AYA-Mutanten Kontraktionen. Mittels der konfokalen Bildaufnahmen konnten zudem Änderungen der subsarcolemmalen Ca²⁺ -Konzentration detektiert und visualisiert werden. Die Abbildungen 16-18 zeigen beispielhafte Linescans (jeweils oben) und das dazugehörige, mittels der pClamp-Software erstellte Integral der fluoreszierenden Signalintensität der drei Zelltypen (jeweils unter dem Linescan) zu den sechs sechs Versuchszeitpunkten. Die Zeitpunkte (jeweils **A-F**) ergaben sich folgendermaßen: Ein Linescan wurde zu Beginn des experimentellen Setups in Kontrolllösung mit 2nM Isoprenalin angefertigt (16A, 17A, 18A). Beim Start der 3µM Ryanodin-Superfusion folgte der zweite Linescan (16B, 17B, 18B). Hieran schlossen sich vier weitere Linescans nach jeweils einer Minute an (16C-F, 17C-F, 18C-F). Veränderungen der fluoreszierenden Signalintensität wiesen auf Änderungen der submembranösen Ca²⁺-Konzentration und damit auf lokale Ca²⁺-Freisetzungen aus dem SR hin. Anhand ihrer Ausprägungen konnten sie als Ca²⁺-Transienten identifiziert werden. Ca²⁺-Transienten stellen flüchtige (transiente), sich im gesamten

subsarcolemmalen Kompartiment ausbreitende Erhöhungen der Ca^{2+} -Konzentration dar. ¹

¹ In den folgenden Abbildungen und Tabellen ist teilweise auf die vollständige Bezeichnung der mutierten Genotypen "hHCN4-CNBD" zugunsten "CNBD" und "hHCN4-AYA" zugunsten "AYA" aus Platzgründen verzichtet worden.



Abbildung 16 A-F: Linescans und jeweils darunter stehendes Integral der Signalintensität von einer beispielhaften Wildtypzelle zu allen sechs Versuchszeitpunkten.



Abbildung 17 A-F: Linescans und jeweils darunter stehendes Integral der Signalintensität von einer beispielhaften hHCN4-AYA-Zelle zu allen sechs Versuchszeitpunkten.



Abbildung 18 A-F: Linescans und jeweils darunter stehendes Integral der Signalintensität von einer beispielhaften hHCN4-CNBD-Zelle zu allen sechs Versuchszeitpunkten.

3.2. Frequenz der Transienten

3.2.1. Ähnliche spontane Häufigkeit der Transienten in den drei Genotypen unter Stimulation mit 2 nM Isoprenalin.

Um zu untersuchen, ob diese spontanen Änderungen der Ca²⁺-Konzentrationen innerhalb der Zelle durch das Ausschalten des Schrittmacherstroms I_f verändert waren, wurden die Ca²⁺-Transienten zunächst hinsichtlich der Häufigkeit ihres Auftretens analysiert. Diese bezog sich auf die Anzahl der Transienten pro Linescan. Die Dauer des Linescans ergab sich aus 10000 Scans pro komplettem Linescan, wovon jeder 1,54 ms dauerte (10000 x 1,54 ms = 15,4 s). Die untersuchten Zellen befanden sich hierbei in einer Kontrolllösung mit 2nM Isoprenalin. Im direkten Vergleich wiesen die Transienten der untersuchten Genotypen zum Kontrollzeitpunkt eine ähnliche Frequenz auf (siehe **Abbildung 19, Tabelle 1**).



Abbildung 19: Frequenz der Transienten, Versuchszeitpunkt 0.

Anzahl der Transienten pro Linescan (15,4 s) zum Versuchszeitpunkt 0 (Kontrollzeitpunkt) unter Stimulation mit 2nM Isoprenalin. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen (Two-way Anova, Bonferronis Posttest).

	WT			AYA			CNBD		
	Mittelwert	±SEM	N	Mittelwert	±SEM	Ν	Mittelwert	±SEM	Ν
ISO	11,33	4,06	3,00	11,13	5,34	8,00	8,00	5,02	4,00
Ry0	7,00	2,52	3,00	12,63	3,99	8,00	9,50	4,13	4,00
Ry1	6,00	2,52	3,00	20,00	4,31	8,00	7,50	4,19	4,00
Ry2	6,00	2,52	3,00	17,25	5,77	8,00	9,25	4,63	4,00
Ry3	5,33	1,86	3,00	23,25	6,38	8,00	9,25	5,31	4,00
Ry4	5,00	2,52	3,00	23,75	5,49	8,00	11,75	5,88	4,00

Tabelle 1: Mittelwerte, \pm Standardfehler (SEM) und Gruppengröße (N) der Frequenz (Anzahl der Transienten/Linescan (15,4 s)) im Genotypvergleich zu allen sechs Versuchszeitpunkten.

3.2.2. Spontane Häufigkeit der Transienten in den drei Genotypen nach Stimulation mit 3µM Ryanodin im zeitlichen Verlauf des Versuchs und im Vergleich des Kontrollzeitpunkts mit dem gemittelten Wert aller Versuchszeitpunkte unter Ryanodin-Superfusion.

Da die über RyR vermittelten Ca^{2+} -Freisetzungen elementarer Bestandteil der intrazellulären Ca^{2+} -Zyklisierungen sind, war es essentiell festzustellen, ob und inwieweit die HCN4-Kanal mutierten Zellen von den Wildtypzellen hinsichtlich ihrer Sensibilität für Ryanodin verschieden waren. Mit diesem Ziel wurden die Zellen während der konfokalen Linescans mit einer Lösung bestehend aus 2nM Isoprenalin und 3µM Ryanodin superfundiert. Pro Zelle wurden fünf Linescans gemacht, die im Abstand von jeweils einer Minute erfolgten. Während dieser Zeit standen die Zellen unter ständiger Ryanodin-Superfusion. Es ergaben sich hierbei weder im Vergleich der Wildtypzellen mit der jeweiligen Mutation, noch im Vergleich der mutierten Zellen untereinander signifikante Unterschiede. Tendenziell zeigte sich jedoch eine deutliche Abnahme der Transienten-Häufigkeit mit Beginn der Ryanodin-Perfusion in den Wildtypzellen, während es in beiden mutierten Zelllinien sogar zu einer tendenziellen Zunahme kam (siehe **Abbildung 20A**, **Tabelle 1**).





A: Frequenz der Transienten im Zeitverlauf des Versuchs. B: Frequenz der Transienten zum Kontrollzeitpunkt in 2 nM Isoprenalin im Vergleich zum Mittelwert der Transienten der Zeitpunkte 1 bis 5 in Superfusion mit Isoprenalin 2nM und Ryanodin 3μ M im Genotyp-Vergleich. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte ± Standardfehler (SEM). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen (Two-way Anova, Bonferroni-Posttest).

Im zweiten Schritt wurden die Mittelwerte aller Versuchszeitpunkte unter Ryanodin-Perfusion zu einer Versuchsentität zusammengefasst. Auch hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, dennoch wurden die oben beschriebenen tendenziellen Entwicklungen deutlich (siehe **Abbildung 20B, Tabelle 2).**

	WT			AYA			CNBD		
	Mittelwert	±SEM	N	Mittelwert	±SEM	Ν	Mittelwert	±SEM	Ν
Ctrl	11,00	3,26	5,00	12,30	4,49	10,00	8,00	5,02	4,00
Rya	3,88	1,79	5,00	16,60	3,92	10,00	9,45	4,75	4,00

Tabelle 2: Mittelwerte, ± Standardfehler (SEM) und Gruppengröße der Frequenz der Transienten im Genotypvergleich. Hierbei wurde der Kontrollzeitpunkt (Ctrl) den gemittelten Werten bei Ryanodin-Superfusion (Rya) gegenüber gestellt.

3.3. Morphologie der Transienten

In den Ca²⁺-Bewegungen der spontan kontrahierenden Schrittmacherzellen spielt neben der Häufigkeit der von der Zelle gezeigten Ca²⁺-Transienten auch deren Morphologie eine Rolle. Als morphologische Parameter waren hierbei die Zeit bis zum Aufstrich (s), die Halbwertsbreite (s) und F/F₀ (Maß für den maximalen Unterschied in der Ca²⁺-Signalstärke während eines Transienten) von maßgeblichem Interesse. Zur Ermittlung des jeweiligen Zielwerts siehe Kapitel 2.5.

3.3.1. Ähnlichkeit in der Zeit bis zum Aufstrich (s) der Transienten in allen drei Genotypen unter Stimulation mit 2nM Isoprenalin.

Als ein zeitlicher Parameter wurde die Dauer bis zur maximalen Ca²⁺-Signalstärke eines Transienten erfasst. Es konnte hierbei festgestellt werden, dass sich die Genotypen zum Kontrollzeitpunkt nicht signifikant voneinander unterschieden (siehe **Abbildung 21**).



Abbildung 21: Zeit bis zum Aufstrich, Kontrollzeitpunkt.

Zeit bis zum Aufstrich (s) zum Versuchszeitpunkt 0 (Kontrollzeitpunkt) unter Stimulation mit 2 nM Isoprenalin im Genotyp-Vergleich. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm

Standardfehler (SEM). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen (Two-way Anova, Bonferroni-Posttest).

3.3.2. Signifikanter Unterschied in der Zeit bis zum Aufstrich (s) der Transienten zwischen den drei Genotypen unter Stimulation mit 2nM Isoprenalin und 3µM Ryanodin.

Mit Beginn der Ryanodin-Perfusion ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen im zeitlichen Verlauf des Experiments. Es stellte sich heraus, dass sich die Transienten der hHCN4-AYA-Zelllinie zu den Versuchszeitpunkten 3, 4 und 5 vom Wildtyp unterschieden. Auch bei den hHCN4-CNBD-Zellen ergab sich zum Versuchszeitpunkt 5 ein im Vergleich zu den Wildtypzellen unterschiedliches Ergebnis. Hierbei zeigte sich die Zeit bis zum Aufstrich (s) teilweise um mehr als die Hälfte verkürzt. Der Vergleich der beiden mutierten Zelllinien erbrachte keinen Unterschied (siehe **Abbildung 22 A, B und C, Tabelle 3).**



Α





A: Zeit bis zum Aufstrich (s) im Zeitverlauf des Versuchs. B: Zeit bis zum Aufstrich (s) zu den Versuchszeitpunkten 3, 4 und 5 unter Stimulation mit Isoprenalin 2nM und 3µM Ryanodin im Vergleich des Wildtyps mit hHCN4-AYA. C: Zeit bis zum Aufstrich (s) zum Versuchszeitpunkt 5 im Vergleich des Wildtyps mit hHCN4-CNBD. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte ± Standardfehler (SEM). *p-Wert<0,05 ; ***p-Wert<0,001 (Two-Way-Anova, Bonferronis Posttest).

В

	WT			AYA			CNBD		
	Mittelwert	±SEM	Ν	Mittelwert	±SEM	Ν	Mittelwert	±SEM	Ν
ISO	0,15	0,07	3,00	0,07	0,01	7,00	0,08	0,01	4,00
Ry0	0,16	0,06	3,00	0,07	0,01	7,00	0,09	0,02	4,00
Ry1	0,16	0,06	3,00	0,07	0,01	7,00	0,12	0,04	4,00
Ry2	0,17	0,05	3,00	0,06	0,00	7,00	0,09	0,01	4,00
Ry3	0,18	0,05	3,00	0,07	0,01	7,00	0,10	0,02	4,00
Ry4	0,22	0,08	3,00	0,07	0,01	7,00	0,11	0,01	4,00

3.3.3. Zeit bis zum Aufstrich (s) der Transienten in den drei Genotypen im Vergleich des Kontrollzeitpunkts mit dem gemittelten Wert aller Versuchszeitpunkte unter Ryanodin-Superfusion.

Bei der Zusammenfassung aller Versuchszeitpunkte unter Ryanodin-Superfusion und Gegenüberstellung dieser Werte zum Kontrollzeitpunkt ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen ermitteln (siehe Abbildung 23, Tabelle 4).



Abbildung 23: Zeit bis zum Aufstrich, Kontrolle-Ryanodin.

Zeit bis zum Aufstrich (s) im Vergleich des Kontrollzeitpunkts zum gemittelten Wert der fünf Versuchszeitpunkte mit Ryanodin-Perfusion. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte ± Standardfehler (SEM). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen (Two-way Anova, Bonferronis Posttest).

	WT			АҮА			CNBD		
	Mittelwert	±SEM	N	Mittelwert	±SEM	Ν	Mittelwert	±SEM	N
Ctrl	0,12	0,04	5,00	0,08	0,01	11,00	0,08	0,01	4,00
Rya	0,15	0,04	5,00	0,09	0,02	11,00	0,10	0,02	4,00

Tabelle 4: Mittelwerte, ± Standardfehler (SEM) und Gruppengröße (N) der Zeit bis zum Aufstrich (s) im Genotypvergleich. Hierbei ist der Kontrollzeitpunkt (Ctrl) den gemittelten Werten bei Ryanodin-Superfusion (Rya) gegenüber gestellt.

