

**Rolle der cAMP-Sensitivität der HCN-Kanäle
für die Herzfrequenzregulation
in der adulten Maus
(*Mus musculus*, Linnaeus 1758)**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
vorgelegt im Department Biologie der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

von

Jacqueline Alig
aus Mömbris

Hamburg 2009

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. D. ISBRANDT
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. K. WIESE
Tag der Disputation: 13. März 2009

Hamburg, den 19. Februar 2009



Jörg Ganzhorn

Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung 7

1 Einleitung 9

 1.1 Die Rolle von I_f in der rhythmischen Aktivität von Sinusknotenzellen 9

 1.2 Regulation der Herzrate durch das autonome Nervensystem 11

 1.3 Molekularer Aufbau und Eigenschaften der HCN-Kanäle 13

 1.4 Kardiales Expressionsmuster der HCN-Kanäle 14

 1.5 Humane Mutationen in *HCN4* 15

 1.6 Mausmodelle mit HCN-Kanaldefizienz..... 17

 1.6.1 *HCN2-Knockout* 18

 1.6.2 *HCN4-Knockout* 18

 1.6.3 Mutation in der cAMP-Bindestelle von *mHCN4* 18

 1.7 Pharmakologischer Block der HCN-Kanäle 19

2 Zielsetzung der Arbeit..... 20

3 Material 22

 3.1 Chemikalien, Enzyme und Gebrauchsmaterialien 22

 3.2 Lösungen und Puffer 22

 3.3 Bakterienstämme und Zelllinien 24

 3.4 Nährmedien..... 25

 3.4.1 Bakterienkultur 25

 3.4.2 Zellkultur 25

 3.5 Vektoren..... 25

 3.6 Mauslinien 26

 3.7 Molekulargewichtsstandards..... 27

 3.7.1 DNA-Standard..... 27

 3.7.2 Proteinstandards..... 27

 3.8 Kits 27

 3.9 Filter 28

3.10 PCR-Primer	28
3.10.1 Klonierungsprimer	28
3.10.2 Mutationsprimer	28
3.10.3 Genotypisierungsprimer	28
3.10.4 Sequenzierungsprimer	29
3.11 Antikörper	30
3.11.1 Primäre Antikörper	30
3.11.2 Sekundäre Antikörper	30
4 Methoden.....	31
4.1 Handhabung von Bakterienstämmen und Zellkulturen	31
4.1.1 Kultivierung von Bakterienstämmen	31
4.1.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	31
4.1.3 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien.....	31
4.1.4 Routinehaltung von HEK293-Zellen.....	32
4.1.5 Transfektion von HEK293-Zellen	32
4.2 DNA-Methoden	33
4.2.1 Präparation von DNA	33
4.2.1.1 Plasmid-Mini-Präparation aus 2 ml Bakterienkulturen.....	33
4.2.1.2 Plasmid-Midi-Präparation aus 50 ml Bakterienkulturen.....	33
4.2.1.3 Isolation genomischer DNA aus Mäuseschwänzen	33
4.2.1.4 Isolation genomischer DNA aus Mäuseohr-Biopsien	34
4.2.2 Enzymatische Modifikationen von DNA	34
4.2.2.1 Restriktionshydrolyse von DNA	34
4.2.2.2 Auffüllreaktion überhängender 5'-Enden	34
4.2.2.3 Dephosphorylierung von Vektoren	34
4.2.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten	34
4.2.3 Sequenzierung von DNA-Fragmenten.....	35
4.2.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese	35

4.2.5 DNA-Isolation aus Agarosegelen.....	35
4.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen.....	35
4.2.6.1 Fotometrische Konzentrationsbestimmung	35
4.2.6.2 DNA-Konzentrationsbestimmung durch Agarosegeldetektion ..	36
4.2.7 Mikrodialyse von DNA.....	36
4.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
4.2.8.1 Standard-PCR	36
4.2.8.2 Genotypisierung mittels PCR	37
4.2.8.3 <i>In vitro</i> Mutagenese durch überlappende PCR	40
4.2.8.4 Herstellung einer hHCN4 spezifischen Sonde	41
4.3 RNA-Methoden	41
4.3.1 <i>In vitro</i> Synthese von cRNA	41
4.3.2 RNA Isolation aus Mausherzen	42
4.3.3 RNA Konzentrationsbestimmung.....	42
4.3.4 Auftrennung von RNA durch Gelelektrophorese.....	43
4.3.5 Transfer der RNA auf eine Nylon-Membran	43
4.3.6 Hybridisierung der RNA mit spezifischer Sonde	43
4.4 Protein-Methoden.....	44
4.4.1 Isolation von Proteinen aus transfizierten Zellen	44
4.4.2 Extraktion von Proteinen aus Mausherzen	44
4.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	44
4.4.4 Auftrennung von Proteinen durch Gelelektrophorese.....	44
4.4.5 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen	45
4.4.6 Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine	45
4.4.7 Entfernen der gebundenen Antikörper.....	45
4.5 Elektrophysiologische Experimente	46
4.5.1 <i>In vitro</i> Elektrophysiologie in Sinus- und AV-Knotenzellen	46
4.5.1.1 Isolation der Zellen	46

4.5.1.2 Messung des Zell-Automatismus	46
4.5.1.3 Elektrophysiologische Messungen der Schrittmacheraktivitäten und des I_f in Sinus- und AV-Knotenzellen	46
4.5.2 <i>In vivo</i> Elektrophysiologie: EKG-Telemetrie.....	47
4.5.2.1 Implantation der EKG-Telemetrie-Sender	47
4.5.2.2 Aufzeichnung der Daten	48
4.5.2.3 Analyse der telemetrischen Daten.....	48
4.6 Maushaltung und pharmakologische Behandlung	50
4.7 Echokardiografie (Ultraschall) des Herzens	51
4.7.1 Erhebung der Daten.....	51
4.7.2 Auswertung der Daten	52
5 Ergebnisse	53
5.1 GFP-Expression im Sinusknoten	54
5.2 Generierung einer transgenen Mauslinie mit cAMP-insensitivem F-Strom.....	55
5.2.1 Klonierung des Konstrukts	55
5.2.1.1 Flankieren des TRE-Tight Promotors mit Insulatorsequenzen..	55
5.2.1.2 Mutagenese des <i>hHCN4</i>	56
5.2.1.3 Klonierung des HA-hHCN4-1631delC Konstrukts in pW-TT1 ...	56
5.2.1.4 Aufreinigung des Konstrukts für die Pronukleusinjektion	56
5.2.2 Untersuchung auf Transgenexpression in doppelt transgenen Mäusen	56
5.3 Charakterisierung der positiven Founderlinien.....	58
5.3.1 Funktionalität des Tet-Systems: Kontrolle, Induzierbarkeit und Reversibilität der Expression	58
5.3.2 Expressionsmuster der transgenen HA-hHCN4-SND Untereinheit	61
5.4 Ultraschall Untersuchungen zur Überprüfung der ventrikulären Funktion	62
5.4.1 Ultraschall-Analyse in DW Tieren	62
5.4.2 Ultraschall-Analyse in Tieren ohne DOX-Behandlung	66
5.5 Elektrophysiologische Untersuchungen	70

5.5.1 Elektrophysiologie in akut isolierten Schrittmacherzellen	70
5.5.1.1 Eigenschaften des I_f in isolierten Sinusknotenzellen	70
5.5.1.2 Rhythmische Aktivität der Sinusknotenzellen	73
5.5.1.3 Rhythmische Aktivität der AV-Knotenzellen	76
5.5.2 Telemetrische EKG Messungen	77
5.5.2.1 EKG Messungen in DW Mäusen	79
5.5.2.2 EKG Messungen in WD Mäusen	83
6 Diskussion	88
6.1 Entwicklung eines Mausmodells mit induzierbarer cAMP-Insensitivität von kardialen HCN-Kanälen	88
6.2 Zellulärer Phänotyp bei cAMP-insensitivem I_f	90
6.3 <i>In vivo</i> Elektrophysiologie	93
6.4 Ventrikuläre Funktion	95
6.5 Ausblick	97
7 Literaturverzeichnis	98
8 Anhang	110
8.1 Abkürzungsverzeichnis	110
8.2 Plasmidkarten	113
8.2.1 pW-TT1	113
8.2.2 pcDNA1/Amp hHCN4	113
8.2.3 pcDNA1/Amp HA-hHCN4 1631delC	114
8.2.4 pWTT1 HA-hHCN4 1631delC	114
8.2.5 pGemHe-Juel-HA-hHCN4	115
8.3 Sequenz der für hHCN4 spezifischen Sonde	115
8.4 Sequenz des HA-Tags	115
8.5 Wissenschaftlicher Werdegang	116

Zusammenfassung

Für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze zur Regulation der Herzfrequenz in krankem Myokard ist es wichtig, den zugrunde liegenden Mechanismus der Schrittmacheraktivität zu verstehen. Die initiale Erregung, die den Herzschlag auslöst und die Herzfrequenz bestimmt, geht vom Sinusknoten aus. Dort führt ein Zusammenspiel aus Ionenkanälen und intrazellulären Calcium-Freisetzungen zur spontanen Kontraktion der Zellen. Dabei wird insbesondere die Rolle der HCN-Kanäle, die den F-Strom vermitteln und deren Expression in Sinusknotenzellen sehr hoch ist, als Schrittmacher diskutiert. Humane Mutationen in *HCN4* führen zu Sinusknotendysfunktion und Bradykardie.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein transgenes Mausmodell etabliert, das herzspezifisch und induzierbar eine mutierte HCN4-Untereinheit (HA-hHCN4-SND) mit verkürztem C-Terminus exprimiert. Dem Protein fehlt die cAMP-Bindestelle, was sich dominant auf die endogenen Untereinheiten auswirkt und in Sinusknotenzellen zu einem cAMP-insensitiven I_f und verminderter spontaner Aktivität führt. In wachen und frei beweglichen Mäusen hat die Expression von HA-hHCN4-SND zwar eine Herzfrequenzverringering in Ruhe und bei Aktivität zur Folge, die relative Frequenzanpassung durch das autonome Nervensystem bleibt jedoch unverändert.

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal gezeigt, dass unter physiologischen Bedingungen in der adulten Maus eine cAMP-Modulation in Sinusknotenzellen notwendig ist, um I_f zu aktivieren. Die aktivitätsbedingte Herzfrequenzregulation ist unabhängig von der cAMP-Modulation der HCN-Kanäle. Stattdessen scheint die physiologische Rolle von I_f vielmehr darin zu bestehen, die Frequenz *per se* und unabhängig von der Aktivität auf ein bestimmtes Niveau anzuheben. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte der pathophysiologische Mechanismus aufgeklärt werden, der in der Patientin mit verkürzter HCN4-Untereinheit zur Sinusknotenfehlfunktion und zur chronotropen Inkompetenz führt.

Abstract

Understanding the mechanisms of pacemaker activity is important for developing new therapeutic approaches for controlling heart rate in diseased myocardium. Pacemaker activity of the sinus node initiates heartbeat and determines heart rate. A complex interplay of membrane ion channels and intracellular calcium release leads to automaticity of the sinoatrial node cells. In particular, the role of HCN channels, which are mediating I_f and which are highly expressed in sinus node, is under discussion. Human mutations in *HCN4* result in sinus node dysfunction and bradycardia.

In this study, a mouse model was established that expressed a truncated HCN4 subunit (HA-hHCN4-SND) in a heart-specific and inducible manner. The protein affected the endogenous subunits in a dominant negative way leading to a cAMP-insensitive I_f in sinoatrial node cells and impaired cellular automaticity. In conscious mice, HA-hHCN4-SND expression caused a marked heart rate reduction at rest and during exercise, but preserved the relative extent of regulation controlled by the autonomous nervous system.

We demonstrated for the first time that cAMP modulation of I_f is necessary in adult sinoatrial node cells to activate the current under physiological conditions. The activity dependent frequency regulation is independent of I_f modulation by cAMP and the physiological role of I_f seems to determine a basal level of excitability influencing maximal and minimal heart rates. Furthermore, the pathophysiological mechanism of a human mutation linked to sinus node dysfunction could be uncovered by the results obtained in this study.

1 Einleitung

Die Eigenschaft des Herzens spontan zu schlagen ist von zentraler physiologischer Bedeutung. Die dafür verantwortliche, elektrische Erregung wird von einem Netzwerk aus rhythmisch aktiven Schrittmacherzellen, dem Sinusknoten, ausgelöst und breitet sich sukzessive über die Vorhöfe, den atrioventrikulären (AV-) Knoten und das ventrikuläre Reizleitungssystem bestehend aus His-Bündel und Purkinje-Fasern aus. Eine besondere Fähigkeit des Schrittmachers ist, auf die Bedürfnisse des Körpers durch Frequenzveränderungen reagieren zu können. Diese Adaption wird über Botenstoffe vom vegetativen Nervensystem gesteuert. Die genauen Mechanismen, auf denen die spontane Aktivität der Zellen und die Regulation durch das autonome Nervensystem beruhen, sind bis heute jedoch nicht bekannt. Für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze zur Kontrolle der Frequenz im kranken Herzen wäre dies jedoch von großer Bedeutung, da die Verminderung der Herzfrequenz in Patienten mit mangelhafter Herzfunktion einen positiven Effekt hat (Abraham *et al.*, 2008; O'Rourke, 2007; Bhatt und Stone, 2006).

1.1 Die Rolle von I_f in der rhythmischen Aktivität von Sinusknoten-zellen

Die rhythmische Aktivität der Sinusknoten-zellen basiert auf einem wiederkehrenden Zusammenspiel von Ionenströmen und intrazellulären Calcium-Freisetzungen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Eine spontane Depolarisation der Zellmembran führt zur Ausbildung eines Aktionspotenzials. Der Einwärtsstrom, der dem steilen Anstieg des Aktionspotenzials zugrunde liegt, wird von spannungsgesteuerten L-Typ (*large/long lasting*) Calciumkanälen getragen. Die starke Depolarisation der Zelle führt zur Aktivierung von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen und damit zur Repolarisation. Nach einer kurzen Phase der Hyperpolarisation erfolgt erneut die spontane, langsame Depolarisation, die

die spannungsgesteuerten Calciumkanäle aktiviert. Welche Ionenströme für die langsame Depolarisation im Detail verantwortlich sind, ist bis heute nicht genau bekannt und wird in der Literatur intensiv diskutiert (Maltsev und Lakatta, 2008; Mangoni und Nargeot, 2008; DiFrancesco, 2006; Lipsius und Bers, 2003; Kodama *et al.*, 2002). 1979 wurde zum ersten Mal ein Ionenstrom in Sinusknotenzellen beschrieben, der aufgrund seiner Eigenschaften für die spontane Depolarisation vermitteln könnte: Er aktiviert bei Hyperpolarisation des Membranpotenzials und leitet einen nichtselektiven depolarisierenden Kationenstrom in die Zelle (Brown *et al.*, 1979).

Einen ähnlichen Strom fand man auch in spontan aktiven Purkinje-Fasern (DiFrancesco, 1981a; DiFrancesco, 1981b) und Pyramidenneuronen des Hippocampus (Halliwell und

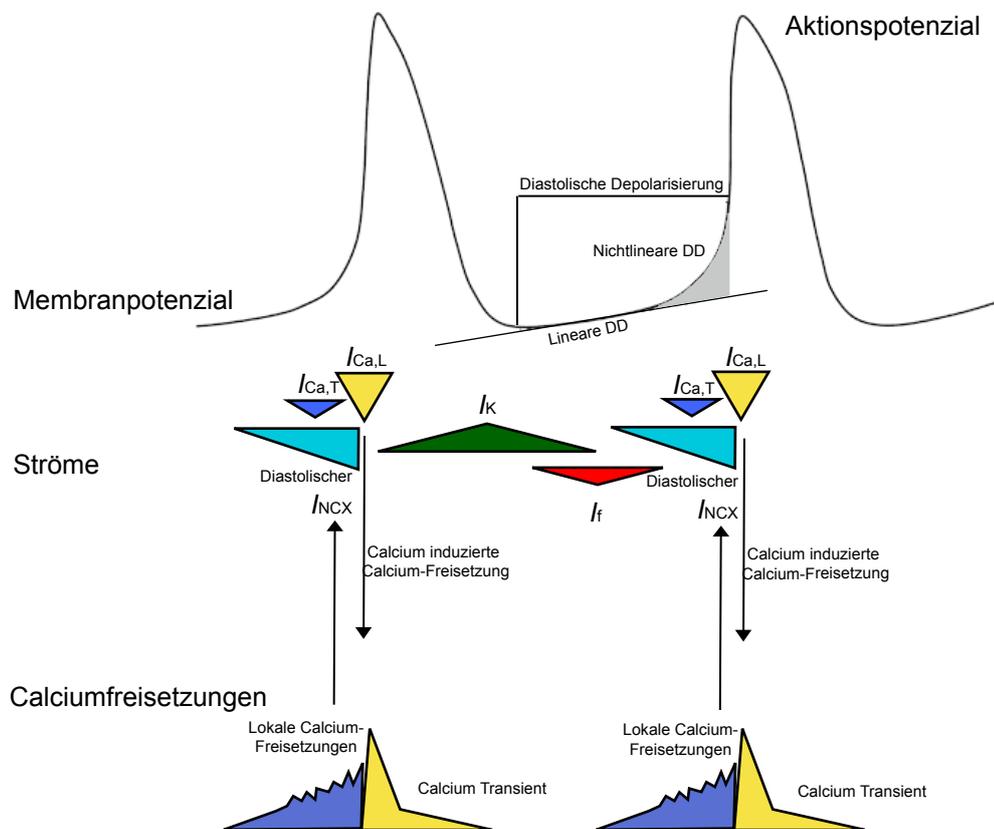


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Aktionspotenzials und die dazu beitragenden Ionenströme und Calcium-Freisetzungen in sinoatrialen Zellen (modifiziert nach Maltsev und Lakatta, 2008)

Die diastolische Depolarisation (DD) einer Sinusknotenzelle lässt sich in eine lineare und nichtlineare Phase einteilen. Während der linearen Phase führt die Inaktivierung von I_K und die Aktivierung von I_f zur Depolarisation der Zelle. Intrazelluläre Calcium-Freisetzungen und die daraus resultierende Aktivierung des Natrium-Calcium-Austauschers (I_{NCX}) depolarisieren das Membranpotenzial und aktivieren $I_{Ca,T}$ und letztendlich $I_{Ca,L}$, was zur Ausbildung eines Aktionspotenzials führt. Durch Transport des Calciums von der Zelle ins sarkoplasmatische Retikulum (Calcium Transient) und durch Aktivierung der Kaliumkanäle wird die Zelle im Anschluss repolarisiert. Es gibt folglich zwei unabhängige Mechanismen, die zur Aktivierung der Zelle beitragen: Ionenströme und Calcium-Freisetzungen.

Adams, 1982; Maccaferi *et al.*, 1993). In den Neuronen ist der depolarisierende Strom ebenfalls an der spontanen, rhythmischen Erregung der Zelle beteiligt (Kaupp und Seifert, 2001; Santoro und Tibbs, 1999; Pape, 1996). Des Weiteren wurde er in Fotorezeptorzellen gemessen (Attwell und Wilson, 1980; Bader *et al.*, 1979 und 1982). Wegen der ungewöhnlichen Eigenschaften wurde der Strom als *funny* (I_f), *queer* (I_q) oder *hyperpolarization activated current* (I_h) bezeichnet.

Im Herzen trägt der *funny current* (F-Strom) zur langsamen Depolarisation der Zelle bei. Die langsame Depolarisation kann in zwei Phasen eingeteilt werden: Die frühe, lineare und die späte, nichtlineare (Abb. 1). In der frühen Phase verringert sich nach der Repolarisation der Zelle durch Kanalinaktivierung die Leitfähigkeit von I_K , einem verzögerten Auswärtsgleichrichter (Noble, 1960). Dies begünstigt den durch I_f vermittelten Einwärtsstrom (Zhang und Vassalle, 2001), der bei einem hyperpolarisierten Membranpotenzial von -70 mV aktiv ist. Lokale Calcium-Freisetzen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum aktivieren den Natrium-Calcium-Austauscher (I_{NCX}), der drei Na^+ -Ionen gegen ein Ca^{2+} -Ion austauscht und somit ebenfalls elektrogen ist. Beide Ereignisse führen zu einer weiteren Depolarisation, der sog. nichtlinearen Depolarisation, der Zelle und zur Aktivierung des spannungsgesteuerten Calcium-Kanals des T-Typs (*tiny/transient*). In der zweiten Phase wird durch weitere Depolarisation der spannungsgesteuerte Calcium-Kanal des L-Typs aktiviert. Durch die erhöhte Calciumkonzentration in der Zelle wird zusätzlich eine Calcium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum über Ryanodinrezeptoren ausgelöst. Man spricht von einer Calcium induzierten Calcium-Freisetzung. Dies führt letztendlich zur Ausbildung eines erneuten Aktionspotenzials.

1.2 Regulation der Herzrate durch das autonome Nervensystem

Das autonome Nervensystem ist in der Lage, über Botenstoffe die Herzfrequenz an den Bedarf des Körpers anzupassen. Durch Ausschüttung von Adrenalin wird die Herzfrequenz erhöht, wohingegen der parasympathische Botenstoff Acetylcholin zu einer Erniedrigung der Kontraktionsrate führt. Misst man die Membranspannung von isolierten Sinusknotenzellen nach Stimulation mit Isoprenalin, das wie Adrenalin ein Agonist für β -Adrenozeptoren ist, beobachtet man eine Frequenzerhöhung der Aktionspotenziale (Abb. 2 A). Im Gegensatz dazu verlangsamt Acetylcholin, das an muskarinische Rezeptoren bindet, die Frequenz der Aktionspotenziale. Dabei verändert sich insbesondere die Steigung der langsamen

Depolarisation: Nach β -adrenerger Stimulation ist sie steiler, wohingegen sie nach cholinergischer Stimulation flacher ist. Auf molekularer Ebene führt eine β -adrenerge Stimulation über ein stimulierendes G-Protein zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration und zur Auslösung einer Signalkaskade. Dagegen führt die Bindung von Acetylcholin an muskarinische Rezeptoren über ein inhibierendes G-Protein zur Erniedrigung des cAMP-Spiegels. Eine Besonderheit von I_f ist, dass er direkt durch intrazelluläres cAMP moduliert werden kann: Bei höherer cAMP-Konzentration erhöht sich der makroskopische Strom und die halbmaximale Aktivierung verschiebt sich zu positiveren Membranpotenzialen. Acetylcholin wirkt in die entgegengesetzte Richtung: Die Stromamplitude verringert sich und die halbmaximale Aktivierung wird in Richtung hyperpolarisierter Potenziale verschoben (Abb. 2).

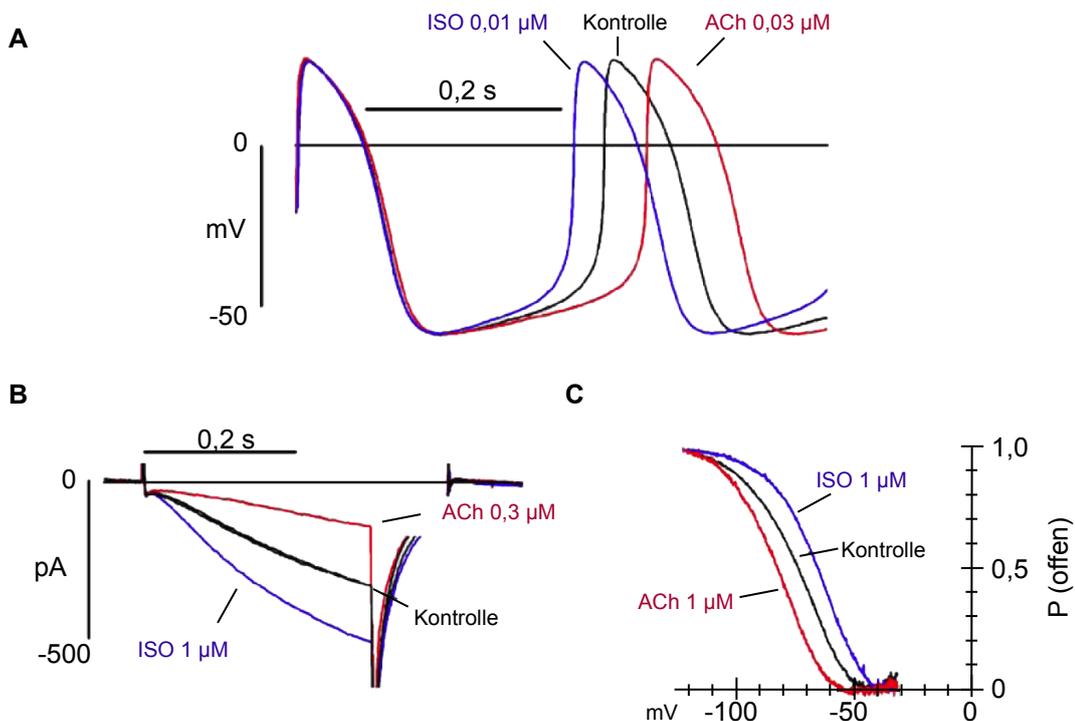


Abb. 2: In isolierten Sinusknotenzellen werden Frequenzanpassungen durch das autonome Nervensystem unter anderem durch Veränderungen des F-Stroms vermittelt (modifiziert nach DiFrancesco, 2006).

(A) Botenstoffe des autonomen Nervensystems führen in isolierten Sinusknotenzellen zu Frequenzveränderungen der sinoatrialen Aktionspotenziale. Isoprenalin (ISO, blau) beschleunigt und Acethylcholin (ACh, rot) verlangsamt die Frequenz. Dabei verändert sich vor allem die Steilheit der diastolischen Depolarisation. (B) Die I_f -Stromamplitude verringert sich nach Behandlung mit ACh und erhöht sich nach Behandlung mit ISO. (C) Die Aktivierungskurve von I_f verschiebt sich durch ACh zu negativeren und durch ISO zu positiveren Werten.

1.3 Molekularer Aufbau und Eigenschaften der HCN-Kanäle

Ende der neunziger Jahre konnten mit der Klonierung und Sequenzierung einer Genfamilie die Kanaluntereinheiten identifiziert werden, die für I_f verantwortlich sind (Ishii *et al.*, 1999; Ludwig *et al.*, 1999b; Gauss *et al.*, 1998; Ludwig *et al.*, 1998; Santoro *et al.*, 1997). Bis heute sind vier Gene bekannt, die wegen der Kanaleigenschaften als *hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide gated (HCN)1-4* bezeichnet werden (Biel *et al.*, 1999; Clapham, 1998). Sie sind eng miteinander verwandt und haben eine Sequenzhomologie von etwa 60 % (Biel *et al.*, 1999; Ludwig *et al.*, 1999a). Für einen funktionellen Kanal lagern sich vier Untereinheiten zusammen, wobei sowohl Homomere als auch Heteromere gebildet werden können (Much *et al.*, 2003; Zagotta *et al.*, 2003). Je nach Zusammensetzung unterscheiden sich die Stromeigenschaften: Die Zeitkonstanten der Aktivierungskinetiken nehmen von HCN1-HCN4 zu: HCN1 (25-300 ms), HCN2 und HCN3 (180-500 ms) und HCN4 (420 ms-30 s) (Biel *et al.*, 2002; Ishii *et al.*, 1999; Ludwig *et al.*, 1999b; Seifert *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 1999). Durch Heteromerisierung können aber auch intermediäre Aktivierungskinetiken gemessen werden (Much *et al.*, 2003). Auch die Modulation durch cAMP unterscheidet sich in den einzelnen Untereinheiten. HCN4 wird am stärksten von cAMP moduliert. HCN2, HCN3 und HCN1 werden weniger stark von cAMP beeinflusst (Stieber *et al.* 2005; Altomare

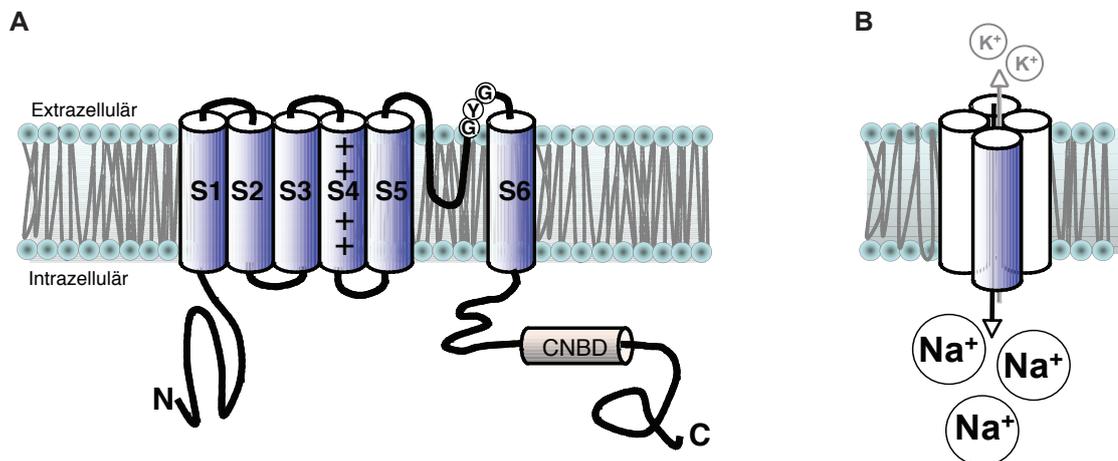


Abb. 3: Topologisches Schema einer HCN-Kanaluntereinheit und eines HCN-Kanals

(A) HCN-Kanaluntereinheiten bestehen aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6), wobei N- und C-Terminus jeweils intrazellulär lokalisiert sind. Positiv geladene Aminosäuren in S4 dienen als Spannungssensor. Zwischen S5 und S6 befindet sich die Porendomäne mit dem Selektivitätsfilter aus den drei Aminosäuren GYG. C-terminal liegt eine Bindestelle für zyklische Nukleotide (CNBD). (B) Vier Untereinheiten lagern sich zu einem funktionellen Kanal zusammen. Dieser ist selektiv für Natrium- und Kaliumionen. Aufgrund der Tatsache, dass der Kanal nahe des Kaliumgleichgewichtspotenzials aktiviert, fällt der Natriumeinwärtsstrom mehr ins Gewicht.

et al. 2001; Kaupp und Seifert, 2001; Santoro und Tibbs, 1999).

Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten werden die HCN-Kanäle zur Superfamilie der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle (K_V -Kanäle) und der durch zyklische Nukleotide gesteuerten Kanäle (CNG-Kanäle) gezählt. Eine Untereinheit der HCN-Kanäle hat höchstwahrscheinlich wie die der K_V -Kanäle sechs Transmembrandomänen (S1-S6), wobei im Bereich des S4-Segments positiv geladene Aminosäuren lokalisiert sind, die als Spannungssensor dienen (Abb. 3 A). Wie bei den K_V -Kanälen bewegt sich der Spannungssensor bei Depolarisation der Zelle nach außen und bei Hyperpolarisation nach innen (Vemana *et al.*, 2004; Männikkö *et al.*, 2002). Dass die Kanäle trotzdem bei entgegengesetzten Membranpotenzialen öffnen, muss folglich auf unterschiedliche Kopplungsmechanismen zwischen Spannungssensor und Aktivierungstor in den beiden Kanälen zurückzuführen sein. Dieser Mechanismus ist aber noch nicht bis ins Detail geklärt und wird in der Literatur diskutiert (Anselmi *et al.*, 2007; Decher *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2001). Zwischen S5 und S6 liegt die Porendomäne mit dem für Kaliumkanäle typischen Selektivitätsfilter aus der Aminosäureabfolge GYG. Neben den Kaliumionen leitet der Kanal auch Natriumionen, wobei die relative Durchlässigkeit P_{Na}/P_K zwischen 0.2 und 0.4 liegt (Kaupp und Seifert, 2001). Dass der Kanal trotzdem hauptsächlich einen Natriumeinwärtsstrom vermittelt, liegt an der Tatsache, dass er nahe am Kaliumumkehrpotenzial aktiviert. Im zytosolischen C-Terminus befindet sich die Bindestelle für zyklische Nukleotide (CNBD), deren Sequenz homolog zu der Bindestelle der CNG-Kanäle ist.