3.3.4. Ähnliche Halbwertsbreite (s) der Transienten zwischen den drei Genotypen zum Kontrollzeitpunkt unter Stimulation mit 2nM Isoprenalin.

Die Transienten der drei Genotypen Wildtyp, hHCN4-AYA und hHCN4-CNBD wurden hinsichtlich ihrer Halbwertsbreite (s) auf ihr Antwortverhalten auf Stimulation mit 2nM Isoprenalin untersucht. Die Halbwertsbreite wurde als Maß für die Dauer der Ca²⁺-Transienten verwendet. Es zeigten sich bei der Analyse des zeitlichen Versuchsverlaufs keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen zum Kontrollzeitpunkt (siehe **Abbildung 24**).



Abbildung 24: Halbwertsbreite, Kontrollzeitpunkt.

Halbwertsbreite (s) zum Versuchszeitpunkt 0 (Kontrollzeitpunkt) unter Stimulation mit 2nM Isoprenalin im Vergleich aller drei Genotypen. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte ± Standardfehler (SEM). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen (Two-way Anova, Bonferronis Posttest).

3.3.5. Signifikanter Unterschied in der Halbwertsbreite (s) der Transienten zwischen den drei Genotypen unter Stimulation mit 2nM Isoprenalin und 3µM Ryanodin.

Unter Superfusion mit 2nM Isoprenalin und 3µM Rynaodin konnten signifikante Unterschiede zu den Versuchszeitpunkten 2, 3, 4 und 5 zwischen den Wildtypzellen und den Zellen der hHCN4-AYA-Linie ermittelt werden. Die Halbwertsbreite war in den mutierten Zellen um bis zu 2/3 des Wildtyp-Wertes verringert. Ebenso ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und den hHCN4-CNBD-Zellen zu den Versuchszeitpunkten 4 und 5. Auch hier zeigte sich für die mutierten Zellen ein bis zu 2/3 erniedrigter Wert. Hingegen konnte kein Unterschied zwischen den beiden mutierten Zelllinien hHCN4-AYA und hHCN4-CNBD festgestellt werden (siehe **Abbildung 25 A, B und C, Tabelle 5**).





A

В



Abbildung 25: Halbwertsbreite.

A: Halbwertsbreite (s) im Zeitverlauf des Versuchs. B: Halbwertsbreite (s) zu den Versuchszeitpunkten 2, 3, 4 und 5 unter Stimulation mit Isoprenalin 2nM und 3µM Ryanodin im Vergleich des Wildtyps mit hHCN4-AYA. C: Halbwertsbreite (s) zu den Versuchszeitpunkten 4 und 5 im Vergleich des Wildtyps mit hHCN4-CNBD. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte ± Standardfehler (SEM). *p-Wert<0,05. **p-Wert<0,01. ***p-Wert<0,001 (Two-Way-Anova, Bonferronis Posttest).

	WT			AYA			CNBD		
	Mittelwert	±SEM	N	Mittelwert	±SEM	Ν	Mittelwert	±SEM	Ν
ISO	0,22	0,09	3,00	0,10	0,02	7,00	0,13	0,03	4,00
Ry0	0,24	0,08	3,00	0,10	0,02	7,00	0,14	0,03	4,00
Ry1	0,26	0,08	3,00	0,10	0,02	7,00	0,11	0,03	4,00
Ry2	0,27	0,07	3,00	0,09	0,01	7,00	0,13	0,03	4,00
Ry3	0,30	0,09	3,00	0,09	0,01	7,00	0,11	0,03	4,00
Ry4	0,34	0,11	3,00	0,09	0,01	7,00	0,11	0,04	4,00

Tabelle 5: Mittelwerte, ±Standardfehler (SEM) und Gruppengröße (N) der Halbwertsbreite im Genotypvergleich zu allen sechs Versuchszeitpunkten.

55

3.3.6. Signifikanter Unterschied in der Halbwertsbreite der Transienten zwischen den drei Genotypen im Vergleich des Kontrollzeitpunkts mit dem gemittelten Wert aller Versuchszeitpunkte unter Ryanodin-Superfusion.

Im nächsten Schritt wurden die Mittelwerte der Halbwertsbreite der fünf **Ryanodin-Superfusion** Versuchszeitpunkte unter zu einer Versuchsentität zusammengefasst. Es zeigten sich hierbei signifikante Unterschiede zwischen den Wildtypzellen im Vergleich mit den hHCN4-AYA-Zellen sowohl zum Kontrollzeitpunkt als auch unter Ryanodin-Superfusion. Zudem ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtypzellen und den hHCN4-CNBD-Zellen unter Ryanodin-Superfusion ermitteln. Untereinander wiesen die beiden mutierten Genotypen dagegen keinen Unterschied auf (siehe Abbildung 26, Tabelle 6).

Insgesamt ließ sich also zu den erwähnten Versuchszeitpunkten unter Ryanodin-Superfusion eine verringerte Halbwertsbreite in den mutierten Genotypen feststellen. Das wies wiederum auf eine verringerte Dauer der Transienten hin.



Abbildung 26: Halbwertsbreite, Kontrolle - Ryanodin.

Halbwertsbreite (s) zum Kontrollzeitpunkt in Isoprenalin 2nM und zum gemittelten Wert über die Versuchszeitpunkte mit Ryanodin-Superfusion im Genotyp-Vergleich. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte ± Standardfehler (SEM). *p-Wert<0,05. **p-Wert<0,01. ***p-Wert<0,001 (Two-Way-Anova, Bonferronis Posttest).

	WT			AYA			CNBD		
	Mittelwert	±SEM	N	Mittelwert	±SEM	Ν	Mittelwert	±SEM	N
Ctrl	0,20	0,05	5,00	0,10	0,01	11,00	0,13	0,03	4,00
Rya	0,27	0,05	5,00	0,09	0,01	11,00	0,13	0,03	4,00

Tabelle 6: Mittelwerte, ±Standardfehler (SEM) und Gruppengröße (N) der Halbwertsbreite (s) im Genotypvergleich. Hierbei ist der Kontrollzeitpunkt (Ctrl) den gemittelten Werten bei Ryanodin-Superfusion (Rya) gegenüber gestellt.

3.3.7. Signifikanter Unterschied in F/F_0 der Transienten zwischen den hHCN4-CNBD-Zellen und der hHCN4-AYA-Zelllinie unter Stimulation mit 2nM Isoprenalin.

Das ermittelte Verhältnis F/F_0 setzte die maximale Signalstärke (F) eines Ca²⁺-Transienten in Bezug zur minimalen Signalstärke (F₀) und wurde damit als Verweis auf die Amplitude der Transienten verwendet.

Im Verlauf der sechs Versuchszeitpunkte konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Transienten der hHCN4-CNBD-Zellen und der hHCN4-AYA-Zelllinie festgestellt werden (siehe **Abbildung 27**). Hierbei ergaben sich für die hHCN4-AYA-Zellen zum Versuchszeitpunkt 0 jeweils erhöhte Werte im Vergleich zum hHCN4-CNBD-Genotyp, womit in ihnen eine größere Spanne zwischen der maximalen und der minimalen Signalstärke nachgewiesen werden konnte.



Abbildung 27: F/F₀, Kontrollzeitpunkt.

 F/F_0 zum Versuchszeitpunkt 0 (Kontrollzeitpunkt) unter Stimulation mit 2nM Isoprenalin im Vergleich der hHCN4-AYA-Linie mit hHCN4-CNBD. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte ± Standardfehler (SEM). *p-Wert<0,05 (Two-Way-Anova, Bonferronis Posttest).

3.3.8. Signifikanter Unterschied in F/F_0 der Transienten zwischen den drei Genotypen unter Stimulation mit 2 nM Isoprenalin und 3µM Ryanodin.

Es ergab sich zum Versuchszeitpunkt 1 (Start der Ryanodin-Superfusion) ein signifikanter Unterschied zwischen den hHCN4-AYA- und den hHCN4-CNBD-Zellen. So fand sich auch hier ein größerer Unterschied zwischen F und F_0 bei den Transienten der hHCN4-AYA-Zellen (siehe **Abbildung 28**).



Abbildung 28: F/F₀, Versuchszeitpunkt 1.

 F/F_0 zum Versuchszeitpunkt 1 unter Stimulation mit 2nM Isoprenalin und 3µM Ryanodin im Vergleich der hHCN4-AYA-Linie mit hHCN4-CNBD. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte ± Standardfehler (SEM). *p-Wert<0,05 (Two-Way-Anova, Bonferronis Posttest). Im weiteren Versuchsverlauf glich sich die Größe von F/F_0 der hHCN4-AYA-Zellen wieder der hHCN4-CNBD-Linie an (siehe **Abbildung 29**). Es konnte weiterhin kein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtypzellen und den beiden mutierten Zelllinien ermittelt werden (**Tabelle 7**).



Abbildung 29: F/F₀ im Zeitverlauf des Versuchs.

Es zeigten sich für die hHCN4-AYA-Mutante zu Beginn des Versuchs signifikant höhere Werte für F/F_0 .

	WT			AYA			CNBD		
	Mittelwert	±SEM	N	Mittelwert	±SEM	N	Mittelwert	±SEM	Ν
ISO	2,22	0,10	3,00	4,47	0,95	7,00	1,54	0,19	4,00
Ry0	2,05	0,18	3,00	4,65	0,94	7,00	1,51	0,16	4,00
Ry1	1,84	0,15	3,00	3,46	0,57	7,00	1,46	0,16	4,00
Ry2	1,91	0,09	3,00	3,10	1,16	7,00	1,31	0,10	4,00
Ry3	1,81	0,18	3,00	2,11	0,32	7,00	1,20	0,04	4,00
Ry4	1,73	0,19	3,00	1,79	0,29	7,00	1,17	0,03	4,00

Tabelle 7: Mittelwerte, \pm Standardfehler (SEM) und Gruppengröße (N) von F/F₀ im Genotypvergleich zu allen sechs Versuchszeitpunkten.

3.3.9. Signifikanter Unterschied in F/F_0 der Transienten zwischen den drei Genotypen im Vergleich des Kontrollzeitpunkts mit dem gemittelten Wert aller Versuchszeitpunkte unter Ryanodin-Superfusion.

Im nächsten Schritt wurden die fünf Versuchszeitpunkte mit Ryanodin-Perfusion zu einer Versuchsentität zusammengefasst und dem Kontrollzeitpunkt gegenübergestellt. Es ergaben sich hierbei für die untersuchten hHCN4-AYA-Zellen jeweils größere F/F_0 –Werte zu beiden Zeitpunkten sowohl im Vergleich zu den Wildtypzellen als auch zu den hHCN4-CNBD-Zellen (siehe **Abbildung 30 A** und **B**, **Tabelle 8**).





В

Abbildung 30: F/F₀ im Vergleich der Genotypen, Kontrolle - Ryanodin.

 F/F_0 im Vergleich des Kontrollzeitpunkts unter Stimulation mit Isoprenalin 2nM mit dem Mittelwert der fünf Versuchszeitpunkte unter Stimulation mit 2nM Isoprenalin und 3 μ M Ryanodin. **A** Wildtyp im Vergleich zu hHCN4-AYA. **B** hHCN4-CNBD im Vergleich zu hHCN4-AYA. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte ± Standardfehler (SEM). *p-Wert<0,05. **p-Wert<0,01. ***p-Wert<0,001 (Two-Way-Anova, Bonferronis Posttest).

	WT			AYA			CNBD		
	Mittelwert	±SEM	N	Mittelwert	±SEM	Ν	Mittelwert	±SEM	N
Ctrl	2,27	0,12	5,00	4,82	0,61	11,00	1,54	0,19	4,00
Rya	1,54	0,28	5,00	3,64	0,51	11,00	1,33	0,10	4,00

Tabelle 8: Mittelwerte, \pm Standardfehler (SEM) und Gruppengröße (N) von F/F₀ im Genotypvergleich. Hierbei wurde der Kontrollzeitpunkt (Ctrl) den gemittelten Werten bei Ryanodin-Superfusion (Rya) gegenüber gestellt.

4. Diskussion

In den letzten Jahren konnten diverse Arrhythmie-Formen wie beispielsweise das Long-QT-Syndrom, das Bradykardie-Tachykardie-Syndrom und andere Überleitungsstörungen auf sinoatrialer und auf atrioventrikulärer Ebene mit familiären Mutationen im HCN4-Ionenkanal-Gen in Verbindung gebracht werden (Baruscotti et al., 2010; Milanesi et al., 2006; Park & Fishman, 2011). Die resultierenden "loss of function"-Mutationen ziehen eine Verringerung der It-Stromdichte nach sich und münden in einem klinisch vielseitigen Herzrhythmusstörungen und Bild bradykarden anderen kardiovaskulären von Auffälligkeiten (Baruscotti et al., 2010; Milanesi et al., 2006). Damit rückt die Aufklärung der Kompensationsmechanismen kardialer Automatie ins Wichtigkeitsfeld klinischer und biomedizinischer Forschung. In der vorliegenden Studie wurde der Fokus auf ein integratives Modell vom Zusammenspiel der bereits etablierten Schrittmacher-Theorien gelegt, in welchem sowohl die ionalen als auch Ca²⁺-abhängigen Mechanismen zur Automatie beitragen und einander unterstützend zum Einsatz kommen (Lakatta et al., 2010; Maltsev & Lakatta, 2009, 2012).