1.4 Kardiales Expressionsmuster der HCN-Kanäle

Das Expressionsmuster und die Expressionsstärke der HCN-Kanaluntereinheiten variieren innerhalb des Herzens und zwischen den Spezies. In humanen Vorhöfen und Kammern konnten HCN2- und HCN4-Untereinheiten auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden (Stillitano *et al.*, 2008). In isolierten Sinusknotenzellen wurde ein F-Strom gemessen, der eine langsame Aktivierungskinetik hat (Verkerk *et al.*, 2007). In Sinusknotenzellen des Kaninchens wurden sowohl HCN1- als auch HCN2- und HCN4-Untereinheiten gefunden (Moroni *et al.*, 2001). Im Herzen der Maus wurde das Expressionsmuster der vier HCN-Untereinheiten auf RNA- (Marionneau *et al.*, 2005; Moosmang *et al.*, 2001) und Proteinebene (Liu *et al.*, 2007) untersucht, wobei insbesondere der Sinusknoten als primärer Schrittmacher von Interesse war. Die dominante Untereinheit in den Schrittmacherzellen ist HCN4. Die

detektierbare mRNA-Menge übersteigt die der anderen Untereinheiten um ein Vielfaches, und das Protein wird sogar als Marker für Sinusknotenzellen verwendet (Mommersteg *et al.*, 2007; Lei *et al.*, 2004). HCN2-mRNA konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Da das Protein jedoch vermehrt zwischen den Myozyten in Bündeln detektiert wurde, postulierte Liu, dass HCN2 hauptsächlich in den Sinusknoten innervierenden Neuronen exprimiert wird (Liu *et al.*, 2007). Die HCN1-Untereinheit wurde nur auf RNA-Ebene im Sinusknoten lokalisiert. In der Immunhistochemie konnte kein Signal detektiert werden. Zusammengefasst wird der I_f in Sinusknotenzellen hauptsächlich von HCN4-Kanälen vermittelt, wohingegen HCN2 und HCN1 eher eine untergeordnete Rolle spielen.

In Vorhofzellen konnten HCN1-, HCN2- und HCN4-Transkripte nachgewiesen werden. Die immunhistochemische Färbung von HCN2 zeigte eine gleichmäßige Verteilung der Untereinheit über das Vorhofgewebe. Die Intensität des HCN4-Signals nimmt im immunologischen Nachweis in der Peripherie des Sinusknotens ab (Lei *et al.*, 2004). Im AV-Knoten dominiert wiederum das HCN4-Transkript. Im Vergleich zu den Sinusknotenzellen wird jedoch nur ein Viertel der HCN4-mRNA-Menge detektiert. Im Ventrikel werden nur Transkripte der HCN2- und HCN4-Untereinheiten beschrieben. HCN3 wurde bis dato noch nicht im Herzen nachgewiesen und scheint dort keine Rolle zu spielen.

1.5 Humane Mutationen in *HCN4*

Bisher wurden vier heterozygote, autosomal dominant vererbte, humane Mutationen in dem für die HCN4-Untereinheit kodierenden Gen beschrieben (Nof *et al.*, 2007; Milanesi *et al.*, 2006; Ueda *et al.*, 2004; Schulze-Bahr *et al.*, 2003). Obwohl die Mutationen in verschiedenen Bereichen der DNA-Sequenz lagen, führen die veränderten Proteine in den Patienten zu einer verlangsamten Herzfrequenz, einer sog. Bradykardie, die in manchen Fällen von weiteren Symptomen begleitet wurde. Im Folgenden werden die einzelnen Mutationen etwas genauer beschrieben:

P543RfsX30 (Schulze-Bahr *et al.*, 2003):

Diese spontane Mutation wurde in einer Patientin mit einer auffälligen Sinusbradykardie (Ruheherzfrequenz bei 41 min^{-1}) und zeitweiligem Vorhofflimmern beschrieben. Im EKG lag die Herzfrequenz bei maximaler Belastung mit 101 min^{-1} deutlich unter dem erwarteten Wert von 165 min^{-1} . Die Sequenzanalyse der Patienten-DNA zeigte eine Basendeletion

an der Position 1631. Die Eliminierung eines Cytosins (C) auf DNA-Ebene führte bei der Transkription zu einer Verschiebung des Leserasters auf RNA-Ebene und zu einem verfrühten Stopcodon. Auf Proteinebene wurde an der Stelle 543 ein Prolin (P) gegen ein Arginin (R) ausgetauscht. Nach 30 weiteren Aminosäuren führte das Stopcodon zum Abbruch des Proteins. Die am C-Terminus abgeschnittene Kanaluntereinheit besaß zwar alle sechs Transmembrandomänen, es fehlte aber die CNBD. In einem heterologen Expressionssystem wurde gezeigt, dass dieses Protein an die Zellmembran transportiert wird und einen funktionellen Kanal bildet. Der makroskopische Strom deaktiviert aber schneller und kann nicht mehr durch intrazelluläres cAMP stimuliert werden. cAMP hatte keinen Effekt auf die Aktivierung der trunkierten Kanaluntereinheit. Bei Koexpression des trunkierten Proteins mit dem Wildtyp-Protein, hatte die Mutante einen dominant-negativen Effekt auf die native Kanaluntereinheit. Heteromere reagierten nicht auf eine Stimulation durch cAMP.

D553N (Ueda *et al.*, 2004):

In der beschriebenen Familie litten die Betroffenen an Sinusknotendysfunktion, fortschreitenden Reizleitungsstörungen und Kammerflimmern ungeklärter Ursache. Die mittlere Herzfrequenz lag in Ruhe bei 37 min^{-1} . Weitere Symptome waren QT-Verlängerung, rezidierende Tachyarrhythmien und wiederkehrende Ohnmachtsanfälle (Synkope). In den Patienten führt ein Basenaustausch von Guanin (G) nach Adenin (A) in Exon 5 zu einer veränderten Aminosäure an der Stelle 553. Auf Proteinebene wird ein Aspartat (D) durch ein Asparagin (N) ersetzt. Die Mutation befindet sich in der Linkerregion zwischen dem sechsten Transmembransegment und der cAMP-Bindedomäne. Die Expression der Mutante im heterologen Expressionssystem zeigte, dass der Transport von HCN4-D553N an die Zellmembran weniger effizient war und dass das Protein in der Zelle zurückgehalten wurde. Bei Koexpression der Mutante mit dem Wildtyp wurden beide Untereinheiten in der Zelle zurückgehalten. Die elektrophysiologische Untersuchung ergab, dass die Stromamplituden der Mutante wesentlich geringer waren als die Stromamplituden des Wildtyps. Dieser Effekt wirkte sich dominant-negativ auf den Wildtyp aus.

S672R (Milanesi *et al.*, 2006):

Bei einer Kopplungsanalyse in einer Familie mit Bradykardie wurde in einem Patienten in Exon 7 von *HCN4* eine Mutation gefunden, die auf Proteinebene an der Stelle 672 zu einem Austausch von Serin (S) zu Arginin (R) führt. Neben der Ruhebradykardie von 43 min^{-1} wurden

keine weiteren Symptome beschrieben. Alle Mutationsträger hatten eine Ruheherzfrequenz, die unter 60 min^{-1} lag. Die veränderte Aminosäure liegt in der cAMP-Bindedomäne, was zu einer Insensitivität für cAMP führen könnte. Im heterologen Expressionssystem wurde gezeigt, dass die Mutante in der gleichen Effizienz an die Membran transportiert wird wie der Wildtyp. Eine veränderte cAMP-Sensitivität konnte in der Mutante jedoch nicht detektiert werden. Sie unterschied sich physiologisch jedoch in der Art, dass die Aktivierung zu negativeren Potenzialen verschoben war. Außerdem deaktivierte die Mutante schneller als die Wildtyp-Untereinheit. Bei Koexpression der beiden Proteine wurde ein intermediärer Phänotyp beobachtet.

G480R (Nof *et al.*, 2007):

Die beschriebene Familie hatte in Ruhe eine mittlere Herzfrequenz von weniger als 55 min^{-1} . Auch die maximale Herzfrequenz im Belastungs-EKG lag in allen untersuchten Patienten unterhalb des erwarteten Wertes. Neben der Bradykardie traten keine weiteren Arrhythmien im EKG auf. Symptome, wie Herzanfälle oder Schwindel, wurden in den Patienten nicht gefunden. Chronotropie und Leistungsfähigkeit waren unverändert. In der Echokardiografie wurde eine normale Herzstruktur und -funktion beobachtet. Die Sequenzanalyse der DNA zeigte einen Basenaustausch von G nach C in Exon vier von *HCN4*. Auf Proteinebene führte das zur Veränderung einer Aminosäure von Glycin (G) nach Arginin (R) an der Position 480. Das ausgetauschte Glycin ist in HCN- und Kaliumkanälen eine hochkonservierte Aminosäure und Teil des Selektivitätsfilters GYG. Im heterologen Expressionssystem wurde gezeigt, dass die Mutante weniger Strom als der Wildtyp leitet. Wird die Mutante zusammen mit der Wildtyp-Untereinheit exprimiert, führt das ebenfalls zu einer Reduktion des Stromes. Der Effekt ist jedoch nicht dominant-negativ. Biotinylierungsversuche zeigten, dass die Mutante in geringerem Ausmaß an die Zelloberfläche transportiert wird, wodurch die Stromverringering erklärt werden könnte.

1.6 Mausmodelle mit HCN-Kanaldefizienz

Um die physiologische Rolle der kardialen HCN-Kanäle zu verstehen, wurden Mausmodelle entwickelt, in denen gezielt die Gene für die HCN-Untereinheiten zerstört oder verändert wurden. Im Folgenden werden die beobachteten kardialen Phänotypen der Mausmodelle kurz zusammengefasst.

1.6.1 *HCN2-Knockout*

In einem globalen und herzspezifischen *Knockout*-Modell des für HCN2 kodierenden Gens wurde der kardiale Phänotyp untersucht (Ludwig *et al.*, 2003). HCN2-defiziente Mäuse haben keine Bradykardie. Stattdessen wurden Sinusknotendysrhythmien beobachtet, die zu einer größeren Varianz in der Herzfrequenz der *Knockout*-Mäusen führten. Elektrophysiologische Untersuchungen in Sinusknotenzellen zeigten eine Reduktion des F-Stroms um 30 %. Das maximale diastolische Potenzial der Schrittmacherzellen war um -5 mV verschoben, was die Ursache für die Arrhythmien in Ruhe sein könnte. Ein herzspezifischer *Knockout* des Gens führte zum gleichen kardialen Phänotyp.

1.6.2 *HCN4-Knockout*

Sowohl ein globaler als auch ein herzspezifischer *Knockout* des Gens für die HCN4-Untereinheit führten zum Absterben im Uterus (Stieber *et al.*, 2003). Die Embryonen wurden nicht älter als 11,5 Tage. Herzen, die vor dem Absterben aus den *Knockout*-Tieren isoliert wurden, hatten eine wesentlich geringere Kontraktionsrate als Kontrollherzen. Untersuchungen der embryonalen Kardiomyozyten zeigten eine Reduktion von I_f um 85 %.

Wurde der *Knockout* des Gens erst in der adulten Maus induziert, zeigten die Mäuse wiederkehrende Sinuspausen (Herrmann *et al.*, 2007). Bei pharmakologischer Stimulation der β -Adrenozeptoren oder bei spontaner Aktivität verringerte sich die Anzahl der Sinuspausen. Eine Erniedrigung der Herzfrequenz wurde jedoch nicht detektiert. PQ-Intervalle und QRS-Dauer waren unverändert. Die elektrophysiologische Analyse der Sinusknotenzelle zeigte eine I_f -Reduktion um 75 %. Der Reststrom wurde wahrscheinlich von den noch vorhandenen HCN2-Untereinheiten vermittelt.

1.6.3 Mutation in der cAMP-Bindestelle von *mHCN4*

In einem Mausmodell wurde gezielt durch einen Aminosäureaustausch (R669Q) die cAMP-Bindestelle zerstört (Harzheim *et al.*, 2008). Homozygote Mäuse starben wie die *HCN4-Knockout*-Mäuse während der Embryonalentwicklung. Die vor E12 gemessenen Herzfrequenzen waren in homo- und heterozygoten Embryonen langsamer im Vergleich zu den Wildtypen. In adulten, heterozygoten Mäusen wurde kein Unterschied in der Herzfrequenz detektiert. Es wurden jedoch sinoatriale Pausen beobachtet.

1.7 Pharmakologischer Block der HCN-Kanäle

Die Verabreichung spezifischer HCN-Kanalblocker führt zu einer Herzfrequenzerniedrigung in verschiedenen Organismen. In der Literatur sind sechs Substanzen beschrieben, die über einen Block der HCN-Kanäle eine spezifische bradykarde Wirkung haben (Büter, 2006): Alinidin (ST 567, Böhringer), Falipamil (AQ-A39, Thomae), Zatebradin (UL-FS 49, Thomae), Cilobradin (DK-AH 269, Thomae), ZD 7288 (ZENECA) und Ivabradin (S 16257, Servier). Von den Substanzen hat ausschließlich Ivabradin ein klinisches Entwicklungsprogramm mit mehr als 5000 Patienten für die Indikation chronisch stabiler Angina pectoris erfolgreich durchlaufen (Lopez-Bescos *et al.*, 2007; Ruzylo *et al.*, 2007; Tardif *et al.*, 2005; Borer *et al.*, 2003) und ist am europäischen Markt als Arzneimittel zugelassen. Ivabradin ist ein selektiver und konzentrationsabhängiger HCN-Kanalblocker. Die Substanz bindet von der intrazellulären Seite an die offene Pore der HCN4-Kanäle und verhindert so den Ionenfluss durch die Kanäle. HCN1-Kanäle werden im geschlossenen Zustand blockiert (Buchi *et al.*, 2006). Dies führt zu einer Verlangsamung der diastolischen Depolarisation, während alle anderen Charakteristika des Aktionspotenzials unverändert bleiben (Thollon *et al.*, 2007; DiFrancesco und Camm, 2004). Im Menschen und in der Maus führt Ivabradin zu einer Reduktion der Herzfrequenz, was den Sauerstoffverbrauch des Herzmuskels verringert. Kontraktionskraft und Relaxationsfähigkeit bleiben unverändert (DiFrancesco und Camm, 2004; Du *et al.*, 2004; Ragueneau *et al.*, 1998).

2 Zielsetzung der Arbeit

Mutationen in dem für die HCN4-Untereinheit kodierenden Gen führen im Menschen zu einer verminderten Herzfrequenz. Die *in vitro* Analyse der Mutanten zeigte, dass jede der beschriebenen Mutationen eine Verminderung des makroskopischen F-Stroms bei diastolischen Membranpotenzialen zur Folge hat. Inwiefern sich dieser Verlust auf die physiologischen Eigenschaften und auf die Schrittmachertätigkeit der humanen Sinusknotenzellen auswirkt, konnte bis jetzt noch nicht untersucht werden. In der medizinischen Forschung werden deswegen häufig Modellorganismen eingesetzt, in denen humane Erkrankungen untersucht werden können. Da bislang noch kein Mausmodell in der Literatur beschrieben ist, das den humanen Phänotyp nachahmt und in dem die Eigenschaften der Sinusknotenzellen untersucht werden konnten, hatte vorliegende Arbeit folgende Ziele:

- (1) Etablierung einer transgenen Mauslinie, die als Modell für eine der humanen Mutationen fungiert. Als Mutation wurde die von Schulze-Bahr (Schulze-Bahr *et al.*, 2003) beschriebene Deletion gewählt, die zu einem Verlust der cAMP-Sensitivität führt. Um die Letalität des cAMP-insensitiven HCN4-*Knockins* zu umgehen, sollte in dieser Arbeit durch das Tet-System eine induzierbare und reversible Transgenexpression gewährleistet werden.
- (2) Elektrophysiologische Analyse von isolierten Sinusknoten- und AV-Knotenzellen. Dabei war insbesondere die Modulation des I_f durch cAMP von Interesse. Des Weiteren sollte die funktionelle Bedeutung des I_f für die Schrittmachertätigkeit des Sinusknotens und des AV-Knotens untersucht werden.
- (3) Untersuchung der Rolle des F-Stroms für die Herzfrequenzregulation durch das autonome Nervensystem in der adulten Maus durch *in vivo* EKG-Telemetrie. Durch

Bestimmung der Herzfrequenz unter basalen Bedingungen und nach pharmakologischer Blockade des autonomen Nervensystems sollten die Auswirkungen des Verlusts der cAMP-Sensitivität des Kanals analysiert werden.