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Dieses von mehreren Autoren postulierte Zusammenspiel der am Membranpotential beteiligten Ionenströme und der Ca²⁺-Signalwege innerhalb der Zelle ist im vorliegenden Studiendesign gezielt beeinträchtigt worden. Durch die beiden Mutationen im HCN4-Ionenkanal-Gen ist in jenen Zelllinien auf jeweils unterschiedliche Weise einer der wichtigsten Mechanismen der sogenannten "Membran-Uhr" zur Generierung der zellulären Automatie ausgeschaltet. Welche Auswirkungen haben diese Mutationen auf die Ca²⁺-Dynamiken der Zellen und welche Schlussfolgerungen lassen sich dadurch bezüglich der zellulären Automatie ziehen?

Das vorliegende Ergebnismaterial aus den durchgeführten Versuchen zur Ausprägung und Stabilität des Ca²⁺-Zyklus in Schrittmacherzellen der drei untersuchten Genotypen lässt sich folgendermaßen zusammenfassen:

- Die Zellen des Wildtyps und der mutierten Genotypen zeigten zu allen Versuchszeitpunkten stabile Ca²⁺-Transienten. Nach der Superfusion mit Ryanodin deutete sich eine Verminderung ihrer Frequenz an, wenngleich nur als tendenzielle Entwicklung. Die geringe Gruppengröße wirkte sich dabei als limitierender Faktor aus. Im Unterschied hierzu war bei den Zellen der mutierten Genotypen keine solche Abnahme der Transienten-Frequenz nach Ryanodin-Gabe nachzuweisen.
- 2. Es fanden sich signifikante Unterschiede der zeitlichen Parameter zwischen den drei Genotypen.

A) Nach Beginn der Ryanodin-Superfusion war die Zeit bis zum Aufstrich in den hHCN4-AYA-Zellen und -CNBD-Zellen signifikant kürzer als in den Wildtypzellen, wobei der Unterschied bei den hHCN4-AYA-Zellen größer war.
B) Die Halbwertsbreite war zum Kontrollzeitpunkt und im Verlauf der Ryanodin-Superfusion signifikant kürzer in den mutierten Zellen als im Wildtyp. Im Wildtyp deutete sich eine tendenzielle Verlängerung der Halbwertsbreite nach Beginn der Ryanodin-Superfusion an. Auch hier manifestierte sich der Unterschied in den hHCN4-AYA-Zellen deutlicher.

3. Es fanden sich in den hHCN4-AYA-Zellen signifikant größere Werte für die Signalintensität der Transienten (F/F₀) als im Wildtyp und in der hHCN4-CNBD-Mutante. Diese zeigten sich zum Kontrollzeitpunkt und nach Beginn der Ryanodin-Superfusion, während sich die Werte im zeitlichen Verlauf der Ryanodin-Superfusion dem Niveau der anderen Genotypen annäherten. Die Signalintensität im Wildtyp und in der hHCN4-CNBD-Mutante verblieb während des gesamten Versuchszeitraums auf einem Niveau.

Im Folgenden sollen die möglichen Ursachen der Befunde diskutiert und in Zusammenhang mit den etablierten Modellen zur Schrittmachertätigkeit gesetzt werden. Drei wichtige Limitationen der Arbeit müssen hierbei berücksichtigt werden:

- Die geringe Gruppengröße, die sich vor allem auf die Gruppe der Wildtypzellen (N=3-5) bezieht. Hierdurch wird die Aussagekraft der statistischen Ergebnisse eingeschränkt. Dieses wurde in den relevanten einzelnen Abschnitten der Diskussion stets kenntlich gemacht.
- Die Temperatur, unter denen die Experimente stattgefunden haben. Alle Versuche wurden bei einer Raumtemperatur von 22-24°C durchgeführt, welche nicht der physiologischen Körpertemperatur von Mäusen entspricht. Bekanntermaßen nimmt die Temperatur Einfluss auf viele Zellfunktionen, wie z.B. enzymatische Prozesse.
- 3. Die Herauslösung der Sinusknotenzellen aus ihrem physiologischen Zellverbund. Dadurch fehlen wichtige integrative Strukturen in der intra- und interzellulären Kommunikation, die im Herzen u.a. durch Gap junctions oder Connexine vermittelt wird. Hierüber werden viele Zellfunktionen sowie die Reizweiterleitung gesteuert.

4.2. Transienten-Frequenz

4.2.1. Autonome Regulation zellulärer Schrittmachermechanismen

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Frequenz der Transienten zwischen den drei Genotypen zum Kontrollzeitpunkt unter ß-adrenerger Stimulation mit 2nM Isoprenalin. Diese Dosierung zum Kontrollzeitpunkt wurde gewählt, um eine submaximale sympathische Stimulation der diskutierten Schrittmachermechanismen zu simulieren. Im Vorfeld hatte gezeigt werden können, dass die Zellen der hHCN4-CNBD-Mutante im Unterschied zum Wildtyp in unstimuliertem Zustand nur intermittierende Aktionspotentiale generieren. Ebenso war die Rate an komplett inaktiven Zellen erheblich erhöht und damit die Schrittmachertätigkeit stark eingeschränkt (Alig et al., 2009). Durch die sympathische Stimulation konnte dieses Problem umgangen und gleichzeitig das Antwortverhalten der drei Genotypen in aktiviertem Zustand miteinander verglichen werden.

Der nun unter sympathischer Stimulation erhobene Befund könnte darauf verweisen, dass die I_f-Kanal-Mutationen keine Auswirkungen auf die Ca²⁺-Transienten-Häufigkeit haben,

sodass diese in hHCN4-defizienten Zellen immer noch konstant häufig auftreten und ihren Beitrag zur Generierung eines Aktionspotentials leisten. So rückt die Ca²⁺-Zyklus zentrierte Schrittmachertheorie die Rolle der lokalen rhythmischen Ca²⁺-Freisetzungen gemeinsam mit den Ca²⁺-Transienten als maßgeblich für die zelluläre Automatie in den Vordergrund (Lakatta et al., 2008). Darüber hinaus konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass die periodisch stattfindenden, submembranös lokalisierten Ca²⁺-Freisetzungen aus dem SR nicht von Änderungen des Membranpotentials abhängen und durch die Akzeleration der späten Phase der Diastolischen Depolarisierung Einfluss auf die AP-Frequenz der Schrittmacherzellen und damit auf die Herzfrequenz im lebenden Organismus nehmen (Vinogradova et al., 2004). Demnach würde auch die Ausschaltung der Membran-Uhr keinen entscheidenden Einfluss auf den Ca²⁺-Zyklus haben müssen.



Abbildung 31: Zwischen der Membran-Uhr sowie der Ca²⁺-Uhr vermittelnde Faktoren, modifiziert nach Maltsev & Lakatta, 2009.

PLB: Phospholamban. **RyR:** Ryanodin-Rezeptoren. **CaMKII:** Ca²⁺/Calmodulinabhängige Proteinkinase II. **I**_{Ca,L}: Über L-Typ- Ca²⁺-Kanäle vermittelter Ca²⁺-Strom. **I**_{Ca,T}: Über T-Typ- Ca²⁺ -Kanäle vermittelter Ca²⁺-Strom. **I**_{NCX}: Na⁺/Ca²⁺-Austauscherstrom. **I**_F: "Funny Current". Elektrophysiologische Studien zur hHCN4-CNBD-Mutante weisen bereits auf die relative Stabilität der Schrittmachertätigkeit der mutierten Zellen trotz Ausfall der cAMPabhängigen Stimulierung des HCN-Kanals hin (Alig et al., 2009). Auch wurde die Wichtigkeit des HCN4-Kanals für die Herzfrequenz-Steigerung infrage gestellt (Herrmann et al., 2007b). Für diese relative Stabilität sowie die Frequenz-Adaptation ist zumindest ein Backup-Mechanismus im Falle der Ausschaltung der Membran-Uhr nötig, der die Schrittmacherfunktion gewährleisten kann und vor allem auch der autonomen Regulation zugänglich ist (Maltsev & Lakatta, 2008). Die Ca²⁺-Uhr und die gemeinsam mit der Membran-Uhr genutzten Signalkaskaden über das vegetative Nervensystem sind hierbei ideale Interaktionspartner.

Damit wäre als Alternativhypothese aber ebenfalls denkbar, dass die experimentelle Nachahmung submaximaler ß-adrenerger Stimulation einen Unterschied zwischen dem Wildtyp und den hHCN4-defizienten Zellen zunichtemacht, da eine sympathische Stimulierung sowohl auf die Membran- als auch auf die Ca²⁺-Uhr Einfluss nimmt. Die cAMP-vermittelten und über die PKA weitergeleiteten Stimulationsmechanismen wären dabei in der Lage, die unter physiologischen Bedingungen stattfindenden Ca²⁺-Dynamiken auch in den mutierten Zellen zu vermitteln. In der Tat übt die autonome Stimulierung über die PKA getragene Phosphorylierung des mit dem RyR assoziierten Proteins FKBP12.6 ihren Zugriff auf den Ca²⁺-Zyklus aus. Dieser Zugriff spiegelt sich in der Aktivitätssteigerung der RyR. Diese hat im Endeffekt zur Folge, dass der Ca²⁺-Ausstrom aus dem SR stabilisiert wird (Marx et al., 2000). Beide aufgeführten Thesen sind mögliche Erklärungen für den experimentellen Befund. Zur differenzierten Untermauerung der jeweiligen Theorie sind allerdings weitere Studien über das Ca²⁺-Signalverhalten der Schrittmacherzellen in unstimuliertem Zustand nötig. Dennoch lässt sich zu diesem Zeitpunkt schlussfolgern, dass die Membran-Uhr nicht als alleiniges Erklärungsmodell für die Automatie der Sinusknotenzellen ausreichen kann und es rücken die Gemeinsamkeiten beider Modelle in den Vordergrund.

Hierbei sind die oben erwähnten, zwischen ihnen vermittelnden Signalwege von Bedeutung, die gleichzeitig auch die Regulation ihrer Aktivität betreffen. Abbildung 31 zeigt eine schematische Darstellung der verschiedenen Zugriffspunkte für das vegetative Nervensystem. Genau diese Zugriffspunkte und Schnittstellen zwischen den Ionenströmen der Plasmamembran und den intrazellulären enzymatischen Prozessen sind für die detaillierte Aufklärung der Schrittmachermechanismen hoch interessant, denn das autonome Nervensystem ist über komplexe zelluläre Mechanismen in die Regulation der Herzfrequenz eingebunden. Schon die ausgedehnte Innervation des kardialen Gewebes über Nervenfasern des Sympathikus und Parasympathikus führt die Wichtigkeit der vagalen und sympathischen Kontrolle der Herzaktion vor Augen, genauso wie die Einbindung vasaler und zentraler Regulationspunkte (Batulevicius et al., 2003; Beaumont et al., 2013; Shen et al., 2011).

Neben der cAMP-Abhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit des HCN4-Ionenkanals (DiFrancesco, 1993) und der cAMP- und Ca²⁺-abhängigen Regulierung von Phospholamban (Maltsev & Lakatta, 2010, Sirenko et al., 2013) konnten eine autonome Regulation des $I_{Ca,L}$ –Stroms (Mangoni et al., 2003; Petit-Jaques et al., 1993) sowie eine autonom getriggerte Phosphorylierung von RyR (Lyashkov et al., 2009; Sirenko et al., 2013) nachgewiesen werden. Die Bedeutung dieser Regulation für die adäquate und vor allem schnelle Anpassung an die verschiedensten Anforderungen der Umwelt ist für den gesamten Organismus herausragend. Die sympathische und vagale Stimulierung bzw. Inhibierung nimmt G-Protein-Rezeptor vermittelten Einfluss auf die elektrische Aktivität der Schrittmacherzellen (Maltsev & Lakatta, 2010). Hierdurch entstehen Synergismen, die für die Zelle viele Vorteile beinhalten. Die gemeinsamen Signalkaskaden ermöglichen eine exakte Feineinstellung der für die Herzfrequenz-Adaptation verantwortlichen Interakteure und erlauben damit eine Flexibilität, die für ein Flucht- oder Kampfverhalten vonnöten ist.

cAMP und die PKA sind dabei im Zentrum stehenden Faktoren, die über Bindung und Phosphorylierung die Aktivität vieler Enzyme hoch bzw. herunter regulieren. Der Füllungszustand des SR wird beispielsweise über Phospholamban kontrolliert und beeinflusst dann die LCR-Charakteristiken, die wie oben erwähnt Einfluss auf die Phase der Diastolischen Depolarisierung nehmen (Maltsev et al., 2004; Vinogradova et al., 2004). Zugriffspunkt hierbei ist u.a. die Ionenpumpe SERCA (Vinogradova et al., 2010). Die Aktivität von Phospholamban wird, wie in **Abbildung 32** dargestellt, durch die PKA und CaMKII reguliert (Sirenko et al., 2013). Eine über ß-adrenerge Stimulation vermittelte Steigerung der Enzym-Phosphorylierung führt zu dessen Inhibierung und macht den Weg für frühere, höher frequente und größere diastolische Ca²⁺-Freisetzungen frei. Damit trägt es zur einer verstärkten Aktivität des Ca²⁺-Zyklus' bei (MacLennan & Kranias, 2003; Maltsev & Lakatta, 2010). Eine nach diesem Muster getragene Aktivierung des Ca²⁺-Zyklus' ist somit sowohl in den Wildtyp- als auch in den mutierten Zellen sehr wahrscheinlich.



Abbildung 32: Wege der autonomen Regulation in der Schrittmacherzelle modifiziert nach Mangoni & Nargeot, 2008.

Die Bindung von Transmittern des vegetativen Nervensystems (Noradrenalin (NA), Acetylcholin (ACh), Adenosin (Ado)) an die Membranrezptoren (β_1 -Adrenorezeptor (β_1 -AR), Muscarinerger Rezeptor (M_2) , Adenosin-Rezeptor (A_1)) erwirkt G-Protein-vermittelt die Stimulierung/Inhibierung der Adenylatcyclase (AC)und damit die verstärkte/verminderte Synthese von cAMP. Die direkte cAMP-Bindung an den HCN-Kanal steigert dessen Offenwahrscheinlichkeit (s.o.). Ebenfalls kommt es zur Stimulierung der Proteinkinase A (PKA). Diese phosphoryliert Phospholambam (PLB), den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal (Ca_v1.3), den I_{St}-Kanal und Ryanodin-Rezeptoren (**RyR**), was zur Stimulierung des Schrittmacherzyklus führt. Acetylcholin und Adenosin teilen sich dieselben Signalwege. Neben der indirekten Runterregulierung des cAMP-Spiegels (hier durch (...) markiert) kommt es zu einer G-Protein-vermittelten Aktivierung des Kir3.1/3.4 (GIRK1/4) Kanals, worüber ebenfalls eine Verlangsamung des Schrittmacherzyklus erfolgt (für Details siehe Mangoni & Nargeot, 2008).

Immer wieder springt die Vielseitigkeit der eingebundenen Mechanismen ins Auge: Zwar wurde die Erforschung des parasympathischen Schenkels der vegetativen Regulation in dem vorliegenden Studiendesign ausgespart, jedoch ist diese für den Gesamtkontext der Aufklärungsarbeit der kardialen Automatie von enormer Bedeutung. Wie weiter oben erwähnt, wird die muscarinerge Einflussnahme auf die in die Schrittmachertätigkeit eingebundenen Interakteure über G-Protein-Rezeptoren vermittelt und von Acetylcholin getragen. Ziele dieser Einflussnahme sind neben den HCN- und L-Typ-Ca²⁺-Kanälen auch die RyR und der Ionenstrom IKAch (DiFrancesco, 2010; Petit-Jacques et al., 1993). So konnte beispielsweise in Zusammenarbeit mit der Montpellier-Gruppe eine zusätzliche Funktion des Ionenstroms IKAch für die parasympathische Regulation der Herzfrequenz entdeckt werden. Mit der Implementierung eines Knockouts der für die Kanalfunktion essentiellen Untereinheit Girk4 wurde ein kompletter Verlust des IKAch erreicht. Dieser alternierte die cholinerge Regulation der Schrittmacheraktivität sowohl in isolierten Sinusknotenzellen und in isolierten intakten Herzen, als auch in den von dem Knockout betroffenen, sich frei bewegenden Mäusen. Hierbei war das relative Ausmaß der Herzfrequenz-Regulation zwar dem des Wildtyps ähnlich, jedoch zeigte sich die Erholungsphase der Herzfrequenz nach Stress, physischer Aktivität oder pharmakologisch induzierter ß-adrenerger Stimulation signifikant verlängert (Mesirca et al., 2013).

Damit sind die Komplexität der autonomen Regulation und ihre Wichtigkeit für die physiologische Aufrechterhaltung des vom kardiovaskulären Kreislauf abhängigen Stoffwechsels offensichtlich und es wird gleichzeitig deutlich, dass **Abbildung 32** nur als Anriss eines Schaubilds dienen kann, für dessen Komplettierung weitere Forschung nötig ist.

4.2.2. Der Einfluss von Ryanodin – Hochregulation anderer Interakteure oder Verlust der Ryanodin-Wirkung?

Für die fünf Versuchszeitpunkte nach Entwicklung nach Beginn der Ryanodin-Superfusion zeigte sich eine ähnliche Häufigkeit der Transienten in allen drei untersuchten Genotypen. Der Theorie folgend, sollte eine maximale Stimulation mit Ryanodin über eine Zeitspanne von fünf Minuten die Ca²⁺-Konzentration innerhalb der kardialen Zelle jedoch vollkommen depletieren und somit den physiologischen Ca²⁺-Zyklus behindern (Zucchi & Ronca-Testoni, 1997). Gleichzeitig hat eine Ryanodin-Applikation eine Abnahme der Amplitude und Frequenz der sinoatrialen Aktionspotentiale zur Folge, was die Einbindung der RyR in die Schrittmachertätigkeit der Zellen nahelegt (Rigg et al., 2000).

Tendenziell konnte die Ca²⁺-Depletion in den Wildtypzellen – hier visualisiert durch eine verringerte Transienten-Frequenz – auch reproduziert werden. So zeigte sich eine deutliche Abnahme von 11,00 \pm 3,26 auf 3,88 \pm 1,79 Transienten pro Linescan. Limitierend für das Ergebnis wirkte sich in diesem Fall lediglich die Gruppengröße des Wildtyps (n=5) aus. Interessanterweise ergab sich in den hHCN4-AYA- und hHCN4-CNBD-Zellen keine solche Tendenz, es zeigte sich sogar eine Zunahme. Es ist zu vermuten, dass in ihnen durch die Beeinträchtigung der Membranstrom abhängigen Schrittmachermechanismen das stabile Rückgrat aus den Ca²⁺-Dynamiken eine größere Rolle spielt als in den Wildtypzellen.

Reagieren die Sinusknotenzellen der mutierten Genotypen also weniger sensibel auf die Manipulation mit Rynaodin? Oder ist die Aktivität anderer in den Ca²⁺-Zyklus eingebundenen Interakteure kompensatorisch hochreguliert?

So könnten beispielsweise der Ca²⁺-Einstrom über die in der Zellmembran lokalisierten L-Typ-Ca²⁺-Kanäle sowie die Aktivität der Ca²⁺-Pumpe SERCA erhöht sein, was der intrazellulären Ca²⁺-Depletierung entgegenwirken und eine konstante Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR ermöglichen würde. Die Wichtigkeit des Ca²⁺-Einstroms über L-Typ-Ca²⁺-Kanäle im Schrittmacherzyklus ist bereits sowohl für die Phase der Diastolischen Depolarisierung als auch für die Frequenzregulierung bekannt. Dabei ist es durchaus plausibel, dass zelluläre Signale wie z.B. eine sinkende Ca²⁺-Konzentration kurzfristig eine Aktivitätssteigerung des Kanals bewirken könnten (Mangoni et al., 2003; Mangoni & Nargeot, 2008; van der Heyden et al., 2005). Auch spricht die räumliche Nähe durch Co-Lokalisierung der L-Typ-Ca²⁺-Kanäle (Ca_v1.3) mit den RyR für eine Interaktion zwischen diesen beiden Ca²⁺-Wegen (Christel et al., 2012). Bei dieser Zusammenarbeit könnten junktionale Proteine wie Sorcin eine wichtige Funktion ausüben. Dieses ermöglicht eine zwischen den RyR und L-Typ-Ca²⁺-Kanälen stattfindende Kommunikation und ist in die Regulation der intrazellulären Ca²⁺. Mobilisierung eingebunden (Meyers et al., 1998; Striessnig, 1999): Während Sorcin an den C-Terminus der L-Typ-Ca²⁺-Kanäle bindet und in die Ca²⁺-abhängige Inaktivierung des Kanals eingreift, senkt es zudem die Offenwahrscheinlichkeit des RyR. Dieser Zugriff wird wiederum durch eine PKA-vermittelte Phosphorylierung verhindert, was einmal mehr die gemeinsamen Regulationsmechanismen vor Augen führt (Meyers et al., 2003). Zudem könnte in den mutierten Genotypen der Crosstalk zwischen dem SR und den als Ca²⁺-Puffer fungierenden Mitochondrien der Zellen verändert sein, wodurch es zu einem gleichbleibenden Ca²⁺-Ausstrom aus den Mitochondrien kommen könnte. Damit stünde intrazelluläres Ca²⁺ für die erneute Ladung des SR zur Verfügung und die Kontinuität der Ca²⁺-Transienten wäre gesichert (Yaniv et al., 2012).

In diesem Rahmen sind nur einige der denkbar möglichen Kompensationsstrategien genannt. Zum genaueren Verständnis wäre es spannend, das detaillierte genetische Expressionsmuster der in den hHCN4-defizienten Zellen vorhandenen Proteine und Ionenkanäle zu untersuchen und mit dem Wildtyp zu vergleichen. Weiterführende Versuche sind also unabkömmlich.
4.3. Morphologie der Transienten

In der Analyse der Morphologie der Ca²⁺-Transienten konzentrierten wir uns auf drei Parameter, die sowohl die Dauer der Transienten als auch die maximale Signalstärke des Fluoreszenzsignals als Surrogat für die maximale Ca²⁺-Konzentration in den Blickwinkel nahmen.

4.3.1. Zeitliche Parameter

Bei der Betrachtung aller einzelnen Versuchszeitpunkte waren sowohl die Zeit bis zum Aufstrich als auch die Halbwertsbreite zum Kontrollzeitpunkt in allen drei Genotypen gleich lang. Allerdings ergab sich bei der Zusammenfassung der Versuchszeitpunkte unter Ryanodin-Superfusion zu einer Versuchsentität zum Kontrollzeitpunkt eine signifikant kürzere Halbwertsbreite in den Transienten der hHCN4-AYA-Zelllinie als im Wildtyp. Dieser Unterschied im Ergebnis der beiden Betrachtungen verweist auf die im ersten Fall geringere Gruppengröße.

Signifikante Unterschiede ergaben sich ebenfalls in beiden Parametern im Vergleich der mutierten Genotypen mit jeweils dem Wildtyp nach Beginn der Ryanodin-Superfusion. Die Zeit bis zum Aufstrich dauerte in der hHCN4-AYA-Mutante zu den Zeitpunkten 3,4 und 5 und in der hHCN4-CNBD-Mutante zum Zeitpunkt 5 signifikant kürzer als im Wildtyp. Die Halbwertsbreite war zu den Versuchszeitpunkten 2,3,4 und 5 in den hHCN4-AYA- und zu den Zeitpunkten 4 und 5 in den hHCN4-CNBD-Zellen ebenfalls signifikant kürzer als im Wildtyp. Dies ist für den Versuchsablauf ein konsistentes Ergebnis, da es sich bei beiden Werten um zeitliche Parameter handelt. Im Wildtyp kann eine tendenzielle Verlängerung beider Zeiten durch die Ryanodin-Superfusion vermutet werden, die sich bei längerem Beobachtungszeitraum und erweiterter Gruppengröße signifikant abbilden würde.

Für den Wildtyp ergaben sich leider keine signifikanten Unterschiede, was auf die geringe Gruppengröße zurückzuführen ist. Es können dennoch tendenzielle Entwicklungen beobachtet werden. Gründe für die mutmaßliche Verlängerung beider Zeiten stützen sich auf die gängige Theorie zur Wirkung von Ryanodin am SR und veranschaulichen die pharmakologische Wirkung von Ryanodin im Ca²⁺-Zyklus. Diese soll an dieser Stelle ausführlicher beleuchtet werden.

Wie in der Einleitung bereits angedeutet, ist das pflanzliche Alkaloid Ryanodin namensgebend für die sogenannten RyR, die sich in der Membran des SR befinden. Als Ionenkanäle vermitteln sie den Ca²⁺-Ausstrom aus den intrazellulären Ca²⁺-Speichern und sind damit in den komplexen Ablauf der intrazellulären Ca²⁺-Dynamiken fest eingebunden. Diese spielen in den unterschiedlichsten Zellen und Geweben von Wirbeltieren eine immense Rolle und tragen zur Aufrechterhaltung der physiologische Zellfunktion bei (Sutko & Airey, 1996). Es gibt mehrere Isoformen des Kanals, von denen RyR2 im kardialen SR vorherrscht. Die Kanäle sind tetramerisch organisiert und bestehen aus vier Typ2 RyR-Polypeptiden, sowie vier Bindungsproteinen namens FKBP 12.6. Diese Bindungsproteine nehmen wie oben beschrieben über eine PKA-abhängige Phosphorylierung in der Modulation der Kanalaktivität einen wichtigen Platz ein. Die Phosphorylierung führt zu einer Dissoziierung des Proteins vom RyR-Kanalkomplex und primär zu einer erhöhten Sensitivität des Kanals für Ca²⁺, was wiederum die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals steigert und einen vermehrten Ca²⁺-Ausstrom aus dem SR bewirkt (Marx et al., 2000).