Aus den Erkenntnissen sollten Rückschlüsse auf die Rolle der cAMP-Modulation des F-Stroms für die Sinusknotenfunktion und die Herzfrequenzregulation gezogen werden. Des Weiteren diene das Modell zur Aufklärung des zellulären Phänotyps der humanen Mutation.

3 Material

3.1 Chemikalien, Enzyme und Gebrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Kits und Gebrauchsmaterialien wurden von den Firmen Ambion, Amersham Pharmacia Biotech, Baker, Fluka, GE Healthcare, Gibco/Invitrogen Corporation, Invitex, Invitrogen, Macherey-Nagel, Merck, Millipore, Pierce, Qiagen, Roche und Sigma-Aldrich im Reinheitsgrad "zur Analyse" bezogen.

Enzyme, Molekulargewichtsstandards und Nukleosidtriphosphate stammten von den Firmen Bioline, Invitrogen, MBI Fermentas, New England Biolabs und Promega.

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG synthetisiert und sind unter Punkt 3.10 *PCR-Primer* aufgelistet.

Vor dem Ansetzen der Lösungen und Medien wurde das Wasser über ein Milli-Q Water System (Millipore) entionisiert ().

3.2 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen wurden, sofern nicht anders vermerkt, mit H₂O-Millipore angesetzt und gegebenenfalls autoklaviert.

Blockierlösung (Western Blot): 5 % (w/v) Milchpulver, 0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS

10 x DNA-Probenpuffer (Agarosegele): 20 % (w/v) Ficoll 400, 0,2 % (w/v) Orange G, 0,15 % (w/v) Kresolrot

dNTP-Mix (PCR): 25 mM dATP, 25 mM dGTP, 25 mM dCTP, 25 mM dTTP

Doxyzyklinlösung: 200 µg/ml Doxyzyklin, 0,024 % (w/v) Süßstoff (Natriumzyklamat und Natriumsaccharin)

ECL-Lösung I (Chemilumineszenz): 25 mM Luminol, 0,4 mM p-Cumarsäure, 100 mM Tris-HCl (pH 8,5)

ECL-Lösung II (Chemilumineszenz): 0,02 % (v/v) H₂O₂, 100 mM Tris-HCl (pH 8,5)

Ethidiumbromidlösung (Agarosegele): 10 mg/ml Ethidiumbromid

Injektionspuffer (Pronukleusinjektion): 5 mM Tris (pH 7,4), 0,1 mM EDTA (steril filtriert)

Inkubationslösung (Western Blot): 1 % (w/v) Milchpulver, 0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS

KB-Lösung (*in vitro* Elektrophysiologie): 25 mM D(+)-Glucose, 20 mM KCl, 10 mM KH₂PO₄, 70 mM L-Glutaminsäure, 40 mM Mannitol, 20 mM Taurin, 10 mM EGTA, 10 mM β-Hydroxybutyrat, 0,1 % (w/v) BSA. Der pH-Wert der Lösung wurde mit KOH auf 7,4 eingestellt.

Lysis-Puffer (Ohr): 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,2 % (v/v) Nonidet P-40, 0,2 % (v/v) Tween 20, 0,1 mg/ml Proteinase K

Mg²⁺-Lösung (kompetente Bakterien): 1 mM MgCl₂, 1 mM MgSO₄

Na⁺/Ca²⁺-Lösung (*in vitro* Elektrophysiologie): 10 mM NaCl, 1,8 mM CaCl₂

Niedrig-Ca²⁺/Mg²⁺-Lösung (*in vitro* Elektrophysiologie): 140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 0,2 mM CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄, 50 mM Taurin, 5,5 mM D-Glucose, BSA 1 mg/ml, 5 mM HEPES-NaOH. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 6,9 eingestellt.

10 x PCR-Puffer (Genotypisierung): 200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl

20 x PBS: 3 M NaCl, 161 mM Na₂HPO₄, 39 mM KH₂PO₄

Proteinisolationspuffer (Proteinextraktion): 10 % (v/v) Glycerin, 3 % (w/v) SDS, 62,5 mM Tris (pH 6,8). Dem Puffer wurde ein 1 % (v/v) Proteaseinhibitorcocktail (Sigma) hinzugefügt.

Restriktionspuffer: Für die Restriktionsansätze wurden die vom Hersteller empfohlenen bzw. enzymespezifischen Puffer verwendet.

SAN-Medium (*in vitro* Elektrophysiologie): 70 mM L-Glutamat, 20 mM KCl, 80 mM KOH, 10 mM D-2-Hydroxybuttersäure, 10 mM KH_2PO_4 , 10 mM Taurin, 1 mg/ml BSA, 10 mM HEPES-KOH. Der pH-Wert wurde mit KOH auf 7,4 eingestellt.

Stripping-Puffer (Western Blot): 63 mM Tris (pH 6,8), 2 % (w/v) SDS, 100 mM β -Mercaptoethanol

50x TAE (DNA-Gele): 2 M Tris-Acetat (pH 8,0), 50 mM EDTA, 0,5 M Eisessig

TB-Puffer (kompetente Bakterien): 250 mM KCl, 15 mM CaCl_2 , 10 mM PIPES (pH 6,7), 55 mM MnCl_2 (steril filtriert)

TE-Puffer (DNA-Elution): 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA

Transferpuffer (Western Blot): 5 % (v/v) 20 x NuPAGE Transferpuffer, 20 % (v/v) Methanol

Tyrode-Lösung (*in vitro* Elektrophysiologie): 140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES, und 5,5 mM D-Glukose. Der pH Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

Waschpuffer, PBS-T (Western Blot): 0,05 % Tween 20 in PBS

3.3 Bakterienstämme und Zelllinien

Escherichia coli XL1-Blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44, relA1 lac[F'proAN*

lacI^q ZΔM12Tn10(Tet^r)

HEK293: Humane embryonale Nierenzellen (DSMZ Nr.: ACC305, (*human embryonic kidney*) Braunschweig).

3.4 Nährmedien

3.4.1 Bakterienkultur

Die Nährmedien wurden autoklaviert, auf 55 °C abgekühlt und nach Bedarf mit Ampizillin (Endkonzentration 100 µg/ml) versetzt.

LB-Medium: 1 % (w/v) Select Peptone 140, 1 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt (pH 7,0)

SOB-Medium: 2 % (w/v) Bacto Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,05 % (w/v) NaCl, 5 mM KCl (pH 7,0). Nach dem Autoklavieren wurde sterilfiltriertes MgSO₄ und MgCl₂ zu einer finalen Konzentration von je 10 mM zugegeben.

LB-Anzuchtplatten: Zur Herstellung von Kulturplatten wurden dem jeweiligen Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugegeben. Das Medium wurde auf ungefähr 55 °C abgekühlt und nach Bedarf mit Antibiotikum versetzt. Anschließend wurde das Medium in Petrischalen gegossen.

3.4.2 Zellkultur

DMEM/F12: Für die Routinehaltung der Zellen wurde das Medium mit 10 % fetales Kälberserum (v/v) und 1 % Penstrep-Lösung (v/v) ergänzt.

3.5 Vektoren

pcDNA1/Amp (Invitrogen)

pGemHe-Juel (Das Plasmid ist eine im Polylinker modifizierte Version von pGemHe (Liman

et al. 1992) und wurde freundlicherweise von Arnd Baumann, Forschungszentrum Jülich, zur Verfügung gestellt.)

pTRE-Tight (Clontech)

pWHERE2 v.01 (Invivogen)

3.6 Mauslinien

C57BL/6: Inzucht-Mauslinie (Charles River, Sulzfeld)

α MHC-tTA: Transgene Transaktivatormauslinie (FVB.Cg-Tg(Myh6-tTA)6Smbf/J, Jackson Laboratories, Bar Harbor, MA, USA), die den Transaktivator (tTA) unter der Kontrolle des herzspezifischen Promotors der schweren alpha-Myosinkette (α MHC) exprimiert (Yu *et al.*, 1996).

Tre-G9: Transgene Reportermauslinie (Tg(GFPtetO7lacZ)), die unter der Kontrolle eines bidirektionalen Tre-Elements GFP und β -Galaktosidase exprimiert (Krestel *et al.*, 2001). Die Linie wurde freundlicherweise von P. Seeburg und R. Sprengel (MPI Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Tre-SND2: Transgene Mauslinie (Tg(tethHCN4_P543RfsX30)), die unter der Kontrolle eines Tre-Elements eine cDNA, die für die humane HCN4-Untereinheit kodiert, exprimiert. An der Stelle 1631 führt eine Deletion eines Basenpaares zu einer Verschiebung des Leserahmens und zu einem verkürzten Protein, dem die Bindestelle für zyklische Nukleotide fehlt. Die Linie wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert.

3.7 Molekulargewichtsstandards

3.7.1 DNA-Standard

Hyperladder I (Bioline): Der Marker enthält 14 DNA-Fragmente zwischen 200 bp und 10000 bp mit unterschiedlichen Mengen 20-100 ng zum Abschätzen von DNA-Mengen anhand der Intensität.

3.7.2 Proteinstandards

MultiMark Multi-Colored Standard (Invitrogen): Der Marker enthält neun Proteine, die je nach Gelart ein unterschiedliches apparentes Molekulargewicht besitzen. Anhand der Banden konnte die Größe des nachzuweisenden Proteins eingeordnet werden.

Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas): Der Marker enthält zehn Proteine, die je nach Gelart ein unterschiedliches apparentes Molekulargewicht besitzen. Anhand der Banden konnte die Größe des nachzuweisenden Proteins eingeordnet werden.

3.8 Kits

illustra, GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)

Invisorb Spin Tissue Mini Kit (Invitex)

NucleoSpin Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel)

Nucleobond PC 100 (Macherey-Nagel)

Megaprime DNA Labelling Systems (Amersham)

mMessage mMachin T7 Kit (Ambion)

Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce)

3.9 Filter

Mikrodialysefilter (Millipore): Ø 13 mm, Porengröße 0,025 µm

Faltenfilter (Macherey-Nagel): Ø 12,5 cm

3.10 PCR-Primer

3.10.1 Klonierungsprimer

HCN4_54nc: 5'- TCC TCC GCG GAG TCA TGC AG -3'
HCN4-N-HA_c: 5'- CCC AAG CTT CCA CCA TGT ACC CCT ACG ACG TGC CCG
ACT ACG CCG ACA AGC TGC CGC CGT CCA TG -3'
HCN4_4nc: 5'- GCC GCG CCT CCC TCC ACT TTG ATA -3'
Hind-HA_c: 5'- CCC AAG CTT CCA CCA TGT AC -3'

3.10.2 Mutationsprimer

HCN4-52-mt_c: 5'- TCC TTT CAC AAG CTT CGC CCG ACA CCC GGC AGC GCA
TC - 3'
HCN4-mt_nc: 5'- TGC CGG GTG TCG GGC GAA GCT TGT GAA AGG ACA TGT
AC-3'
HCN4_24c: 5' - AAG CTG GTT CAT GGT AGA TTT CA- 3'
HCN4_36nc: 5'- TCG GCC CTC ACG CTG GCT GTG - 3'

3.10.3 Genotypisierungsprimer

Primer zum Nachweis des Transaktivators

tTa_6c: 5'- CGC TGT GGG GCA TTT TAC TTT AG -3'
tTA_7nc: 5'- CAT GTC CAG ATC GAA ATC GTC -3'

Primer zum Nachweis des endogenen T-Zellrezeptors als Kontrollreaktion

Terd_1: 5'- CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG -3'
Terd_2: 5'- GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT -3'

Primer zum Nachweis des humanen HCN4-Kanals

HCN4-PCR_1c 5'- GGC ATG TCC GAC GTC TGG CTC AC -3'
HCN4-PCR_2nc 5'- TCA CGA AGT TGG GGT CCG CAT TGG -3'

3.10.4 Sequenzierungsprimer

Nach der *in vitro* Mutation und nach jedem Klonierungsschritt wurden die entstandenen Plasmide bzw. Konstrukte sequenziert. Die verwendeten Primer sind im Folgenden aufgelistet:

Sequenzierung nach Einfügen des HA-Tags:

T7_nc: 5'- AAT ACG ACT CAC TAT AGG G -3'

Sequenzierung nach Einfügen der Mutation:

HCN4_24c: 5'- AAG CTG GTT CAT GGT AGA TTT CA -3'
HCN4_36nc: 5'- TCG GCC CTC ACG CTG GCT GTG -3'
HCN4_33nc: 5'- GAA GTT GGG GTC CGC ATT GG -3'
HCN4_48nc: 5'- AAT GCG GTC CAG GCG GTC CA -3'
HCN4_38nc: 5'- GGA GCT TGT GAA AGG ACA TG -3'
HCN4-PCR_1c: 5'- GGC ATG TCC GAC GTC TGG CTC AC -3'

Sequenzierung nach Umklonierung in pWTT1:

pWhere_2rev: 5'- AGT GGG GTG GCA GGT ATT AG -3'
HCN4_54nc: 5'- TCC TCC GCG GAG TCA TGC AG -3'

3.11 Antikörper

3.11.1 Primäre Antikörper

Anti-Calsequestrin: polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gerichtet gegen Calsequestrin der Spezies Hund, Mensch, Schaf und Nagetiere (Affinity Bioreagents)
Verdünnung: 1:2500 für Westernblot

Anti-HA: monoklonaler Antikörper aus der Ratte, Klon 3F10, gerichtet gegen das Epitop YPYDVPDYA (Roche Diagnostics)
Verdünnung: 1:500 für Westernblot

Anti-HCN4: polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, gerichtet gegen das Epitop HGHLHDSAEERRLIAEGDASPGEDRTPPGLAAPERP, das den Resten 119 bis 155 des humanen HCN4 entspricht (Alomone).
Verdünnung: 1:200 für Westernblot

3.11.2 Sekundäre Antikörper

Anti-Kaninchen

HRP: aus Ziege (Vector Laboratories Inc.)
Verdünnung: 1:5000

Anti-Ratte HRP: F(ab'2) Fragment aus Ziege (Dianova)
Verdünnung: 1:1000

4 Methoden

4.1 Handhabung von Bakterienstämmen und Zellkulturen

4.1.1 Kultivierung von Bakterienstämmen

(Sambrock und Russel, 2001)

Mit einer ausgeglühten Impföse wurde aus bei -80 °C gelagerten Glycerin-Dauerkulturen (25 % (v/v) Glycerin in LB-Medium) ein Aliquot entnommen und auf LB-Platten, die bei Bedarf Ampizillin als Selektionstionsmarker enthielten, ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37 °C kultiviert und bis zur Inokkulation von Flüssigkulturen bei 4 °C gelagert.

4.1.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

(Inoue *et al.*, 1990)

E. coli XL1-Blue Bakterien wurden aus einer Glycerin-Dauerkultur auf einer LB-Platte ausgestrichen und ü. N. bei 37 °C kultiviert. Mit einer vereinzelt Kolonie wurden 2 ml LB-Medium angeimpft und ebenfalls ü. N. inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 250 ml SOB-Medium mit je 2,5 ml sterilfiltriertem 1 M MgCl₂ und 1 M MgSO₄ versetzt und 500 µl von der Bakterienvorkultur hinzugegeben. Die Zellen wuchsen bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von maximal 0,45. Die Bakterien wurden anschließend 10 min auf Eis inkubiert und bei 2500 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Es erfolgte ein Waschschrift des Pellets mit 80 ml TB-Puffer. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 20 ml TB-Puffer resuspendiert und 1,5 ml DMSO zugegeben, so dass die Endkonzentration bei 7 % lag. Nach einer zehnminütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen in 200 µl Aliquots bei -80 °C eingefroren und gelagert.