RyR sind selektive Kanäle, die sowohl für mono- als auch für divalente Kationen permeabel und durch verschiedene Substanzen in ihrer Aktivität, Leitfähigkeit und Offenwahrscheinlichkeit modulierbar sind (Rousseau et al., 1987; Tinker & Williams, 1992). So üben Ca²⁺, ATP, Coffein und Ryanodin einen aktivierenden Einfluss auf sie aus. Mg⁺ und Ruthenium-Rot hingegen reduzieren sowohl ihre Offenwahrscheinlichkeit als auch ihre Stromamplitude (Lindsay et al., 1991; Rousseau & Meissner, 1989). In Skelettund Herzmuskelzellen dienen die RyR als Hauptquelle für das in der Elektromechanischen Kopplung (EMK) benötigte Ca²⁺. Gleichzeitig ist Ca²⁺ hierbei ein physiologischer Ligand des Kanals: Hohe intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationen führen zur Inaktivierung des Kanals, während niedrige Konzentrationen zur Aktivierung beitragen (Sitsapesan & Williams, 1990; Marx et al., 2000).

Durch Ryanodin können die RyR manipuliert werden. Das Alkaloid bindet mit einer extrem hohen Affinität und hochspezifisch an den Kanal und hat unterschiedliche Effekte auf die Ca²⁺-Ausschüttung. Wichtig hierbei sind die Charakteristika der verschiedenen Zelltypen und Gewebe in ihrem Umgang mit dem anfallenden Ca²⁺. Während in Skelettmuskelzellen ein positiv inotroper Effekt des vermehrt freigesetzten Ca²⁺ auf die

Kontraktionen der Zellen ausgeht und Ryanodin die Kanäle in einem geöffneten Zustand stabilisiert, findet sich in kardialen Zellen ein negativ inotroper Effekt, der aus einer langfristigen Ca²⁺-Depletion der intrazellulären Ca²⁺-Speicher resultiert. Entscheidend für diesen Unterschied ist der kardiale Na⁺-/Ca²⁺-Austauscher (NCX), der das intrazellulär anfallende Ca²⁺ nach extrazellulär transportiert (Levesque et al., 1994). Durch die Bindung von Ryanodin an die RyR werden diese wie auch in Skelettmuskelzellen in einen geöffneten Zustand versetzt, wodurch Ca²⁺ aus dem SR in den intrazellulären Raum fließt. Doch im Gegensatz zum Skelettmuskel verbleibt das Ca²⁺ nicht intrazellulär und steht damit auch nicht weiter für Kontraktionen zur Verfügung. Vielmehr wird es vom NCX nach extrazellulär transportiert und es erfolgt eine langfristige Leerung der Ca²⁺-Speicher (Rousseau & Meissner, 1989; Rousseau et al., 1987). Diese Hintergrundinformationen zu den RyR und der Pharmakologie von Ryanodin führen die funktionelle Diversität der vielseitigen zellulären Mechanismen vor Augen und eröffnen damit neue Denk- und Forschungsansätze:

Für die Wildtypzellen könnte gemutmaßt werden, dass die bereits beschriebene Abnahme der Transienten-Frequenz nach Ryanodin-Superfusion mit einer leichten Verlängerung der Transienten-Dauer einhergeht. Diese Korrelation beider Parameter würde darauf hinweisen, dass der interne Ca²⁺-Zyklus der Zellen durch die Ryanodin-Wirkung im Wildtyp insgesamt beeinträchtigt ist. Hierdurch sind die anderen beteiligten Mechanismen wie beispielsweise die Ionenpumpe SERCA und der Na⁺-/Ca²⁺-Austauscher NCX aufgrund der lecken RyR im SR nicht mehr dazu in der Lage, die Ca²⁺-Konzentration in der Zelle in gleichbleibender Geschwindigkeit zu senken. Dadurch verbleibt das aus dem SR ausströmende Ca²⁺ länger im subsarcolemmalen Kompartiment, wodurch auch die vorübergehende Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration in Form der Ca²⁺-Transienten länger sichtbar ist.

Aus den Versuchen lässt sich weiterhin mit hoher Wahrscheinlichkeit schließen, dass die zeitliche Dimension der Ca²⁺-Transienten in den mutierten Genotypen durch die Ryanodin-Superfusion gar nicht beeinflusst wird. Diese zeigen sich sowohl in der Dauer bis zur maximalen Signalstärke als auch in ihrer gesamten Dauer im Vergleich zum Wildtyp konsistent reduziert und befinden sich zu allen sechs Versuchszeitpunkten auf demselben Niveau. Warum sind die Ca²⁺-Transienten der mutierten Zellen zu allen Versuchszeitpunkten kürzer als die des Wildtyps? Das Ergebnis verweist auf den kürzeren Verbleib des Ca²⁺ im subsarcolemmalen Kompartiment und damit auf einen effektiveren

Umgang des Ca²⁺-Zyklus mit dem anfallenden Ca²⁺. Diese fehlende Wirkung der Ryanodin-Superfusion auf die zeitliche Ausprägung der Transienten im Vergleich zum Wildtyp ist durch dieselbe kompensatorische Hochregulation anderer in den Ca²⁺-Zyklus eingebundenen Mechanismen erklärbar, die schon die Konstanz der Transienten-Frequenz veranschaulichen könnte. In den mutierten Genotypen lässt sich ein zwar morphologisch veränderter, dabei dennoch stabiler und für Ryanodin-Manipulation weniger zugänglicher Ca²⁺-Zyklus erkennen. Es liegt nahe zu postulieren, dass das Ausschalten der Membran-Uhr in den Schrittmacherzellen eine generelle Hab-Acht-Stellung der in den Ca²⁺-Zyklus eingeschalteten Mechanismen evoziert. Verbindungen zwischen den einzelnen Partnern gibt es zumindest in vielfältiger Ausprägung.

Weiterhin ist die in Abschnitt 4.1.1. aufgeworfene Frage nach einer herabgesetzten Sensibilität der RyR für Ryanodin nicht weniger beachtenswert. Neben neun Isoformen des Kanals sind außerdem unterschiedliche Splice-Varianten des RyR in den Zellen und Geweben von Wirbeltieren möglich. Hinzu kommt eine ganze Bandbreite unterschiedlicher Isoformen der eingebundenen Proteine, die u.a. auf die Freisetzung, Bindung, Komplexbildung und Speicherung von Ca²⁺ spezialisiert sind. Damit eröffnet sich ein hochkompliziertes Feld der oben angedeuteten funktionellen Diversität der in den Ca²⁺-Stoffwechsel der Zellen eingebundenen Interakteure, die sich z.B. durch eine unterschiedliche Reaktion auf die RyR-Modulatoren auszeichnen können (Sutko & Airey, 1996). So wird beispielsweise von einer Koexpression von RyR1 Splice-Varianten und der RyR2-Isoform in kardialen Zellen berichtet (Futatsugi et al., 1995), genauso wie von einer alternierten Wirkung von Ryanodin an bestimmten RyR-Isoformen (Herrmann-Frank et al., 1991). Auch wirken sich familiäre Mutationen im RyR2-Gen, genauso wie im für Calsequestrin kodierenden Gen CASQ2 arrhythmogen auf die Sinusknotenfunktion aus. Missens-Mutationen in den beiden Genen führen beispielsweise zum katecholaminergen polymorphen ventrikulären Tachykardie-Syndrom. Hierbei wird eine veränderte Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR induziert, wodurch es zu Nachdepolarisierungen kommt. Calsequestrin bildet im Normalfall mit den RyR Komplexe und speichert dabei das Ca²⁺ im SR (Park & Fishman, 2011).

Zudem kann die topische Organisation der RyR im SR wichtige Auswirkungen auf die ausgeübte Funktion der Ca²⁺-Freisetzung haben (Bogdanov et al., 2001). So gibt es Hinweise für mindestens zwei unterschiedliche Regionen der RyR2-Isoform, einmal im junktionalen und weiter im corbularen SR. Diese könnten wiederum zwei unterschiedliche

Ca²⁺-Freisetzungswege ermöglichen. Dabei sind die RyR im junktionalen SR mit Dihydropyridin-Rezeptoren (L-Typ-Ca²⁺-Kanäle) ko- und in NCX-Nähe lokalisiert (Christel et al., 2012; Jorgensen et al., 1993).

Es ist somit durchaus denkbar, dass in den mutierten Zellen andere Verhältnisse herrschen als in den Wildtypzellen. Diese möglichen Unterschiede können sich zusammenfassend sowohl auf die Lokalisation, das genetische Expressionsmuster und die RyR-Splice-Varianten als auch auf die Integration der RyR und der assoziierten Proteine in die Membran des SR sowie die Plasmamembran, und noch weiter auf die Komplexbildung innerhalb des SR beziehen. Außerdem bieten viele weitere Verknüpfungsstellen innerhalb der Zelle Möglichkeiten für eine alternierte Funktion der Ca²⁺-Transienten. Zur weiteren detaillierten Beschreibung ist eine intensive Erforschung dieser unterschiedlichsten Ebenen von hoher Relevanz.

4.3.2. F/F_0

Bei der Analyse von F/F₀ rücken folgende Befunde in den Vordergrund: Die hHCN4-AYA-Zelllinie zeigte signifikant höhere Werte als die Wildtypzellen und die hHCN4-CNBD-Zellen, während sich die Werte der Wildtypzellen und die der hHCN4-CNBD-Zellen auf demselben Niveau befanden. Hierbei muss weiterhin differenziert werden zwischen einerseits der Analyse des Gesamtzeitraums über alle sechs Versuchszeitpunkte und andererseits der Gegenüberstellung des Kontrollzeitpunkts zur Versuchsentität "Ryanodin-Superfusion".

Im ersten Fall ergaben sich nämlich sowohl zum Kontrollzeitpunkt als auch zum Versuchszeitpunkt 1 für F/F_0 höhere Werte für die hHCN4-AYA-Zellen im Vergleich zur hHCN4-CNBD-Zellinie. Ab Zeitpunkt 2 bis hin zum Ende des Versuchs näherten sich die Werte dem Niveau der hHCN4-CNBD-Mutante wieder an. Es liegt nahe zu vermuten, dass die geringe Gruppengröße der Wildtypzellen (N=3) einen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp- und hHCN4-AYA-Zellen verschleierte. In den Abbildungen im Ergebnisteil wird deutlich, dass die Werte der hHCN4-CNBD-Linie und der Wildtypzellen zu allen sechs Versuchszeitpunkten auf dem Ausgangsniveau verweilten. Im zweiten Fall zeigten sich für die hHCN4-AYA-Zellen im Vergleich zu beiden Vergleichsgruppen signifikant höhere Werte sowohl zum Kontrollzeitpunkt als auch unter Ryanodin-Superfusion.

Wie sind diese Befunde zu erklären?

Im Vergleich höhere Werte von F/F_0 zum Kontrollzeitpunkt und zu Beginn der Ryanodin-Superfusion sprechen für einen größeren Unterschied zwischen den Ausgangswerten F und F_0 . Dieser kann durch die folgenden drei Entwicklungen zustande kommen:

- Die maximale Signalstärke F ist größer. Hierbei stünde zum Höhepunkt des Transienten mehr Ca²⁺ im subsarcolemmalen Kompartiment bereit und müsste dann auch hieraus durch die Ca²⁺-Transporter wieder beseitigt werden.
- Die minimale Signalstärke F₀ nimmt ab. Dazu müsste die subsarcolemmale Ca²⁺-Konzentration zu Beginn der Transienten niedriger sein, was wiederum für eine effektiveren Umgang der Ca²⁺-Transporter mit dem während eines Transienten anfallenden Ca²⁺ spräche.

3. Es verändern sich beide Werte nach den oben genannten Dynamiken. Damit kämen beide Mechanismen zusammen.

In allen drei Fällen wäre in den hHCN4-AYA-Zellen mit einer verstärkten Arbeit der am Ca^{2+} -Zyklus beteiligten Strukturen zur Ca^{2+} -Bereitstellung sowie zur Ca^{2+} -Wiederausschleusung bzw. Ca^{2+} -Komplexbildung zu rechnen.

Der Vergleich mit dem Gendefekt G480R rückt die klinische Ausprägung einer der hHCN4-AYA-Zelllinie ähnlichen Mutation in den Mittelpunkt, denn beide befinden sich in der Porenregion des HCN4-Kanals. In **Abbildung 33** sind die bisher im Menschen identifizierten Mutationen des HCN4-Kanals abgebildet. Bei den humanen Genträgern findet sich bei der Mutation von G480R eine Missense-Mutation auf Porenebene, die die Synthese, den Transport der Untereinheiten in die Membran und die normale Kanalfunktion einschränkt (Nof et al., 2007). Klinisch zeigten sich die Patienten überraschenderweise kaum auffällig. Bis auf eine asymptomatische Bradykardie (<55bpm) können keine weiteren Symptome nachgewiesen werden (Baruscotti et al., 2010).

In Patchclamp-Experimenten mit koexprimierenden "Chinese hamster ovary"-Zellen zeigte sich jedoch der dominant-negative Effekt des mutierten Proteins auf die nativen kanalformierenden Untereinheiten HCN2 und HCN4, wodurch die Leitfähigkeit des Kanals in Mitleidenschaft gezogen ist (Nof et al., 2007). Die fehlende klinische Auffälligkeit der Genträger ließe sich u.a. mit der Effektivität des Backup-Mechanismus in Form der Ca2+-Uhr erklären. Für den Unterschied zur hHCN4-CNBD-Mutante lohnt ebenfalls ein Rückgriff auf die genetische Lokalisation und Ausprägung dieser Mutation. Initial wurde sie bei einer Patientin mit Sinusknotendysfunktion detektiert, die klinisch durch kardiale Rhythmusstörungen mit paroxysmalem Vorhofflimmern auffällig geworden war (Baruscotti et al., 2010). Die Mutation L573X in der CNBD-Domäne des HCN4-Kanals ist im Unterschied zu der oben genannten Mutation keine Punktmutation, sondern ergibt eine komplette Deletion der cAMP-Bindungsdomäne. Sie zieht eine fehlende Sensibilität sowohl der mutierten als auch der nativen Untereinheiten für ß-adrenerge Stimulation nach sich. Experimentell konnte diese Insensibilität für cAMP des If-Stroms reproduziert werden (Alig et al., 2009). Im Unterschied zur hHCN4-AYA-Mutation ist bei den hHCN4-CNBD-Zellen die Leitfähigkeit des Kanals nicht eingeschränkt. Er reagiert nur nicht auf ß-adrenerge Stimulation. Diese kann aber ähnlich wie im Wildtyp weiterhin über andere Signalwege an die zusätzlichen Mechanismen im Schrittmacherzyklus

weitergetragen und hier auch wirksam werden. Auffällig bei all dem ist, dass die hHCN4-CNBD-Mutation im Menschen zu schwereren klinischen Beeinträchtigungen führt als der der hHCN4-AYA-Mutation ähnlich lokalisierte Gendefekt G480R. Gleichzeitig erscheinen die Ca²⁺-Transienten der hHCN4-CNBD-Mutante im Vergleich zum Wildtyp weniger alterniert als die der hHCN4-AYA-Linie.



Abbildung 33: Mutationen im HCN4-Kanal modifiziert nach Baruscotti et al., 2010.

Bisher konnten vier verschiedene Mutationen im HCN4-Kanal-Gen des Menschen identifiziert werden (G480R, L573X, D553N, S672R). Alle gehen mit einer leichten bis schweren Sinusknotendysfunktion, leichter bis schwerer Bradykardie und ggf. weiteren klinischen Symptomen wie beispielsweise Synkopen, Herzrhythmusstörungen oder chronotroper Inkompetenz einher. Einige dieser Mutationen konnten erfolgreich in Tiermodelle bzw. in Zellkulturen implementiert werden und erlauben dadurch eine genauere Studie der Physiologie und Pathophysiologie des HCN4-Kanals.

All dies spricht vehement für eine starke und effiziente Einbindung der Ca²⁺-Mechanismen in den Schrittmacherzyklus der hHCN4-CNBD-Zellen; und für eine noch stärkere und noch effizientere Einbindung dieser in die Schrittmacheraktivität der hHCN4-AYA-Zellen.

Für die Wildtypzellen ist ein solch verstärktes Funktionieren des Ca²⁺-Zyklus nicht relevant, weil die Ca²⁺- und die Membran-Uhr uneingeschränkt zur Generierung der Automatie beitragen können. Für die hHCN4-CNBD-Zellen wird es schwierig, den Ausfall der ß-adrenergen Stimulierung der Membran-Uhr zu kompensieren, was sich in der ausgeprägten Symptomatik von der Mutation betroffener Patienten zeigt. In den hHCN4-AYA-Zellen ergibt sich mutmaßlich eine darüber hinaus zusätzlich verstärkte Arbeit, um den Schrittmacherzyklus überhaupt generieren zu können.

4.3.3. Zeitliche Entwicklung von F/F₀

Nach Superfusion der Zellen mit Ryanodin kommt es in den hHCN4-AYA-Zellen zur konsekutiven Abnahme des Ca²⁺-Signals und zur Annäherung des Signalniveaus an das der beiden anderen Genotypen. Damit wird in den hHCN4-AYA-Zellen der oben postulierten verstärkten Aktivität der Ca²⁺-Uhr entgegengewirkt. Hierbei ist zu schlussfolgern, dass Ryanodin seine Wirkung bezüglich der Ca²⁺-Signalintensität in den hHCN4-AYA-Zellen entfalten kann. Nach den oben genannten Überlegungen bedeutet dies, dass im Laufe der Ryanodin-Superfusion pro Freisetzungszyklus weniger Ca²⁺ aus dem SR freigesetzt wird. Dieses spricht für eine zumindest partielle Wirkung von Ryanodin an den RyR, die sich vom Wildtyp und von der hHCN4-CNBD-Mutante unterscheidet. Hierbei ist denkbar, dass dieser Unterschied durch die insgesamt bereits niedrige Ca²⁺-Signalintensität in den beiden Zelltypen zustande kommt. Demnach ist sie in diesen beiden Zelllinien schon auf einem so niedrigen Niveau, dass sie nicht weiter reduziert werden kann.

5. Zusammenfassung

Die Automatie des Sinusknotens ist ein hochkomplexes Phänomen, das durch verschiedene Mechanismen auf zellulärer und zellübergreifender Ebene ermöglicht wird (Mangoni & Nargeot, 2008). Die genaue Aufklärung der beteiligten Strukturen ist ein Schlüsselelement in der Grundlagenforschung. Gleichzeitig ist es von hoher klinischer Relevanz, u.a. für die Behandlung von Herzrhythmusstörungen (Baruscotti et al., 2010; Park & Fishman, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde von einem integrativen Zusammenspiel der Ionenkanäle der Plasmamembran mit den intrazellulären Ca²⁺-Signalen ausgegangen, das sich auf zwei kontrovers diskutierte Schrittmachermodelle stützte (Lakatta & DiFrancesco, 2009). Hierfür wurde das Membran-Uhr gestützte Modell durch zwei unterschiedliche Mutationen im hHCN4-Ionenkanal-Gen gezielt beeinträchtigt und die Auswirkungen der jeweiligen Beeinträchtigung auf das Ca²⁺-Uhr-Modell beobachtet. Während die Mutation hHCN4-CNBD die cAMP-Sensibilität des Kanals ausschaltet und er dadurch erst bei negativeren Membranpotentialen aktiviert wird, wirkt sich die Mutation hHCN4-AYA auf die Porenregion des Kanals aus und führt zu einer generell herabgesetzten Leitfähigkeit (Alig et al., 2009; Er et al., 2003).

Methodische Anwendung fand hierbei die konfokale Mikroskopie zur Visualisierung von Ca^{2+} -Signalveränderungen unterhalb der Zellmembran. Anhand unterschiedlicher Parameter wurden die Auswirkungen der Mutationen auf die Ca²⁺-Signale verglichen. Hierzu wurden die beiden Mutationen einander und jeweils dem Wildtyp gegenüber gestellt. Dabei wurden die Zellen im ersten Schritt submaximaler ß-adrenerger Stimulation ausgesetzt. Im zweiten Schritt wurde dann das Alkaloid Ryanodin appliziert, das die Ca²⁺-Uhr aus dem Gleichgewicht bringen und damit auch den zweiten Schrittmachermechanismus beeinträchtigen sollte (Zucchi & Ronca-Testoni, 1997). Trotz Ryanodin-Applikation zeigten die mutierten Genotypen keine Abnahme ihrer Ca2+-Transienten-Frequenz. Diese wiesen im Vergleich zum Wildtyp eine kürzere Dauer auf. Beide Befunde deuten auf eine verstärkte Aktivierung des gesamten Ca²⁺-Zyklus' in den mutierten Genotypen hin. Die hHCN4-AYA-Mutation zeichnete sich hierbei durch größere Unterschiede zum Wildtyp als die hHCN4-CNBD-Mutation aus. Auch war in der hHCN4-AYA-Mutation eine Erhöhung von F/F₀ als Maß für den maximalen Unterschied in der Ca²⁺-Signalstärke während eines Transienten zu verzeichnen. Dieses spricht ebenfalls für eine verstärkte Arbeit der im Ca²⁺-Zyklus eingebundenen Faktoren. Die Unterschiede zwischen den beiden Mutationen lassen sich mit Rückgriff auf die molekularbiologischen und klinischen Auswirkungen erst unzureichend erklären und bedürfen weiterer Erforschung.

6. Literaturverzeichnis

- Alig J, Marger L, Mesirca P, Ehmke H, Mangoni ME, Isbrandt D. (2009). Control of heart rate by cAMP sensitivity of HCN channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(29), 12189–12194.
- Ardell JL. (2011). The cardiac neuronal hierarchy and susceptibility to arrhythmias. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*, 8(4), 590–1. doi:10.1016/j.hrthm.2010.12.019
- Baruscotti M, Bottelli G, Milanesi R, DiFrancesco JC, DiFrancesco D. (2010). HCNrelated channelopathies. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 460(2), 405–15. doi:10.1007/s00424-010-0810-8
- Batulevicius D, Pauziene N, Pauza DH. (2003). Topographic morphology and age-related analysis of the neuronal number of the rat intracardiac nerve plexus. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*, 185(5), 449–59. doi:10.1016/S0940-9602(03)80105-X
- Beaumont E, Salavatian S, Southerland EM, Vinet A, Jacquemet V, Armour JA, Ardell JL. (2013). Network interactions within the canine intrinsic cardiac nervous system: implications for reflex control of regional cardiac function. *The Journal of physiology*, 591(Pt 18), 4515–33. doi:10.1113/jphysiol.2013.259382
- Bers DM. (2008). Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annual review of physiology*, *70*, 23–49. doi:10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455
- Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S, Zong X. (2009). Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiological reviews*, 89(3), 847–85. doi:10.1152/physrev.00029.2008
- Bockamp E, Maringer M, Spangenberg C, Fees S, Fraser S, Eshkind L, Oesch F, Zabel B. (2002). Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiological genomics*, *11*(3), 115–32. doi:10.1152/physiolgenomics.00067.2002
- Bogdanov KY, Vinogradova TM, Lakatta EG. (2001). Sinoatrial Nodal Cell Ryanodine Receptor and Na+-Ca2+ Exchanger : Molecular Partners in Pacemaker Regulation. *Circulation Research*, 88(12), 1254–1258. doi:10.1161/hh1201.092095
- Cheng H, Lederer W, Cannell M. (1993). Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*, 262(August), 740–744. Retrieved from http://www.sciencemag.org/content/262/5134/740.short
- Cho H, Takano M, Noma A. (2003). The electrophysiological properties of spontaneously beating pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node. *The Journal of physiology*, *550*(Pt 1), 169–80. doi:10.1113/jphysiol.2003.040501

- Christel CJ, Cardona N, Mesirca P, Herrmann S, Hofmann F, Striessnig J, Ludwig A, Mangoni ME, Lee A. (2012). Distinct localization and modulation of Cav1.2 and Cav1.3 L-type Ca2+ channels in mouse sinoatrial node. *The Journal of physiology*, 590(Pt 24), 6327–42. doi:10.1113/jphysiol.2012.239954
- DiFrancesco D. (1993). Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annual review of physiology*, 55, 455–472.
- DiFrancesco D. (2010). The role of the funny current in pacemaker activity. *Circulation research*, *106*(3), 434–46. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.208041
- DiFrancesco D, Borer JS. (2007). Cellular Basis for the Control of Heart Rate. *Drugs*, 67(Suppl. 2), 15–24.
- Dobrev D. (2009). Ion channel portrait of the human sinus node: useful for a better understanding of sinus node function and dysfunction in humans? *Circulation*, *119*(12), 1556–8. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.836866
- 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 If and Undermines Spontaneous Beating of Neonatal Cardiomyocytes. *Circulation*, 107(3), 485–489. doi:10.1161/01.CIR.0000045672.32920.CB
- Fox K, Ford I, Steg PG, Tendera M, Robertson M, Ferrari R. (2008a). Heart rate as a prognostic risk factor in patients with coronary artery disease and left-ventricular systolic dysfunction (BEAUTIFUL): a subgroup analysis of a randomised controlled trial. *Lancet*, *372*(9641), 817–21. doi:10.1016/S0140-6736(08)61171-X
- Fox K, Ford I, Steg PG, Tendera M, Ferrari R. (2008b). Ivabradine for patients with stable coronary artery disease and left-ventricular systolic dysfunction (BEAUTIFUL): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 372(9641), 807–16. doi:10.1016/S0140-6736(08)61170-8
- Furth PA, St. Onge L, Böger H, Gruss P, Gossen M, Kistner A, Bujard H, Hennighausen L. (1994). Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(September), 9302–9306. Retrieved from http://www.pnas.org/content/91/20/9302.short
- Futatsugi A, Kuwajima G, Mikoshiba K. (1995). Tissue-specific and developmentally regulated alternative splicing in mouse skeletal muscle ryanodine receptor mRNA. *Biochem. J*, *305*, 373–378. Retrieved from http://www.biochemj.org/bj/305/bj3050373.htm
- Gossen M, Bujard H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(June), 5547–5551. Retrieved from http://www.pnas.org/content/89/12/5547.short