4.1.3 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien

(Sambrock und Russel, 2001)

Für die Transformation des *E. coli* XL-1-Blue Stammes wurden 100 µl der kompetenten Zellen mit 50-100 ng Plasmid-DNA oder 10 µl eines Ligationsansatzes (4.2.2.4 *Ligation von*

DNA-Fragmenten) 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein zweiminütiger Hitzeschock bei 42 °C und anschließende Kühlung auf Eis für 5 min. Die transformierten Zellen wurden auf Nährplatten (3.4 *Nährmedien*) ausgestrichen und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

4.1.4 Routinehaltung von HEK293-Zellen

Die Zellen wurden in 20 ml DMEM/F-12 (Gibco, Invitrogen Corporation) ergänzt durch 10 % fetales Kälberserum (v/v) und 1 % Penstrep-Lösung (v/v) in 80 cm² großen Zellkulturflaschen (Nunc) kultiviert. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂, und 95 % Luftfeuchtigkeit. Waren die Zellen dicht gewachsen, wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 5 ml Trypsin/EDTA (Gibco, Invitrogen Corporation) überschichtet. Nach 2-3 min wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche durch Klopfen gelöst und die Reaktion durch Zugabe von 5 ml Medium abgestoppt. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 1200 rpm wurde das Sediment in frischem Medium resuspendiert und die Zellkonzentration mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Für die fortlaufende Kultur wurden die Zellen in einer Dichte von 4×10^4 /ml ausgesät und im Brutschrank bis zu einer Konfluenz von 80-100 % inkubiert.

4.1.5 Transfektion von HEK293-Zellen

(Fugene6 Transfection Reagent, Roche, Herstellerangaben)

In einer 35 mm Zellkulturschale wurden 1×10^5 Zellen ausgesät und ü. N. inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden pro Zellkulturschale 97 µl DMEM (Gibco/Invitrogen Corporation) mit 3 µl Fugene6 vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Dazu wurden 4 µg des Plasmids (pcDNA1/Amp mHCN4 bzw. pcDNA1/Amp HA-hHCN4-1631delC) gegeben und 20 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit 2 ml frischem Medium versehen und mit dem DNA-Mix beträufelt. Die Reaktion wurde ü. N. im Brutschrank inkubiert.

4.2 DNA-Methoden

4.2.1 Präparation von DNA

4.2.1.1 Plasmid-Mini-Präparation aus 2 ml Bakterienkulturen

(Macherey-Nagel, NucleoSpin Plasmid QuickPure, Handbuch 2006)

2 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte angeimpft. Sowohl Platte als auch Medium enthielten zur Selektion Ampizillin. Die Inkubation erfolgte ü. N. bei 37 °C in einem Rotationsschüttler bei 200 rpm. Von den Bakterienkulturen wurden 1,5 ml in ein Eppendorfgesäß überführt und 30 s bei 16000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Die Elution erfolgte durch zweiminütige Zentrifugation bei 15000 x g in einem Volumen von 50 µl AE-Puffer.

4.2.1.2 Plasmid-Midi-Präparation aus 50 ml Bakterienkulturen

(Macherey & Nagel, Nucleobond PC 100; Handbuch, 2005)

50 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie des Plasmid tragenden Bakterienstammes angeimpft. Sowohl Platte als auch Medium enthielten zur Selektion Ampizillin. Die Kultur wurde ü. N. bei 37 °C und 200 rpm in einem Rotationsschüttler inkubiert. Die Bakterien wurden durch zehninütige Zentrifugation bei 8000 x g und 4 °C pelletiert und das Pellet nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 5 ml 50 °C warmen Puffer N5. Anschließend erfolgte die Fällung nach Vorschrift. Nach Trocknen des Pellets wurde es in TE-Puffer resuspendiert und die DNA-Konzentration bestimmt (4.2.6 *Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen*). Die Qualität der Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsenzymanalyse verifiziert (4.2.2.1 *Restriktionshydrolyse von DNA*).

4.2.1.3 Isolation genomischer DNA aus Mäuseschwänzen

(Invitek, Invisorb Spin Tissue Mini Kit, Handbuch 2001)

Im Alter von drei Wochen wurden die Jungmäuse abgesetzt und mit einer Ohrmarkierung kodiert. Bei Bedarf wurden 3-4 mm der Schwanzspitze mit einem Skalpell ohne Narkose abgetrennt. Der Schwanz wurde kurz oberhalb der Amputationsstelle zwischen zwei Fingern leicht komprimiert, um ein Nachbluten zu verhindern. Zur blutstillenden Versorgung wurde die Wunde mit Silbernitrat (Höllenstein-Ätztift) oder medizinischem Gewebekleber behandelt. Die Biopsie wurde bis zur DNA-Isolation bei -20 °C gelagert.

Zum Genotypisieren wurde aus dem Gewebe die DNA nach Angaben des Herstellers isoliert. Zum Eluieren wurde der Elutionspuffer auf 52 °C aufgewärmt. Anschließend wurden 50 µl des Puffers auf die Säule gegeben, 3 min inkubiert und durch Zentrifugieren eluiert. 2 µl des Lysats wurden für die Genotypisierungs-PCR eingesetzt.

4.2.1.4 Isolation genomischer DNA aus Mäuseohr-Biopsien

Für die Genotypisierung der Tiere wurde aus den bei der Ohr-Kodierung anfallenden Ohrmarkierungen DNA isoliert, indem sie mit 50 µl Lysis-Puffer (Ohr) versetzt und ü. N. bei 52 °C im Schüttler inkubiert wurden. 2 µl des Lysats wurden für die Genotypisierung mittels PCR eingesetzt.

4.2.2 Enzymatische Modifikationen von DNA

4.2.2.1 Restriktionshydrolyse von DNA

(Sambrook und Russel, 2001)

Die Plasmid-DNA wurde mit der erforderlichen Menge an Enzym (MBI Fermentas, New England Biolabs) 1-2 h nach Herstellerangaben inkubiert. Durch Zugabe von 5-fach konzentriertem DNA-Probenpuffer wurde die enzymatische Reaktion gestoppt und die DNA gelelektrophoretisch (4.2.4 *Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese*) aufgetrennt.

Wurde mit zwei Enzymen gleichzeitig geschnitten, wurden die Bedingungen entsprechend der Herstellerangaben modifiziert. Waren die Enzympuffer nicht kompatibel, erfolgte zwischen den beiden Reaktionen eine Dialyse der DNA (4.2.7 *Mikrodialyse von DNA*).

4.2.2.2 Auffüllreaktion überhängender 5'-Enden

(Sambrook und Russel, 2001)

Zur Ligation nichtkompatibler überhängender 5'-Enden wurden diese nach Hitzeinaktivierung des Restriktionsansatzes mit DNA-Polymerase I (1U Klenow-Fragment/µg DNA (MBI Fermentas, 30 min, 37°C) aufgefüllt, so dass glatte Enden entstanden.

4.2.2.3 Dephosphorylierung von Vektoren

(Sambrook und Russel, 2001)

Nach der Restriktion wurde der Vektor mit CIAP (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*) bei 37 °C für 30 min dephosphoryliert, um eine Religation zu verhindern. Es wurde 1 U pro 50 pmol 5'-Enden eingesetzt.

4.2.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

(Sambrook und Russel, 2001)

Zum Ligieren wurden 10-30 ng der linearisierten Vektor-DNA mit dem dreifachen molaren Überschuss an Fragment-DNA, 1 U T4-Ligase und der entsprechenden Menge an Ligationspuffer vermischt und mit H₂O-Millipore auf ein Reaktionsvolumen von 10-20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 20 min bei 37 °C inkubiert. Bei Ligationen, in denen der Vektor und das Fragment schwach konzentriert waren, wurde der Reaktionsansatz mit

Polyethylenglycol auf das Endvolumen aufgefüllt, um das effektive Reaktionsvolumen zu verringern.

4.2.3 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Sequenzanalysen wurden von der ZMNH-Servicegruppe *Sequenzierung* mit dem ABI PRISM BigDye Primer Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) und dem ABI 377 DNA-Sequenziergerät (Perkin-Elmer) durchgeführt. Die Proben wurden dafür wie folgt vorbereitet: 250-500 ng DNA wurden mit 1 µl 5 pM Sequenzierprimer vermischt und mit H₂O-Millipore auf ein Endvolumen von 8 µl aufgefüllt.

4.2.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese

(Sambrook und Russel, 2001)

DNA-Fragmente wurden in horizontalen 1-2 %igen Agarosegelen in 1 x TAE-Puffer aufgetrennt. Zur Detektion der DNA wurde Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 600 ng/ml zugegeben. Die Elektrophorese erfolgte Gelkammern (Peqlab, Erlangen) mit 1 x TAE als Laufpuffer bei 100 V. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer (1/10 des Endvolumens) versetzt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Zur Dokumentation der Gele wurde ein elektronisches Bilderfassungsgerät, Gel Doc 2000 System (BioRad), verwendet.

4.2.5 DNA-Isolation aus Agarosegelen

(illustra, GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare, Handbuch 2006)

Zum Aufreinigen von DNA-Fragmenten, z. B. nach einem Restriktionsverdau oder nach einer PCR, wurde der Ansatz mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese (*4.2.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese*) in die einzelnen Fragmente aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde die gewünschte Bande bei 366 nm aus dem Agarosegel geschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß transferiert. Die Aufreinigung der DNA erfolgte nach Herstellerangaben mit dem GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). Die DNA wurde in 50 µl TE-Puffer eluiert und anschließend die Reinheit der DNA durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

4.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

4.2.6.1 Fotometrische Konzentrationsbestimmung

(Sambrook und Russel, 2001)

Nach einer Midipräparation wurde die DNA-Konzentration fotometrisch mit dem GeneQuant-RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech) bei 260 nm gegen eine Wasserreferenz bestimmt. Bei allen Proben wurde zusätzlich die Extinktion bei 280 nm gemessen. Der

Quotient (260 nm/280 nm) beschreibt die Reinheit der DNA und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

4.2.6.2 DNA-Konzentrationsbestimmung durch Agarosegeldetektion

Waren die Konzentrationen geringer, wurde ein Aliquot der DNA-Probe zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard (Hyperladder I) elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Vergleichen der Bandenintensität mit den Banden des Markers, deren Konzentrationen bekannt waren, konnte die Konzentration abgeschätzt werden.

4.2.7 Mikrodialyse von DNA

Waren bei einem Doppelverdau die Pufferbedingungen der Restriktionsenzyme nicht kompatibel, wurde die DNA zunächst mit einem Enzym verdaut. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf einen Mikrodialysefilter (Millipore) gegeben und 20 min gegen H₂O-Millipore dialysiert. Danach erfolgte der zweite Verdau.

4.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1985)

Mit Hilfe der PCR lassen sich DNA-Fragmente *in vitro* enzymatisch vervielfältigen. Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden entweder in einem Trio-Block (Biometra Headed Lid), einem Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research), einem GeneAmp PCR System 2700 oder einem 2720 Thermal Cycler (beide von Applied Biosystems) unter Verwendung eines Gesamtvolumens von 50 µl durchgeführt. Im Folgenden werden die verwendeten Protokolle detailliert beschrieben.

4.2.8.1 Standard-PCR

Mit einer Standard-PCR wurden DNA-Fragmente für Klonierungen amplifiziert und der HA-Tag angefügt. Um spontane Mutationen zu minimieren, wurde eine korrekturlesende Polymerase (*Pfu Turbo*, Stratagene) verwendet. Der PCR-Ansatz war wie folgt:

	<u>Menge bzw. Konzentration</u>	<u>Volumen in µl</u>
Plasmid-DNA	20-50 ng	≥ 1,0
Oligonukleotid 1	50 µM	0,5
Oligonukleotid 2	50 µM	0,5
dNTPs	25 mM	0,5
<i>Pfu Turbo</i> -PCR-Puffer	10 x	5,0
<i>Pfu Turbo</i> -Polymerase	1-2 U	0,4
H ₂ O-Millipore		add. 50,0

Bei Amplifizierung von DNA-Fragmenten mit hohem GC-Gehalt wurde der Standardansatz um 5 % (v/v) DMSO erweitert. Das Programm wurde nach folgendem Protokoll an die Schmelztemperatur (T_m) der Primer und an die Länge des gewünschten Fragments angepasst:

Prädenaturierung:	95 °C	5,0 min	
Denaturierung:	95 °C	0,5 min] x 30
Hybridisierung	$T_m - 4^\circ\text{C}$	1,0 min	
Elongation	72 °C	1,0 min/kb	
Synthese	72 °C	10,0 min	

Hatten die Oligonukleotide unterschiedliche Schmelztemperaturen, wurde die Hybridisierungstemperatur mit der niedrigeren Schmelztemperatur errechnet. Nach der Synthese wurde der Reaktionsansatz bis zum weiteren Bearbeiten auf 4 °C gekühlt.

4.2.8.2 Genotypisierung mittels PCR

Um den Genotyp der Mäuse zu bestimmen, wurde mit spezifischen Primern das in die genomische DNA integrierte Transgen vervielfältigt. Als Ausgangsmaterial dienten jeweils 2 µl der isolierten genomischen DNA (*4.2.1.3 Isolation genomischer DNA aus Mäuseschwänzen* und *4.2.1.4 Isolation genomischer DNA aus Mäusohr-Biopsien*). Von den PCR-Ansätzen wurden 10 µl mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Die Reaktionszusammensetzungen und die verwendeten Programme sind im Folgenden für die einzelnen Mauslinien aufgelistet. Bei doppelt transgenen Tieren wurde in zwei separaten Ansätzen auf das jeweilige Transgen getestet.

MHCA-tTA:

Die DNA-Sequenz des Transaktivators wurde mit den Oligonukleotiden tTA_6c und tTA_7nc (siehe 3.10 PCR-Primer) nachgewiesen. Zur Qualitätskontrolle der genomischen DNA wurde zusätzlich eine PCR auf eine endogene Sequenz, die für den konservierten Teil der Delta-Kette des T-Zell Rezeptors kodiert, durchgeführt. Die dafür verwendeten Primer waren Terd_1 und Terd_2.

	<u>Menge bzw. Konzentration</u>	<u>Volumen in µl</u>
genomische DNA		2,0
tTA_6c	50 µM	0,5
tTA_7nc	50 µM	0,5
Terd_1	20 µM	0,5
Terd_2	20 µM	0,5
MgCl ₂	25 mM	4,0
DMSO		2,5
dNTPs	25 mM	0,5
PCR-Puffer	10 x	5,0
Taq-Polymerase	1-2 U	0,4
H ₂ O-Millipore		add. 50,0

Als Programm wurde eine sog. *touch-down* PCR gewählt, deren Hybridisierungstemperatur bei jedem Zyklus um 0,5 °C verringert wurde:

Prädenaturierung:	94 °C	3,0 min	
Denaturierung:	94 °C	35 s] x 12
Hybridisierung	64°C-0,5 °C/Zyklus	45 s	
Elongation	72 °C	45 s	
Denaturierung:	94 °C	35 s] x 25
Hybridisierung	58 °C	30 s	
Elongation	72 °C	45 s	
Synthese	72 °C	10,0 min	

Das Kontrollfragment, das bei intakter Template-DNA in jeder Probe amplifiziert wurde, hatte eine Größe von 200 bp. Das tTA-Fragment, das nur in den transgenen Tieren zu amplifizieren war, hatte 450 bp.

Tre-IH-SND2:

Die Tiere der Linie Tre-IH-SND2 wurden mit den Primern HCN4-PCR_1c und HCN4-PCR_2nc genotypisiert. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze war wie folgt:

	<u>Menge bzw. Konzentration</u>	<u>Volumen in μl</u>
genomische DNA		2,0
HCN4_PCR_1c	50 μ M	0,5
HCN4_PCR_2nc	50 μ M	0,5
MgCl ₂	25 mM	4,0
DMSO		2,5
dNTPs	25 mM	0,5
PCR-Puffer	10 x	5,0
<i>Taq</i> -Polymerase	1-2 U	0,4
H ₂ O-Millipore		add. 50,0

Das PCR-Programm war ein Standardprogramm:

Prädenaturierung:	95 °C	5,0 min	
Denaturierung:	95 °C	0,5 min] x 30
Hybridisierung	60 °C	0,5 min	
Elongation	72 °C	0,5 min	
Synthese	72 °C	5,0 min	

In transgenen Tieren konnte ein Fragment von ungefähr 350 bp amplifiziert werden.

Tre-G9:

Um die Indikatorlinie zu genotypisieren, wurde ein DNA-Fragment mit den Oligonukleotiden GFP_12 und GFP_13 amplifiziert. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze war wie folgt:

	<u>Menge bzw. Konzentration</u>	<u>Volumen in μl</u>
genomische DNA		2,0
GFP_12c	50 μ M	1,0
GFP_13nc	50 μ M	1,0
MgCl ₂	25 mM	4,0
DMSO		2,5
dNTPs	25 mM	0,5
PCR-Puffer	10 x	5,0
<i>Taq</i> -Polymerase	1-2 U	0,4
H ₂ O-Millipore		add. 50,0

Das PCR-Programm war ein Standardprogramm:

Prädenaturierung:	95 °C	5,0 min	
Denaturierung:	95 °C	0,5 min] x 30
Hybridisierung	55 °C	0,5 min	
Elongation	72 °C	1,0 min	
Synthese	72 °C	5,0 min	

In transgenen Tieren konnte ein Fragment von ungefähr 520 bp amplifiziert werden.