- Hancox JC, Levi AJ, Brooksby P. (1994). Intracellular calcium transients recorded with Fura-2 in spontaneously active myocytes isolated from the atrioventricular node of the rabbit heart. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 255(1343), 99– 105. doi:10.1098/rspb.1994.0014
- Hardwick JC, Baran CN, Southerland EM, Ardell JL. (2009). Remodeling of the guinea pig intrinsic cardiac plexus with chronic pressure overload. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 297(3), R859–66. doi:10.1152/ajpregu.00245.2009
- Herrmann S, Stieber J, Ludwig A. (2007a). Pathophysiology of HCN channels. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 454(4), 517–22. doi:10.1007/s00424-007-0224-4
- Herrmann S, Stieber J, Stöckl G, Hofmann F, Ludwig A. (2007b). HCN4 provides a "depolarization reserve" and is not required for heart rate acceleration in mice. *The EMBO journal*, *26*(21), 4423–32. doi:10.1038/sj.emboj.7601868
- Herrmann-Frank A, Darling E, Meissner G. (1991). Functional characterization of the Ca2+-gated Ca2+ release channel of vascular smooth muscle sarcoplasmatic reticulum. *Pflügers Archiv European journal of physiology*, *418*, 353–359.
- Himeno Y, Toyoda F, Satoh H, Amano A, Cha CY, Matsuura H, Noma A. (2011). Minor contribution of cytosolic Ca2+ transients to the pacemaker rhythm in guinea pig sinoatrial node cells. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 300(1), H251–61. doi:10.1152/ajpheart.00764.2010
- Jorgensen A, Shen A, Arnold W, McPherson PS, Campbell KP. (1993). The Ca2+-release channel/ryanodine receptor is localized in junctional and corbular sarcoplasmic reticulum in cardiac muscle. *The Journal of cell biology*, *120*(4), 969–980. Retrieved from http://jcb.rupress.org/content/120/4/969.abstract
- Kurata Y, Hisatome I, Shibamoto T. (2012). Roles of sarcoplasmic reticulum Ca2+ cycling and Na+/Ca2+ exchanger in sinoatrial node pacemaking: insights from bifurcation analysis of mathematical models. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 302(11), H2285–300. doi:10.1152/ajpheart.00221.2011
- Lakatta EG, DiFrancesco D. (2009). What keeps us ticking: a funny current, a calcium clock, or both? *Journal of molecular and cellular cardiology*, 47(2), 157–70. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.03.022
- Lakatta EG, Vinogradova TM, Maltsev VA. (2008). The missing link in the mystery of normal automaticity of cardiac pacemaker cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1123*, 41–57. doi:10.1196/annals.1420.006
- Lakatta EG, Maltsev VA, Vinogradova TM. (2010). A coupled SYSTEM of intracellular Ca2+ clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. *Circulation research*, *106*(4), 659–73. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.206078

- Levesque PC, Leblanc N, Hume JR. (1994). Release of calcium from guinea pig cardiac sarcoplasmic reticulum induced by sodium-calcium exchange. *Cardiovascular research*, 28, 370–378. Retrieved from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/28/3/370.short
- Lindsay ARG, Manning SD, Williams AJ. (1991). Monovalent cation conductance in the ryanodine receptor-channels of sheep cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *Journal of Physiology*, 439, 463–480.
- Lyashkov AE, Vinogradova TM, Zahanich I, Li Y, Younes A, Nuss HB, Spurgeon HA, Maltsev VA, Lakatta EG. (2009). Cholinergic receptor signaling modulates spontaneous firing of sinoatrial nodal cells via integrated effects on PKA-dependent Ca(2+) cycling and I(KACh). *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 297(3), H949–59. doi:10.1152/ajpheart.01340.2008
- MacLennan DH, Kranias EG. (2003). Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *4*(7), 566–77. doi:10.1038/nrm1151
- Maltsev VA, Lakatta EG. (2008). Dynamic interactions of an intracellular Ca2+ clock and membrane ion channel clock underlie robust initiation and regulation of cardiac pacemaker function. *Cardiovascular research*, 77(2), 274–84. doi:10.1093/cvr/cvm058
- Maltsev VA, Lakatta EG. (2009). Synergism of coupled subsarcolemmal Ca2+ clocks and sarcolemmal voltage clocks confers robust and flexible pacemaker function in a novel pacemaker cell model. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 296(3), H594–615. doi:10.1152/ajpheart.01118.2008
- Maltsev VA, Lakatta EG. (2010). A novel quantitative explanation for the autonomic modulation of cardiac pacemaker cell automaticity via a dynamic system of sarcolemmal and intracellular proteins. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 298(6), H2010–23. doi:10.1152/ajpheart.00783.2009
- Maltsev VA, Lakatta EG. (2012). The funny current in the context of the coupled-clock pacemaker cell system. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*, 9(2), 302–7. doi:10.1016/j.hrthm.2011.09.022
- Maltsev VA, Vinogradova TM, Bogdanov KY, Lakatta EG, Stern MD. (2004). Diastolic calcium release controls the beating rate of rabbit sinoatrial node cells: numerical modeling of the coupling process. *Biophysical journal*, *86*(4), 2596–605. doi:10.1016/S0006-3495(04)74314-3
- Mangoni ME, Couette B, Bourinet E, Platzer J, Reimer D, Striessnig J, Nargeot J. (2003). Functional role of L-type Cav1.3 Ca2+ channels in cardiac pacemaker activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5543–8. doi:10.1073/pnas.0935295100

- Mangoni ME, Couette B, Marger L, Bourinet E, Striessnig J, Nargeot J. (2005). Voltagedependent calcium channels and cardiac pacemaker activity: from ionic currents to genes. *Progress in biophysics and molecular biology*, 90(1-3), 38–63. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2005.05.003
- Mangoni ME, Traboulsie A, Leoni A-L, Couette B, Marger L, Le Quang K, Kupfer E, Cohen-Solal A, Vilar J, Shin H-S, Escande D, Charpentier F, Nargeot J, Lory P. (2006). Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking CaV3.1/alpha1G T-type calcium channels. *Circulation research*, 98(11), 1422–30. doi:10.1161/01.RES.0000225862.14314.49
- Mangoni ME, Nargeot J. (2001). Properties of the hyperpolarization-activated current (If) in isolated mouse sino-atrial cells. *Cardiovascular Research*, 52(1), 51–64. doi:10.1016/S0008-6363(01)00370-4
- Mangoni ME, Nargeot J. (2008). Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiological reviews*, 88(3), 919–82. doi:10.1152/physrev.00018.2007
- Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblit N, Marks AR. (2000). PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101(4), 365–76. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10830164
- Mesirca P, Marger L, Toyoda F, Rizzetto R, Audoubert M, Dubel S, Torrente AG, Difrancesco ML, Muller JC, Leoni A-L, Couette B, Nargeot J, Clapham DE, Wickman K, Mangoni ME. (2013). The G-protein-gated K+ channel, IKACh, is required for regulation of pacemaker activity and recovery of resting heart rate after sympathetic stimulation. *The Journal of general physiology*, *142*(2), 113–26. doi:10.1085/jgp.201310996
- Meyers MB, Puri TS, Chien AJ, Gao T, Hsu P-H, Hosey MM, Fishman GI. (1998). Sorcin Associates with the Pore-forming Subunit of Voltage-dependent L-type Ca2+ Channels. *Journal of Biological Chemistry*, 273(30), 18930–18935. doi:10.1074/jbc.273.30.18930
- Meyers MB, Fischer A, Sun Y-J, Lopes CMB, Rohacs T, Nakamura TY, Zhou Y-Y, Lee PC, Altschuld RA, McCune SA, Coetzee WA, Fishman GI. (2003). Sorcin regulates excitation-contraction coupling in the heart. *The Journal of biological chemistry*, 278(31), 28865–71. doi:10.1074/jbc.M302009200
- Milanesi R, Baruscotti M, Gnecchi-Ruscone T, DiFrancesco D. (2006). Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. *The New England journal of medicine*, *354*(2), 151–7. doi:10.1056/NEJMoa052475
- Moorman AFM, Christoffels VM. (2003). Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiological reviews*, 83(4), 1223–67. doi:10.1152/physrev.00006.2003

- Nof E, Luria D, Brass D, Marek D, Lahat H, Reznik-Wolf H, Pras E, Dascal N, Eldar M, Glikson M. (2007). Point mutation in the HCN4 cardiac ion channel pore affecting synthesis, trafficking, and functional expression is associated with familial asymptomatic sinus bradycardia. *Circulation*, *116*(5), 463–70. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.706887
- Ogawa M, Zhou S, Tan AY, Fishbein MC, Lin S-F, Chen LS, Chen P-S. (2009). What have we learned about the contribution of autonomic nervous system to human arrhythmia? *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*, 6(8 Suppl), S8–11. doi:10.1016/j.hrthm.2009.02.015
- Park DS, Fishman GI. (2011). The cardiac conduction system. *Circulation*, 123(8), 904–15. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.942284
- Petit-Jacques J, Bois P, Bescond J, Lenfant J. (1993). Mechanism of muscarinic control of the high-threshold calcium current in rabbit sino-atrial node myocytes. *Pflügers Archiv - European journal of physiology*, 423, 21–27. Retrieved from http://link.springer.com/article/10.1007/BF00374956
- Reil J-C, Böhm M. (2008). BEAUTIFUL results--the slower, the better? *Lancet*, 372(9641), 779–80. doi:10.1016/S0140-6736(08)61172-1
- Rigg L, Heath BM, Cui Y, Terrar DA. (2000). Localisation and functional significance of ryanodine receptors during b -adrenoceptor stimulation in the guinea-pig sino-atrial node. *Cardiovascular research*, *48*, 254–264.
- Rousseau Eric, Smith JS, Meissner G. (1987). Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single Ca2+ release channel. *The American journal of physiology*, 253(3 Pt 1), C364–8. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2443015
- Rousseau E, Meissner G. (1989). Single cardiac sarcoplasmic reticulum Ca2+-release channel: activation by caffeine. *The American journal of physiology*, 256(2 Pt 2), H328–33. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2537030
- Schulze-Bahr E, Neu A, Friederich P, Kaupp UB, Breithardt G, Pongs O, Isbrandt D. (2003). Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *Journal* of Clinical Investigation, 111(10), 1537–1545. doi:10.1172/JCI200316387
- Severi S, Fantini M, Charawi L a, DiFrancesco D. (2012). An updated computational model of rabbit sinoatrial action potential to investigate the mechanisms of heart rate modulation. *The Journal of physiology*, 590(Pt 18), 4483–99. doi:10.1113/jphysiol.2012.229435
- Shen MJ, Choi E-K, Tan AY, Han S, Shinohara T, Maruyama M, Chen LS, Shen C, Hwang C, Lin S-F, Chen P-S. (2011). Patterns of baseline autonomic nerve activity and the development of pacing-induced sustained atrial fibrillation. *Heart rhythm : the* official journal of the Heart Rhythm Society, 8(4), 583–9. doi:10.1016/j.hrthm.2010.11.040

- Sirenko S, Yang D, Li Y, Lyashkov AE, Lukyanenko YO, Lakatta EG, Vinogradova TM. (2013). Ca²⁺-dependent phosphorylation of Ca²⁺ cycling proteins generates robust rhythmic local Ca²⁺ releases in cardiac pacemaker cells. *Science signaling*, 6(260), ra6. doi:10.1126/scisignal.2003391
- Sitsapesan R, Williams A. (1990). Mechanisms of caffeine activation of single calciumrelease channels of sheep cardiac sarcoplasmic reticulum. *The Journal of physiology*, *423*, 425–439. Retrieved from http://jp.physoc.org/content/423/1/425.short
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(25), 15235–40. doi:10.1073/pnas.2434235100
- Striessnig J. (1999). Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca2+ channels. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *9*, 242–269. Retrieved from http://www.karger.com/Article/Abstract/16320
- Sutko JL, Airey JA. (1996). Ryanodine receptor Ca2+ release channels: does diversity in form equal diversity in function? *Physiological reviews*, 76(4), 1027–71. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8874493
- Tinker A, Williams A. (1992). Divalent cation conduction in the ryanodine receptor channel of sheep cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *The Journal of general physiology*, *100*(3), 479–93. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2229088&tool=pmcentrez &rendertype=abstract
- Van der Heyden MAG, Wijnhoven TJM, Opthof T. (2005). Molecular aspects of adrenergic modulation of cardiac L-type Ca2+ channels. *Cardiovascular research*, 65(1), 28–39. doi:10.1016/j.cardiores.2004.09.028
- Vinogradova TM, Zhou Y-Y, Maltsev V, Lyashkov A, Stern M, Lakatta EG. (2004). Rhythmic ryanodine receptor Ca2+ releases during diastolic depolarization of sinoatrial pacemaker cells do not require membrane depolarization. *Circulation research*, 94(6), 802–9. doi:10.1161/01.RES.0000122045.55331.0F
- Vinogradova TM, Brochet DXP, Sirenko S, Li Y, Spurgeon H, Lakatta EG. (2010). Sarcoplasmic reticulum Ca2+ pumping kinetics regulates timing of local Ca2+ releases and spontaneous beating rate of rabbit sinoatrial node pacemaker cells. *Circulation research*, 107(6), 767–75. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.220517
- Weinberger F, Mehrkens D, Friedrich FW, Stubbendorff M, Hua X, Müller JC, Schrepfer S, Evans SM, Carrier L, Eschenhagen T. (2012). Localization of Islet-1-positive cells in the healthy and infarcted adult murine heart. *Circulation research*, 110(10), 1303–10. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.259630

- Yaniv Y, Spurgeon HA, Lyashkov AE, Yang D, Ziman BD, Maltsev VA, Lakatta EG. (2012). Crosstalk between mitochondrial and sarcoplasmic reticulum Ca2+ cycling modulates cardiac pacemaker cell automaticity. *PloS one*, 7(5), e37582. doi:10.1371/journal.pone.0037582
- Ye B, Nerbonne JM. (2009). Proteolytic processing of HCN2 and co-assembly with HCN4 in the generation of cardiac pacemaker channels. *The Journal of biological chemistry*, 284(38), 25553–9. doi:10.1074/jbc.M109.007583
- Yu X, Chen X-W, Zhou P, Yao L, Liu T, Zhang B, Li Y, Zheng H, Zheng L-H, Zhang CX, Bruce I, Ge J-B, Wang S-Q, Hu Z-A, Yu H-G, Zhou Z. (2007). Calcium influx through If channels in rat ventricular myocytes. *American journal of physiology. Cell physiology*, 292(3), C1147–55. doi:10.1152/ajpcell.00598.2005
- Zucchi R, Ronca-Testoni S. (1997). The sarcoplasmic reticulum Ca2+ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacological reviews*, 49(1), 1–51. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9085308

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vier-Kammer-Blick auf das Herz	7
Abbildung 2: Sinusknotenzellen der Maus unterschiedlicher Morphologie	8
Abbildung 3: Idealisiertes Aktionspotential einer Sinusknotenzelle	11
Abbildung 4: Darstellung einer der vier Untereinheiten eines HCN-Kanals	13
Abbildung 5: Darstellung der Zellmembran einer Sinusknotenzelle mit einem HCN-Kanal	14
Abbildung 6: Sinusknotenregion nach Färbung mit HCN4-Antikörpern.	16
Abbildung 7: Linescan-Abbildung von lokalen Ca ²⁺ -Freisetzungen (LCRs)	20
Abbildung 8: Schematische Illustrierung der HCN4-Mutationen	23
Abbildung 9: Herzansicht.	27
Abbildung 10: Schmetterlingsformation des Sinusknotens	28
Abbildung 11:Sinusknotenzellen der Maus	31
Abbildung 12: Setup des Experiments mit insgesamt sechs Versuchszeitpunkten.	33
Abbildung 13: Zeit bis zum Aufstrich	34
Abbildung 14: F/F ₀	35
Abbildung 15: Halbwertsbreite	35
Abbildung 16: Linescans und Integral der Signalintensität des Wildtyps	40
Abbildung 17: Linescans und Integral der Signalintensität einer HCN4-AYA-Zelle	41
Abbildung 18: Linescans und Integral der Signalintensität einer HCN4-CNBD-Zelle	42
Abbildung 19: Frequenz der Transienten, Versuchszeitpunkt 0	43
Abbildung 20: Frequenz der Transienten	45
Abbildung 21: Zeit bis zum Aufstrich, Kontrollzeitpunkt.	47
Abbildung 22: Zeit bis zum Aufstrich	49
Abbildung 23: Zeit bis zum Aufstrich, Kontrolle-Ryanodin	51

Abbildung 25: Halbwertsbreite	55
Abbildung 26: Halbwertsbreite, Kontrolle - Ryanodin	57
Abbildung 27: F/F ₀ , Kontrollzeitpunkt	58
Abbildung 28: F/F ₀ , Versuchszeitpunkt 1	59
Abbildung 29: F/F ₀ im Zeitverlauf des Versuchs	60
Abbildung 30: F/F ₀ im Vergleich der Genotypen, Kontrolle - Ryanodin	62
Abbildung 31: Zwischen der Membran-Uhr sowie der Ca ²⁺ -Uhr vermittelnde Faktoren	66
Abbildung 32: Wege der autonomen Regulation in der Schrittmacherzelle	69
Abbildung 33: Mutationen im HCN4-Kanal	80

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mittelwerte, ± Standardfehler (SEM) und Gruppengröße (N) der Frequenz(Anzahl der Transienten/Linescan (15,4 s)) im Genotypvergleich zu allen sechsVersuchszeitpunkten.44

Tabelle 3: Mittelwerte, ± Standardfehler (SEM) und Gruppengröße (N) der Zeit bis zumAufstrich (s) im Genotypvergleich zu allen sechs Versuchszeitpunkten.50

Tabelle 8: Mittelwerte, \pm Standardfehler (SEM) und Gruppengröße (N) von F/F0 imGenotypvergleich. Hierbei ist der Kontrollzeitpunkt (Ctrl) den gemittelten Werten beiRyanodin-Superfusion (Rya) gegenüber gestellt.62

9. Abkürzungsverzeichnis

AV-Knoten, AVN	Atrioventrikularknoten
°C	Grad Celsius
A1	Adenosin-Rezeptor
AC	Adenylatcyclase
ACh	Acetylcholin
Ado	Adenosintriphosphat
Ao	Aorta
AP	Aktionspotential
APD	Aktionspotentialdauer
ATP	Adenosintriphosphat
AVB	Atrioventrikularbündel
BB	rechter und linker Kammerschenkel
BSA	Bovine Serum Albumin
CaMKII	Ca2+/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
Cav1.2	Alpha 1C-Untereinheit des spannungsabhängigen L-Typ- Calciumkanals
Cav1.3	Alpha 1D-Untereinheit des spannungsabhängigen T-Typ- Calciumkanals
CFB	Zentraler fibröser Körper
CICR	Ca2+-induzierte Ca2+-Freisetzung(en)
CNBD	CAMP-Bindungsdomäne
Cs	Sinus coronarius
СТ	Crista terminalis
Ctrl.	Kontrollzeitpunkt
DD	Diastolische Depolarisierung
Dox	Doxycyclin
EDD	Exponentieller Anteil der Diastolischen Depolarisierung
EMK	Elektromechanischen Kopplung
END	Endokard
EPI	Epikard
Eth	Schwellenpotential zur Generierung eines Aktionspotentials
Gi	Inhibitorisches G-Protein zur Inhibierung von Adenlyatcyclase
GIRK1/4	Untereinheiten des G-Protein-Rezeptor gesteuerten Kaliumkanals
Gs	Stimulierendes G-Protein zur Stimulierung der Adenylatcyclase
HCN-Kanal	Hyperpolarisationsakivierter, cyclonukleotidregulierter Kationenkanal
hHCN4	humane Untereinheit des HCN-Kanals, Typ 4
I	Strom

ICa,L	L-Typ-Calcium-Kanal vermittelter Strom
ICa,T	T-Typ-Calcium-Kanal vermittelter Strom
ICa2+	Calcium-Strom
ICNP	Intrinsischer kardialer neuronaler Plexus
ICV	Vena cava inferior
If	Nicht-selektiver Kationenstrom, der über HCN-Kanäle vermittelt wird
IK+	Kaliumstrom
IKACh	Acetylcholingesteuerter Kaliumstrom
INa+	Natriumstrom
INCX	Na+-/Ca2+-Austauscherstrom
Iso	Isoprenalin
LA	Linker Vorhof
LCR	Lokale, rhythmische, über Ryanodinrezeptoren vermittelte Ca2+- Freisetzung(en)
LDD	Linearer Anteil der Diastolischen Depolarisierung
LV	Linke Kammer
M2-R, M2	Muskarinerger Rezeptor Typ 2
MDP	Maximales Diastolisches Potential
ms	Millisekunde
MV	Mitralklappe
mV	Millivolt
MYO	Myokard
Ν	Gruppengröße
NA	Noradrenalin
NCX	Na+-/Ca2+-Austauscherkanal
nm	nanomolar
PA	Arteria pulmonalis
РКА	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
PV	Pulmonalvenen
PVSC	Periphere ventrikuläre Reizleitung
RA	Rechter Vorhof
RV	Rechte Kammer
Rya	Ryanodin
RyR	Ryanodin-Rezeptor(en)
S	Sekunde
SAN	Sinusknoten
SEM	Standardfehler
SERCA	Ca2+-Pumpe des Sarkoplasmatischen und Endoplasmatischen Retikulums
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum

SVC	Vena cava superior
TRE	Tetracyclin Responsives Element
tTA	Tetracyclin dependenter Transactivator
vs.	versus
WT	Wildtyp
β-AR	β-Adrenorezeptor
μm	mikromolar

10. Danksagung

Am Anfang dieses Projekts standen der Zufall und die Neugier für Wissenschaftstheorie. An meinem Entschluss, die Theorie in der Praxis zu überprüfen, hatte Herr Professor Dr. med. Heimo Ehmke einen sehr großen Anteil. Ich danke ihm herzlich für seine nachhaltige und tatkräftige wissenschaftliche Unterstützung, seine exzellenten Ideen und seine großzügige Initiative, mich ans CNRS in Montpellier zu vermitteln.

Darüber hinaus gilt der Forschungsgruppe am "Institut du Génomique Fonctionnelle" des CNRS in Montpellier, Frankreich, unter der Leitung von Joel Nargeot und Matteo Mangoni mein besonderer Dank. Hervorheben möchte ich neben Matteo Mangoni besonders Pietro Mesirca und Angelo Torrente, die mich sehr herzlich in ihrem Team willkommen hießen und mich zu großer Selbstständigkeit motiviert haben, während sie mir immer mit Rat und Tat beiseite standen. Anne Caderas de Kerleau und Alessandra Agosti haben mir in der Ferne ein wunderschönes Zuhause gegeben, in das ich jederzeit gerne zurückkehre.

Der Arbeitsgruppe für Neuropädiatrie unter der Leitung von Professor Dr. med. Dirk Isbrandt am ZMNH in Hamburg gebührt ebenfalls großer Dank. Ohne die enge Kooperation zwischen den drei Instituten in Hamburg und Montpellier, den Ideenreichtum und die wissenschaftliche Weitsicht der Arbeitsgruppen- und Institutsleiter hätte meine Arbeit nie zustande kommen können.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Zelluläre und Integrative Physiologie, allen voran Herrn PD Dr. med. Alexander Schwoerer, möchte ich mich für die angenehme Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft sowie die in jedem Gespräch spürbare fachliche Begeisterung und Kompetenz bedanken.

Große Wertschätzung bringe ich meiner Familie für Ihre warmherzige Begleitung, ihre wertvolle Unterstützung und die unermüdliche Ermutigung während meines gesamten Werdegangs entgegen.

Meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich diese Arbeit widmen.

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:

Jana Christina Müller

Im Rahmen dieser Dissertation und des Erlernens und Implementierens der Sinusknotenzell-Isolation am Universitätsklinikum Eppendorf sind folgende Publikationen entstanden:

- Mesirca P, Marger L, Toyoda F, Rizzetto R, Audoubert M, Dubel S, Torrente AG, Difrancesco ML, Muller JC, Leoni A-L, Couette B, Nargeot J, Clapham DE, Wickman K, Mangoni ME. (2013). The G-protein-gated K+ channel, IKACh, is required for regulation of pacemaker activity and recovery of resting heart rate after sympathetic stimulation. *The Journal of general physiology*, *142*(2), 113–26. doi:10.1085/jgp.201310996
- Weinberger F, Mehrkens D, Friedrich FW, Stubbendorff M, Hua X, Müller JC, Schrepfer S, Evans SM, Carrier L, Eschenhagen T. (2012). Localization of Islet-1positive cells in the healthy and infarcted adult murine heart. *Circulation research*, *110*(10), 1303–10. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.259630