4.2.8.3 *In vitro* Mutagenese durch überlappende PCR

Zum Deletieren des Basenpaares in der Sequenz des humanen *HCN4* wurde eine überlappende PCR durchgeführt. Als Mutationsprimer wurden komplementäre Primer synthetisiert, denen beiden an der entsprechenden Stelle das Nukleotid fehlte: HCN4-mut_nc und HCN4-mut_c. Des Weiteren wurde mit diesen Primern eine zusätzliche *Hind*III-Schnittstelle eingefügt. Die Oligonukleotide wurden in zwei Reaktionsansätzen mit Primern kombiniert, die komplementär zu nahe gelegenen Sequenzen waren: HCN4_24c und HCN4_36nc. Als Matrize diente pcDNA1/Amp hHCN4 (siehe 8.2.2 *pcDNA1/Amp hHCN4*). Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden aufgereinigt und als Template in einen

neuen Reaktionsansatz gegeben. Die Amplifikation erfolgte im zweiten Schritt nur mit den flankierenden Oligonukleotiden. Das entstandene Fragment wurde aufgereinigt. Als PCR-Programm diente eine Standard-PCR.

4.2.8.4 Herstellung einer hHCN4 spezifischen Sonde

(Stratagene, *PfuTurbo* DNA Polymerase, Herstellerinformationen; Amersham, Megaprime DNA Labelling Systems, Herstellerinformationen)

Für die radioaktive Markierung der RNA musste eine für das Transgen spezifische Sonde synthetisiert werden. Dafür wurde auf der Plasmid-DNA von pcDNA1/Amp-hHCN4 eine PCR mit einer korrekturlesenden Polymerase (*PfuTurbo*, Stratagene) durchgeführt. Als Programm diente das gleiche Programm, das für die Genotypisierung der Linie Tre-IH-SND2 gewählt wurde (siehe 4.2.8.2 *Genotypisierung mittels PCR*). Die Amplifikationsprimer waren HCN4-PCR_1c und HCN4-PCR_2nc. Das PCR-Fragment wurde aufgereinigt. Die radioaktive Markierung erfolgte mit dem Megaprime DNA Labelling Systems Kit (Amersham).

4.3 RNA-Methoden

4.3.1 *In vitro* Synthese von cRNA

(Ambion, mMessage mMachine T7 Kit, Handbuch 2007)

Für die *in vitro* Synthese der cRNA wurden 10 µg des Vektors pGemHe-Juel-HA-hHCN4 mit *NheI* geschnitten. Die linearisierte DNA wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, um den Verdau zu kontrollieren. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung der DNA aus dem Agarosegel. Von der linearisierten Plasmid-DNA wurden 2 µg für die RNA-Synthesereaktion eingesetzt. Reaktionspuffer, Nuklease freies Wasser, 2x NTP/CAP und Enzym-Mix wurden in den vom Hersteller empfohlenen Mengen verwendet. Der gesamte Reaktionsansatz wurde 2 h bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl DNase und einer erneuten Inkubation bei 37 °C für 15 min wurde die Plasmid-DNA verdaut. Die Reaktion wurde mit je 30 µl Nuklease freiem Wasser und LiCl gestoppt und die RNA für 3 h bei -20 °C gefällt. Anschließend erfolgte eine 15 minütige Zentrifugation bei 20000 x g und 4 °C, um die RNA zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand entfernt. Das Pellet wurde getrocknet und anschließend in 20 µl Nuklease freiem Wasser aufgenommen.

4.3.2 RNA Isolation aus Mausherzen

(Invitrogen, Trizol Reagent, Handbuch 2007)

Die zu untersuchenden Tiere wurden mit Isofluran betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Das Herz wurde so schnell wie möglich präpariert, in eiskaltem PBS gewaschen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur RNA Isolation wurde das Gewebe bei -80 °C gelagert.

Das tiefgefrorene Gewebe wurde mit einem Mörser und Pistill zermahlen und in ein Homogenisatorgefäß (Kontess Glass CO) überführt. Es wurde in 1 ml Trizol Reagenz aufgenommen und mit einem Teflonstößel homogenisiert. Das Gemisch wurde dann 15 min bei RT inkubiert und anschließend das unlösliche Material durch eine Zentrifugation für 10 min bei 12000 x g und 4 °C abgetrennt. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und mit 200 µl Chloroform versetzt. Die Proben wurden für 15 s geschüttelt und anschließend bei RT für 3 min inkubiert. Durch Zentrifugation bei 12000 x g und 4 °C für 15 min wurden die Phasen in die Chloroform-, die Inter- und die Wasserphase getrennt. Die wässrige Phase, die die RNA enthielt, wurde vorsichtig abgenommen und in eine frisches Eppendorfgefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol wurde die RNA präzipitiert und durch 10 minütige Zentrifugation bei 12000 x g und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 75 %igem Ethanol gewaschen und die Zentrifugation wiederholt. Nach dem Trocknen des Pellets wurde die RNA in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

4.3.3 RNA Konzentrationsbestimmung

(Agilent Technologies, RNA 6000 Nano Assay, Handbuch 2003)

Zunächst wurden sowohl RNA 6000 Nano Gel Matrix als auch RNA 6000 Nano Dye Konzentrat mindestens für 30 min auf RT erwärmt. Das Gel wurde vorbereitet, indem 550 µl auf eine Säule gegeben und für 10 min bei 1500 x g zentrifugiert wurden. Anschließend wurde es in 65 µl aliquotiert. Zu je einem Aliquot wurde 1 µl des RNA 6000 Nano Dye Konzentrats gegeben, gut gemischt und für 10 min bei 13000 x g und RT zentrifugiert. 9 µl des Gel-Dye Mix wurden in die vorgesehene Vertiefung auf einem RNA Nano LabChip pipettiert und für 30 s mit der zum Kit gehörenden Füllstation unter Druck gesetzt. Die beiden Vertiefungen auf dem Chip, die zusätzlich für den Gel-Dye Mix markiert waren, wurden ebenfalls mit 9 µl befüllt. In alle übrigen Vertiefungen wurden 5 µl RNA 6000 Nano Marker gegeben. Sowohl der RNA-Marker als auch die zu messenden Proben wurden für 2 min bei 70 °C denaturiert und anschließend je 1 µl in die dafür bestimmten Vertiefungen auf dem Chip pipettiert. Je nach Art der RNA wurde das Messprogramm ausgewählt. Nach dem Lauf konnte sowohl die RNA-Konzentration als auch die Qualität der RNA abgelesen werden.

4.3.4 Auftrennung von RNA durch Gelelektrophorese

(Sambrook und Russel, 2001)

1 % (w/v) Agarose wurde in 1 x MOPS durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 50 °C wurden Formaldehyd und Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 2,2 M bzw. 600 ng/ml zugegeben. Die Lösung wurde in eine Gelkammer gegossen und mit einem Kamm versehen, um beim Erkalten Taschen zu formen. Pro Tasche wurden 5 µg der zu untersuchenden RNA mit 50 % (v/v) Loading Dye (Fermentas) vermischt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben kurz zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese lief 3 h bei 80 V in 1 x MOPS. Zum Abschätzen der Größen wurde ein Fluoreszenzlineal bei der Bilderfassung neben das Gel gelegt.

4.3.5 Transfer der RNA auf eine Nylon-Membran

(Sambrook und Russel, 2001)

Vor dem Transfer wurde das Gel kurz mit DEPC-Wasser gewaschen und anschließend für 20 min in 0,05 M NaOH inkubiert. Danach wurde es für 40 min in 20 x SSC äquilibriert. Über einen Kapillarblot wurde die RNA auf eine Nylon-Membran transferiert, wobei der Blot wie folgt aufgebaut wurde: Whatman-Papier, Gel, Nylon-Membran, zweimal Whatman-Papier, Papiertücher. Das unterste Whatman Papier hing seitlich in den Transferpuffer (20 x SSC). Der gesamte Blot wurde mit einem Gegenstand beschwert und ü. N. bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurde die RNA durch 1 h Inkubation bei 80 °C auf der Membran fixiert und bis zur Hybridisierung zwischen Whatman Papier bei RT gelagert.

4.3.6 Hybridisierung der RNA mit spezifischer Sonde

(Sambrook und Russel, 2001)

10 ml Prähybridisierungspuffer wurden auf 68 °C erwärmt und mit frisch denaturiertem (5 min, 95 °C) Heringssperma versetzt. Die Membran wurde in eine Rollflasche (Schott) überführt und mit dem Prähybridisierungspuffer 2-3 h bei 68 °C auf einem Rollrad im Hybridisierungssofen (Amersham Life Science) inkubiert. Die radioaktiv markierte Sonde (siehe 4.2.8.4 *Herstellung einer hHCN4 spezifischen Sonde*) wurde für 5 min bei 95 °C denaturiert und zu dem Prähybridisierungsmix gegeben. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 16-20 h bei 68 °C.

Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung entfernt und die Membran 20 min bei RT mit 1 x SSC, 0,1 % SDS gewaschen. Anschließend erfolgten zwei weitere Waschschrte bei 68 °C mit 0,5 SSC und 0,1 % SDS. Die Membran wurde getrocknet und in Frischhaltefolie gelagert. Anschließend wurden die Signale mit einem Phosphoimager oder einem Film (Kodak Biomax MR) detektiert. Die Expositionsdauer variierte zwischen 2-4 h auf dem Phosphoimager und zwischen 3-7 Tagen auf dem Film bei -80 °C.

4.4 Protein-Methoden

4.4.1 Isolation von Proteinen aus transfizierten Zellen

Von den transfizierten Zellen wurde das Nährmedium abgenommen. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, mit Lysispuffer überschichtet und mit einem Zellschaber von der Plastikschaale gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und auf einem Rollrad für 2 h bei 4 °C inkubiert. Durch eine Zentrifugation wurden die Zelltrümmer abgetrennt. Der Überstand, in dem die Proteine gelöst waren, wurde für Western Blot Analysen verwendet.

4.4.2 Extraktion von Proteinen aus Mausherzen

Die Herzen wurden wie bei der RNA Isolation beschrieben (4.3.2 *RNA Isolation aus Mausherzen*) präpariert und bis zur Proteinisolation bei -80 °C gelagert. Das tiefgefrorene Gewebe wurde mit einem Mörser und Pistill zermahlen und in ein Homogenisatorgefäß (Kontess Glass CO) überführt. Es wurde in 500 ml Proteinisolationsspuffer aufgenommen und mit einem Teflonstößel homogenisiert. Anschließend wurde die Lösung 10 min bei 95 °C gekocht. Dazwischen wurde einmal gut gemischt. Das unlösliche Material wurde abzentrifugiert (15 min, 13000 x g, RT) und der Überstand in ein frisches Gefäß überführt.

4.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

(Pierce, Micro BCA Protein Assay Kit, Handbuch, 2006)

Die frisch isolierten Proteine wurden mit H₂O-Millipore 1:50 und 1:100 verdünnt. Die Proteinkonzentration der Lösungen wurde mit der Mikroplattenmethode bestimmt und nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach der halbstündigen Inkubation bei 37 °C wurde die Intensität der Farbreaktion mit einem ELISA-Reader µQuant (Bio-Tek) bei 566 nm ausgelesen.

4.4.4 Auftrennung von Proteinen durch Gelelektrophorese

(Invitrogen life Technologies, NuPAGE Novex Bis-Tris Gels, Herstellerinformationen)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mit Hilfe von NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gelen (1,5 mm, 10 Taschen). Pro Tasche wurden 40 µg Protein eingesetzt und mit der entsprechenden Menge an NuPAGE LDS Sample Buffer (4x) und NuPAGE Reducing Agent (10x) versetzt. Das fehlende Volumen wurde mit H₂O-Millipore aufgefüllt. Als Laufpuffer wurde NuPAGE MOPS SDS verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V in einer XCell *SureLock* Mini-Elektrophoresezelle.

4.4.5 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen

(Invitrogen life Technologies, NuPAGE Novex Bis-Tris Gels, Herstellerinformationen)

Für den Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran (Protran Nitrozellulose BA 85, 0,45 µm, Schleicher & Schüll) wurde eine Mini Trans-Blot (BioRad) verwendet. Der Blot wurde in folgender Reihenfolge zusammengebaut: Schwamm, 2 x Whatmanpapier, Gel, Membran, 2 x Whatmanpapier, Schwamm. Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei 4 °C und 40 mA ü. N. in NuPAGE Transferpuffer.

4.4.6 Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine

Nach dem elektrophoretischen Transfer wurde die Membran kurz in PBS gewaschen, um restlichen Transferpuffer zu entfernen. Anschließend wurde die Membran für 30 min in Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Es folgte eine Inkubation mit Primärantikörper in entsprechender Verdünnung in 1% (w/v) Magermilchpulver in PBS-T. Die Membran wurde dreimal für 5 min mit PBS-T gewaschen und anschließend mit in 1% (w/v) Magermilchpulver in PBS-T verdünnten HRP-gebundenen Zweitantikörper inkubiert. Es erfolgten drei Waschschrte in PBS-T. Für die Detektion der markierten Proteine wurde die Membran in einer frisch hergestellten ECL-Lösung für eine Minute inkubiert. Anschließend wurde sofort ein Film (Kodak Biomax MR oder Amersham-Bioscience) aufgelegt, wobei die Expositionszeit je nach Signalstärke zwischen 10 s und 5 min lag.

4.4.7 Entfernen der gebundenen Antikörper

Liefen zwei nachzuweisende Proteine auf einer ähnlichen Höhe, wurde zunächst das eine Protein nachgewiesen. Anschließend wurde die Membran für 30 min bei 50 °C in Stripping-Puffer inkubiert. Bevor eine erneute Detektion erfolgte, wurde die Membran 3 x für 10 min in PBS gewaschen. Anschließend wurde mit dem Blockierschritt (*4. 4. 6 Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine*) fortgefahren.

4.5 Elektrophysiologische Experimente

4.5.1 *In vitro* Elektrophysiologie in Sinus- und AV-Knotenzellen

4.5.1.1 Isolation der Zellen

Die Mäuse wurden mit 0,01 mg/g Xylazin (Rompun 2 %) und 0,1 mg/g Ketamin (Imalgène) betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Die Herzen wurden entfernt und die entsprechende Region des Sinus- bzw. des AV-Knotens in warmer Tyrode-Lösung präpariert. Das Gewebe wurde in schmale Streifen geschnitten und in eine Niedrig- $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Lösung transferiert. Durch Zugabe von Kollagenase II (229 U/ml, Wothington Biochemical Corporation), Elastase (1,9 U/ml Boehringer Mannheim), Protease (0,9 U/ml, Sigma), BSA 1mg/ml und 200 μM CaCl_2 wurde das Gewebe enzymatisch verdaut. Der Gewebeerddau wurde bei 35 °C für 9-13 min durch Schütteln fortgeführt. Anschließend wurden die Gewebestreifen gewaschen und in SAN-Medium transferiert. Die Myozyten wurden manuell etwa 10 min in 35 °C warmer KB-Lösung voneinander getrennt.

4.5.1.2 Messung des Zell-Automatismus

Für die Messungen der rhythmischen Aktivität der Zellen mussten in der extrazellulären Lösung wieder physiologische Na^+ - und Ca^{2+} -Bedingungen geschaffen werden. Hierfür wurden Aliquots einer $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Lösung zugegeben. Anschließend wurde Tyrode-Lösung, die 1 mg/ml BSA enthielt, hinzugegeben bis die Lösung schließlich folgende Konzentration hatte: 100 mM NaCl, 35 mM KCl, 1,3 mM CaCl_2 , 0,7 mM MgCl_2 , 14 mM L-Glutamat, 2 mM (\pm)-D-2-Hydroxybuttersäure, 2 mM Taurin, 1 mg/ml BSA. Der pH lag bei 7,4. Die Zellen wurden bei RT gehalten, bis die Messungen durchgeführt wurden.

4.5.1.3 Elektrophysiologische Messungen der Schrittmacheraktivitäten und des I_f in Sinus- und AV-Knotenzellen

Die Schrittmacheraktivität und die Aktionspotenziale der Zellen wurde bei 35 °C im perforierten Patch durch Zugabe von 30 μM β -Escin zur Pipettenlösung gemessen. Der Serienwiderstand wurde elektronisch bis zu 90 % kompensiert. Die Zellmembrankapazität wurde durch kurze (10 ms) Spannungssprünge von ± 10 mV ausgehend von einem Haltepotenzial von -35 mV mit folgender Formel errechnet:

$$(1) \quad C_m = \tau/R_s,$$

C_m : Membrankapazität; τ : Zeitkonstante der transienten Membrankapazität; R_s : $R_s = \Delta V/I$; ΔV : Amplitudenschritt; I : maximales Stromlevel.

Der Wert für C_m wurde verwendet, um die Stromdichte von I_f in jeder Zelle einzuschätzen. Stromveränderungen wurden folglich nachfolgenden Formeln berechnet:

$$(2) \quad I_f(V,t) = I_f \cdot P(V,t)$$

V : Spannung; t : Zeit; P : Aktivierungsvariable. In Gleichung (2) erfüllt P die Boltzmann Relation:

$$(3) \quad P(V) = 1 / (1 + \exp((V - V_{1/2})/s)),$$

$V_{1/2}$: Spannung der halbmaximalen Stromaktivierung; s : Steigungsfaktor

Aktivierungszeitkonstanten wurden mit einfachexponentiellen Gleichungen für die experimentell ermittelten Stromspuren errechnet.

$$(4) \quad I_f = A \exp(-(t - t_0)/\tau_{act})$$

A : Konstante; t : Zeit; t_0 : Zeitpunkt der Stromaktivierung

Alle Annäherungen wurden mit einer numerischen Iteration mit einem Levenberg-Marquardt basierten numerischen Algorithmus (Origin 7.5 built-in) durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

4.5.2 *In vivo* Elektrophysiologie: EKG-Telemetrie

4.5.2.1 Implantation der EKG-Telemetrie-Sender

Die Implantation der EKG-Telemetriesender erfolgte im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz und war von der Hamburger Behörde für Wissenschaft und Gesundheit genehmigt (Genehmigungsnummer 07/05). Männliche Mäuse wurden im Alter von drei bis vier Monaten mit Isofluran narkotisiert. PhysioTel EA-F20 Telemetriesender wurden nach Herstellerangaben implantiert, wobei die Elektroden anders als im Handbuch vorgegeben rechts und links vom Sternum aus dem Peritoneum geführt und ca. 0,5 cm oberhalb des Sternums gekreuzt wurden (Abb. 4). Die Lage der Elektroden war wie im Handbuch beschrieben. Den Mäusen wurde nach der Operation Rimadyl (Carprofen, 5 μ g/g) und Baytril (Enrofloxacin, 5-7,5 μ g/g) subkutan verabreicht. Um den postoperativen Energieverbrauch zu senken und die Erholung zu beschleunigen, wurde der Boden des Käfigs gewärmt.

Zusätzlich wurde den Mäusen ab dem ersten postoperativen Tag Novaminsulfon (Metamizol-Natrium, 1,3 mg/ml) oral verabreicht. Die Erholung der Mäuse wurde durch Beobachtung des Allgemeinzustandes und Gewichtskontrolle überwacht. Den Tieren wurde mindestens eine Woche Erholzeit gewährt, bevor die telemetrischen EKG-Ableitungen gestartet wurden.

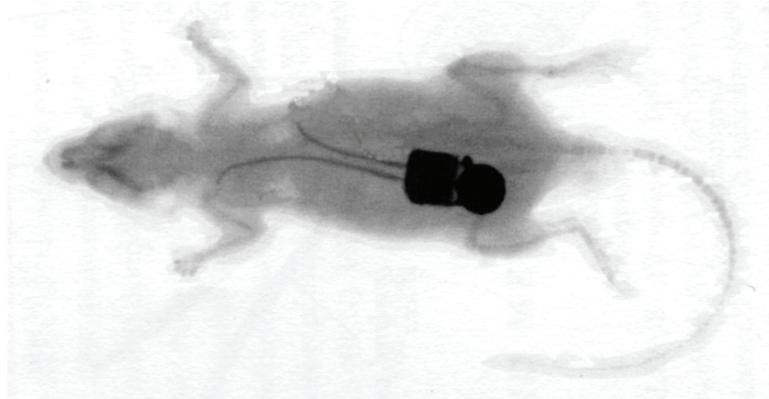


Abb. 4: Röntgenbild einer Maus mit implantiertem Telemetriesender (modifiziert nach Kramer *et al.*, 2003)

4.5.2.2 Aufzeichnung der Daten

Die Telemetriesender ermöglichten eine EKG- und Aktivitätsaufzeichnung in ungestörten frei beweglichen Tieren in der gewohnten Umgebung des Standardhaltungskäfigs. Die Daten wurden von dem Sender zu einer Empfängerplatte (PhysioTel Receiver, Model RPC-1, Data Science International) transferiert. In einer Matrix (Data Exchange Matrix, Data Science International) wurden die Daten umgewandelt und direkt auf der Festplatte eines angeschlossenen Computers gespeichert. Die Daten wurden kontinuierlich aufgezeichnet. Die Abtastfrequenz des EKGs betrug 1000 Hz und die der Aktivität 250 Hz. Nach der Datenaufzeichnung wurden die Telemetriesender magnetisch ausgeschaltet. Die Lebensdauer der Batterie betrug bei eingeschaltetem Sender mindestens 6 Wochen.

4.5.2.3 Analyse der telemetrischen Daten

Aktivitätsabhängige Herzfrequenzgrafiken:

Von der Herzfrequenz und der Aktivität wurde ein gleitender Durchschnitt mit einer Fensterbreite von einer Minute mit dem Programm Dataquest ART 2.3 Analysis (Data Science International) ermittelt. Die Herzfrequenz wurde in Schlägen pro Minute (min^{-1}) und die Aktivität in relativen Einheiten (aU) gemessen. Sie wurde als Funktion der Änderungen der Signalstärke, die sich abhängig von der Bewegung der Maus änderte, errechnet. Die Aktivitäten und die dazugehörigen Herzfrequenzen wurden anschließend folgendermaßen gruppiert: Die während einer Ruhephase (Aktivität = 0 aU) des Tieres aufgezeichneten Herzfrequenzen wurden zusammengefasst. Alle anderen Aktivitäten wurden in 5er-Gruppen gebündelt (Gruppe 1: Aktivität = 0-5 aU, Gruppe 2: Aktivität = 5-10 aU, usw.). Von den

Gruppen wurde die mittlere Herzfrequenz für jedes Tier ermittelt und anschließend aus diesen Mittelwerten ein Durchschnitt über die Tiere errechnet. So wurde sichergestellt, dass jedes Tier und jede Aktivität mit der gleichen Stärke in die statistische Analyse eingingen. Ob sich die Gruppen signifikant unterschieden, d.h. die Varianz zwischen den Gruppen größer war als die Varianz innerhalb der Gruppen, wurde mit einem MANOVA (*multivariate analysis of variance*) untersucht. Als Programm wurde Statistica (Statsoft) verwendet. Waren die Gruppen zumindest in einem der betrachteten Parameter unterschiedlich (zum Beispiel Genotyp oder pharmakologische Behandlung), durfte ein *posthoc*-Test durchgeführt werden. In diesem Versuchsteil wurde Tukey's HSD verwendet.

EKG-Analyse:

Für die Analyse wurden von jedem Tier sechs mal 60 s EKG in Ruhe (Aktivität = 0 aU) und hoher Aktivität (Aktivität > 25 aU) mit Dataquest ART 2.3 Analysis ausgewählt und exportiert. Die EKG-Analyse wurde mit Chart 5 (ADInstruments) durchgeführt. Die Spuren wurden in das Programm geladen und über eine Minute gemittelt. Aus dem Mittelwert wurden anschließend die Dauer des PQ-Intervals und des QT-Intervals bestimmt (siehe Abb. 5). Das QT-Interval wurde zusätzlich frequenzkorrigiert (Mitchell *et al.*, 1998) und als QT_c angegeben. Die Mittelwerte der Gruppen wurden bestimmt und statistisch mit MANOVA ausgewertet. Als *posthoc*-Test wurde Tukey's HSD verwendet.

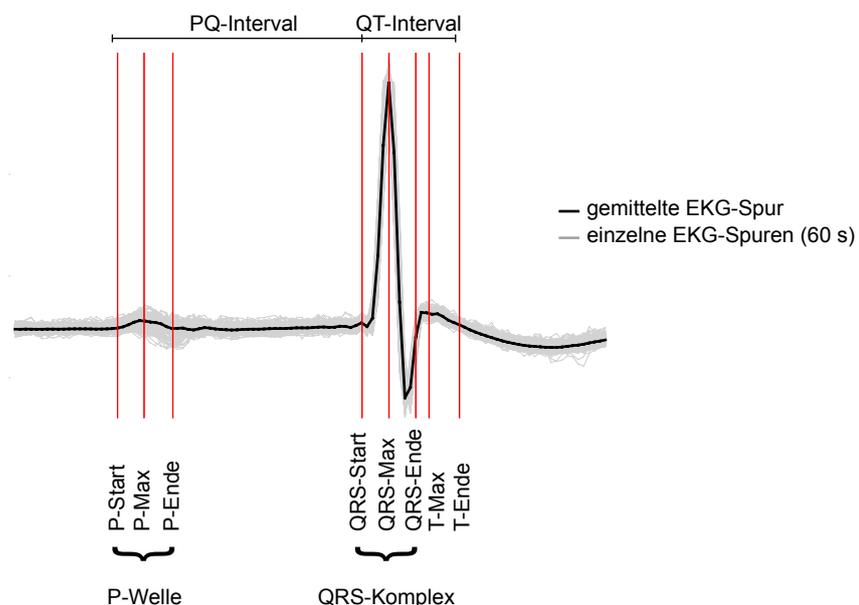


Abb. 5: Beispiel einer gemittelten EKG-Spur

Für die EKG-Analyse wurden die in 60 s aufgezeichneten EKG-Spuren (grau) übereinandergelegt und gemittelt (schwarz). Aus der gemittelten Spur wurden PQ-Interval und QT-Interval bestimmt.

Histogramme:

Für die Histogramme wurde von jedem Tier und von jedem Messabschnitt ein Zeitraum von 24 h analysiert. Es wurde ein gleitender Durchschnitt über 10 s von der Herzfrequenz ermittelt. Anschließend wurden die Frequenzen im Bereich zwischen 200 und 800 Schlägen min^{-1} in 120 Gruppen zu je fünf Schlägen eingeteilt und errechnet, wie oft der entsprechende Frequenzbereich vorkam. Im Anschluss wurden die errechneten Werte auf den höchsten Wert normalisiert. Für jede Gruppe wurde die durchschnittliche normalisierte Anzahl der Ereignisse für jede Frequenz errechnet. Zuletzt wurden die Werte gegen die Frequenz aufgetragen.

4.6 Maushaltung und pharmakologische Behandlung

Die Mäuse wurden in gleichgeschlechtlichen Gruppen (≤ 5) in Standardhaltungskäfigen unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen bei konstanter Temperatur (19-21 °C) und Luftfeuchtigkeit (50-55 %) gehalten. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug 12:12 h. Trinkwasser und Haltungsfutter (Ssniff) wurden in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt. Die pharmakologischen Behandlungen der Tiere erfolgte im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz und waren von der Hamburger Behörde für Wissenschaft und Gesundheit genehmigt (Genehmigungsnummer 07/05).

Die Doxyzyklinbehandlung erfolgte im Trinkwasser in einer Konzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Um den bitteren Geschmack des Antibiotikums zu überdecken, wurde dem Trinkwasser zusätzlich 240 mg/l (vier Tabletten pro Liter) handelsüblicher Süßstoff hinzugefügt. Die Verabreichung erfolgte in dunklen Trinkflaschen, da das Antibiotikum lichtempfindlich ist. Das Doxyzyklinwasser wurde zweimal wöchentlich gewechselt. In den Fällen, in denen Doxyzyklin bereits während der Embryonalentwicklung verabreicht wurde, startete die Behandlung mit dem Zusammensetzen des Zuchtpärchens.

Ivabradin (Proclaran, Servier) wurde den Mäusen in den Konzentrationen 3 mg/kg Körpergewicht und 6 mg/kg Körpergewicht durch eine intraperitoneale Injektion verabreicht. Um eventuelle Effekte durch das Anfassen und Injizieren ausschließen zu können, wurde den Mäusen zur Kontrolle 2 h vor der Medikamentenbehandlung Kochsalzlösung injiziert. Die mittleren Herzfrequenzen unter Kochsalz und Ivabradin wurden anschließend miteinander verglichen. Zwischen den Ivabradin-Injektionen lagen mindestens drei Tage, in denen das Medikament vollständig abgebaut wurde. So konnten additive Effekte vermieden werden.

Um Veränderungen in der Herzfrequenz durch das Anfassen und Injizieren der Mäuse zu

vermeiden, wurden Atropin (15 mg/kg Körpergewicht pro Tag, Sigma-Aldrich) und Propranolol (5 mg/kg Körpergewicht pro Tag, Sigma-Aldrich) mit osmotischen Minipumpen (Alzet, Charles River Laboratories) verabreicht. Die Pumpen wurden nach Herstellerangaben mit dem Medikamentengemisch befüllt und unter Isoflurannarkose subkutan auf dem Rücken der Mäuse implantiert. Die Mäuse erholten sich mindestens zwei Tage von der Operation bis zur EKG-Messung.

4.7 Echokardiografie (Ultraschall) des Herzens

4.7.1 Erhebung der Daten

Die Ultraschalluntersuchungen wurden am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf in Kollaboration mit Birgit Geertz vom Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie durchgeführt. Der Versuch erfolgte im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz und war von der Hamburger Behörde für Wissenschaft und Gesundheit genehmigt (Genehmigungsnummer 07/05). Das verwendete System Vevo 660 (Visual Sonics) eignete sich besonders für die kardiale Untersuchung von Mäusen, da es durch einen hochfrequenten Schallkopf (40 MHz center fequency Linearschallkopf) eine räumliche Auflösung bis 30 μm ermöglichte. Im EKV-Modus (EKG-basierte Kilohertz-Visualisationsmodus) kann eine zeitliche Auflösung von 1000 Bildern pro Sekunde erreicht werden. Die Mäuse wurden zunächst gewogen und anschließend mit 3 % Isofluran narkotisiert. Anschließend wurden sie mit den Pfoten auf den Elektroden der dafür vorgesehenen Platte (Vevo Mouse Handling Table, VisualSonics) so fixiert, dass während der Messung das EKG abgeleitet und die Herzfrequenz bestimmt werden konnte. Um beim Ultraschall ein besseres Signal zu erhalten, wurde den Mäusen mit Enthaarungscreme das Fell im Bereich des Brustkorbs entfernt. Während der Messung wurde die Isoflurankonzentration auf 1,8-2,0 % erniedrigt und die Herzfrequenz möglichst auf 500 min^{-1} eingestellt. Sobald die Herzfrequenz stabil blieb, wurde ein Ultraschall der langen Achse im B- und EKV-Mode und der kurzen Achse im B-, EKV- und M-Mode aufgezeichnet. Der Ausfluss aus der Lungenarterie wurde im gepulsten Doppler gemessen. Um die Kontraktilität zu stimulieren, wurde den Tieren 10 mg/kg Dobutamin injiziert. Anschließend wurde der gepulste Doppler und der B-Mode der kurzen und lange Achse aufgezeichnet. Nach Beenden der Messung wurden die Mäuse, die sich noch unter Isoflurannarkose befanden, durch zervikale Dislokation getötet. Vorhöfe, Kammern, Leber, Lunge und Tibia wurden präpariert und deren Gewicht bzw. Länge bestimmt.

4.7.2 Auswertung der Daten

Mit der entsprechenden Software (VisualSonics, M-Mode, B-Mode, EKG-Mode) wurden die aufgezeichneten Daten ausgewertet. Von jedem Tier wurden im EKV-Mode der kurzen Achse sowohl die systolische als auch diastolische die vom Epi- und Endokard begrenzten Flächen ($sArea_{endo/epi}$ und $dArea_{endo/epi}$) gemessen. Außerdem wurden linksventrikuläre enddiastolische und endsystolische Durchmesser (LVEDD bzw. LVESD) bestimmt. Im EKV-Modus der langen Achse wurde systolischer Längs- und Querdurchmesser ermittelt. Mit Hilfe der im Doppler aufgezeichneten Daten konnten die Herzfrequenz, der Durchmesser der Lungenarterie und das Geschwindigkeitszeitintegral (*velocity time integral*: VTI) bestimmt werden. Nach Stimulation mit Dobutamin wurden die systolische als auch diastolische Vorder- und Hinterwanddicke und die vom Epi- und Endokard begrenzten Flächen im B-Mode der kurzen Achse gemessen. Aus den im Ultraschall gemessenen Werten konnten die aufs Körpergewicht normalisierte linksventrikuläre Masse (LVM/BM), das linksventrikuläre, enddiastolische und endsystolische Volumen (*left ventricular enddiastolic/endsystolic volume*: LVEDV/LVESV), die kontraktionsbedingte Verkleinerung der linksventrikulären Innenfläche (*fractional area shortening*: FAS), das Schlagvolumen (*stroke volume*: SV) und das Herzzeitvolumen (*cardiac output* = CO) errechnet werden (Berul, 2003).

$$(5) \quad LVM = [1,05 (5/6 \times dArea_{epi} \times (LVEDD + \text{mittlere Wanddicke}) - 5/6 \times dArea_{endo} \times LVEDD)]$$

$$(6) \quad LVEDV = dArea_{endo} \times LVEDD \times 5/6$$

$$(7) \quad LVESV = sArea_{endo} \times LVEDD \times 5/6$$

$$(8) \quad FAS = (dArea_{endo} - sArea_{endo}) / dArea_{endo} \times 100$$

$$(9) \quad SV = (LVEDV - LVESV)$$

$$(10) \quad CO = \Pi(\varnothing \text{ Pulmonararterie} / 2)^2 \times VTI \times \text{Herzfrequenz}$$

Die Gewichte von Vorhöfen, Ventrikeln, Leber und Lunge wurden in Relation zum Körpergewicht gesetzt.

Die Ergebnisse der Ultraschall-Untersuchungen und der Gewichtsmessung wurden innerhalb der Gruppen gemittelt und mit *student's t*-Test bzw. einem MANOVA mit anschließendem Tukey's HSD *posthoc*-Test statistisch analysiert.

5 Ergebnisse

Um die funktionelle Bedeutung der Modulation des I_f durch cAMP und seine Rolle für die Herzschrittmachertätigkeit auf zellulärer Ebene und *in vivo* zu studieren, wurde in dieser Arbeit ein Mausmodell entwickelt, das gewebespezifisch und induzierbar eine cAMP-insensitive humane HCN4-Kanaluntereinheit exprimiert. Das Protein wurde N-terminal mit einem Hämagglutinin (HA)-Tag markiert, um eine spezifische Detektion mit einem anti-HA-Antikörper zu ermöglichen. Es wird im Folgenden mit HA-hHCN4-SND abgekürzt. Ziel war es, durch Heteromerisierung mit den endogenen HCN2- und HCN4-Untereinheiten und durch die dominant-negativen Eigenschaften der humanen Mutante den gesamten I_f im Herzen der Maus insensitive für eine cAMP-Modulation zu machen. Sowohl Gewebespezifität als auch zeitlich regulierbare Expression der Mutante wurden durch das Tet-off System (Gossen und Bujard, 1992) ermöglicht (Abb. 6 A).

Für dieses System werden zwei transgene Mauslinien benötigt. Die Promotorlinie exprimiert einen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivator (tTA) unter der Kontrolle des herzspezifischen Promotors der schweren alpha-Myosinkette (α MHC). Die Responderlinie hat in ihrem Genom die Sequenz der mutierten Untereinheit unter der Kontrolle des *Tetrazyklin Response Elements* (TRE) integriert. Nach Kreuzung der beiden Linien interagiert der Transaktivator mit TRE, was zur Expression von HA-hHCN4-SND im Herzen doppelt transgener Mäuse führt. Wird den Tieren ein Tetrazyklinderivat (Doxozyklin) verabreicht, ändert der Transaktivator durch die Wechselwirkung mit dem Antibiotikum seine Konformation und kann nicht mehr an TRE binden. Die Expression wird folglich unterdrückt (Abb. 6 B).

Die Promotorlinie (α MHC-tTA), die in dieser Arbeit verwendet wurde, konnte vom Jackson Laboratory erworben werden. Die Responderlinie, Tre-IH-SND2, wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Des Weiteren wurde unter Punkt 5.1 *GFP-Expression im Sinusknoten* eine Reportermauslinie, Tre-G9, verwendet, die nach Bindung von tTA an TRE ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) exprimiert (Krestel *et al.*, 2001). Diese wurde freundlicherweise von P. Seeburg und R. Sprengel (MPI Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

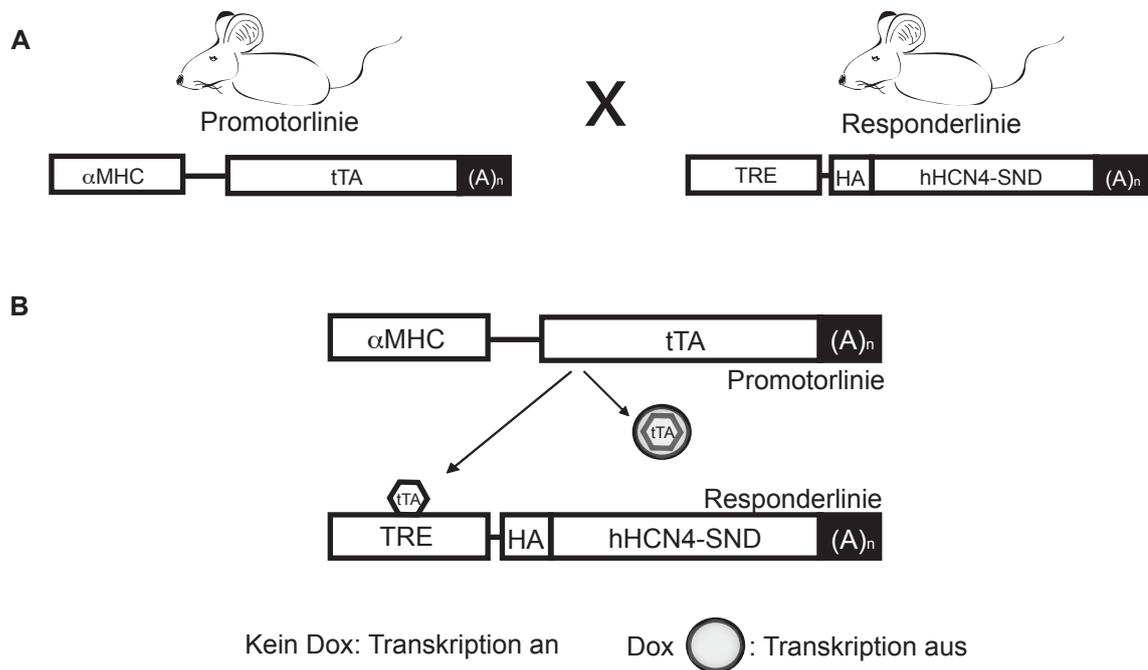


Abb. 6: Schematische Darstellung des Tet-off Systems

(A) Für die herzspezifische und kontrollierbare Expression der cAMP-insensitiven HCN4-Kanaluntereinheit wurden zwei transgene Mauslinien benötigt: Die Promotorlinie exprimierte unter der Kontrolle der schweren α -Myosinkette (α MHC) den Transaktivator (tTA). In das Genom der Responderlinie war die Sequenz für die mutierte und HA-markierte Kanaluntereinheit (*HA-hHCN4-SND*) unter der Kontrolle des *Tetrazyklin Response Elements* (TRE) integriert. Durch Kreuzung der beiden Linien erhielt man doppelt transgene Tiere (B). Diese exprimierten herzspezifisch tTA, das an TRE band und zur Expression der Kanaluntereinheit führte. In Anwesenheit von Doxyzyklin (DOX) veränderte der Transaktivator seine Konformation und konnte nicht mehr an TRE binden. Die Transkription von *HA-hHCN4-SND* war unterdrückt.

5.1 GFP-Expression im Sinusknoten

Das Expressionsniveau der endogenen HCN4-Untereinheit ist im Sinusknoten sehr hoch. Um sicherzugehen, dass mit der α MHC-tTA Promotormauslinie eine Expression von HA-hHCN4-SND in den primären Schrittmacherzellen möglich war, wurde die Promotormauslinie zunächst mit einer Reportermauslinie gekreuzt. Diese exprimierte GFP nach Bindung des Transaktivators an TRE. Aus doppelt transgenen Tieren wurden die Sinusknotenregion und davon einzelne Zellen isoliert und mit Fluoreszenzmikroskopie auf GFP-Expression untersucht. Die Fluoreszenz war sowohl im zentralen Sinusknoten als auch in akut isolierten Zellen detektierbar (Abb. 7).

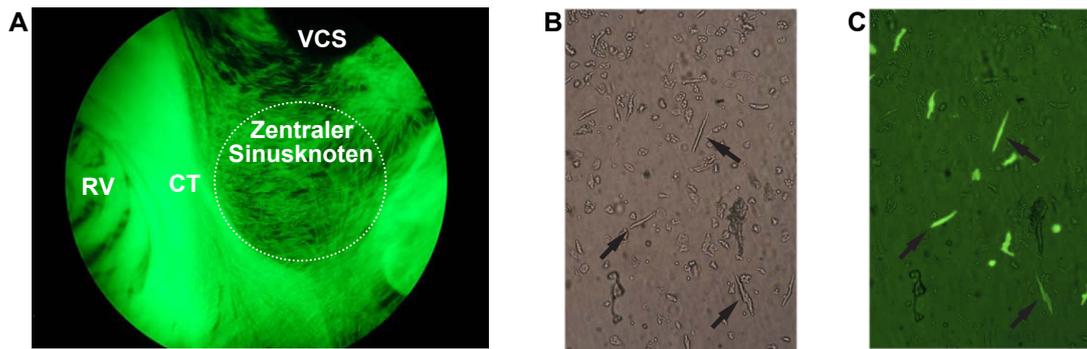


Abb. 7: GFP-Expression im zentralen Sinusknoten und in isolierten Schrittmacherzellen

(A) Nach Verpaarung der α MHCA-tTA Linie mit einer GFP exprimierenden Reporterlinie (Tre-G9) wurde in doppelt transgenen Tieren GFP-Fluoreszenz im rechten Vorhof (RV) detektiert. Der zentrale Sinusknoten unterhalb der oberen Hohlvene (*vena cava superior*, VCS) und rechts von der *crista terminalis* (CT) fluoreszierte. (B) Schrittmacherzellen wurden anhand der Form im Durchlicht identifiziert (Pfeile). (C) In der Fluoreszenzmikroskopie leuchteten die spindelförmigen Schrittmacherzellen aufgrund des vorhandenen GFPs grün. Auch in anderen Zellen konnte eine GFP-Fluoreszenz detektiert werden.

5.2 Generierung einer transgenen Mauslinie mit cAMP-insensitivem F-Strom

Für die Responderlinie wurde *in vitro* eine Mutation in die cDNA des humanen *HCN4* durch Deletion eines Nukleotids an der Stelle 1631 eingefügt. Das Konstrukt wurde an das 3'-Ende eines TRE-Tight Promotors kloniert und N-terminal mit einem HA-Tag (8.4 Sequenz des HA-Tags) versehen, um die spätere Detektion des Proteins zu vereinfachen. Zusätzlich wurde das Konstrukt von Insulatorsequenzen (Bell und Felsenfeld, 2000; Kaffer *et al.*, 2000) flankiert, um mögliche regulatorische Effekte von benachbarten Sequenzen zu vermeiden, die nach der zufälligen Integration des Transgens ins Mausgenom auftreten können. Die Plasmidkarten sind im unter 8 Anhang und die verwendeten PCR-Primer unter 3.10 PCR-Primer zu finden.

5.2.1 Klonierung des Konstrukts

5.2.1.1 Flankieren des TRE-Tight Promotors mit Insulatorsequenzen

Zunächst wurde das Plasmid pWHERE2 v.01 (Invivogen) mit *SdaI* und *NheI* enzymatisch hydrolysiert und die überhängenden Enden aufgefüllt. Aus pTRE-Tight (Clontech) wurde der Promotor mit *XhoI* und *XbaI* ausgeschnitten und die Enden ebenfalls aufgefüllt. Das resultierende Fragment wurde anschließend in den pWHERE Vektor eingefügt. Das neu entstandene Plasmid wurde im folgenden pW-TT1 genannt.

5.2.1.2 Mutagenese des *hHCN4*

An die *hHCN4* cDNA wurde N-terminal ein HA-Tag angefügt, um die spätere Detektion des Transgens zu vereinfachen. Hierfür wurde eine PCR mit den Primern HCN4-Hind-HA_c und HCN4_54nc durchgeführt. Als Template diente die in pcDNA1/Amp klonierte cDNA des humanen HCN4, die freundlicherweise von Benjamin Kaupp (Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt wurde. Anschließend wurde in den humanen HCN4 mit einer Overlap-PCR eine Base an der Stelle 1631 deletiert und durch eine stille Mutation eine zusätzliche *HindIII*-Schnittstelle eingefügt. Die verwendeten Primerpaare waren HCN4_24c und HCN4-mut_nc bzw. HCN4-mut_c und HCN4_36nc. Sowohl das PCR-Produkt als auch pcDNA1/Amp-HA-hHCN4 wurden mit *BglII* geschnitten. Das aus dem Vektor fallende Fragment wurde durch das mutierte PCR-Produkt ersetzt. Die Bezeichnung des entstandenen Plasmids lautete pcDNA1/Amp-HA-hHCN4-1631delC.

5.2.1.3 Klonierung des HA-hHCN4-1631delC Konstrukts in pW-TT1

Das HA-hHCN4-1631delC Konstrukt wurde mit *Asel* und *XbaI* aus dem Plasmid geschnitten und die überhängenden Enden aufgefüllt. Anschließend wurde der Vektor pW-TT1 mit *Eco32I* linearisiert und mit dem Fragment ligiert. Der neue Vektor wurde als pW-TT1-HA-hHCN4-1631delC bezeichnet.

5.2.1.4 Aufreinigung des Konstrukts für die Pronukleusinjektion

15 µg des Plasmids pW-TT1-HA-hHCN4-1631delC wurden mit *PacI* linearisiert und auf einem präparativen Agarosegel aufgetrennt. Das gewünschte DNA Fragment wurde über GFX Säulen aufgereinigt und in Injektionspuffer eluiert. Die finale Konzentration betrug 100 ng/µl. Die Pronukleusinjektion und der Embryotransfer wurden von der ZMNH-internen Servicegruppe *Transgene Tiere* durchgeführt.

5.2.2 Untersuchung auf Transgenexpression in doppelt transgenen Mäusen

Aus der Pronukleusinjektion gingen sechs Tiere hervor, die das HA-hHCN4-1631delC-Konstrukt in ihr Genom integriert hatten. Sie wurden als *Founder A-F* bezeichnet. Die transgenen Tiere wurden mit Tieren aus der Promotorlinie (α MHC-tTA) verpaart, um zu untersuchen, ob das Transgen an die Nachkommen weitergegeben und ob die Mutante herzspezifisch exprimiert wurde. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR (Abb. 8 A). In doppelt transgenen Tieren (+/T +/T) konnte sowohl ein tTA-Fragment von 450 bp als auch

ein hHCN4-Fragment von 350 bp amplifiziert werden. In einfach transgenen Tieren (+/T +/- bzw. +/- +/-) war jeweils nur eine der beiden Banden vorhanden. Die DNA aus Wildtyp-Tieren (+/+ +/+) lieferte keine Bande. Als Qualitätskontrolle diente eine PCR, bei der ein Fragment von 200 bp eines endogenen T-Zell Rezeptorgens amplifiziert wurde.

Die Founder A, C und F gaben das Konstrukt an ihre Nachkommen weiter, so dass doppelt transgene Tiere aus den Verpaarungen hervorgingen. Aus den Herzen der doppelt transgenen Mäuse wurden RNA und Proteine isoliert und durch Northern Blot und Western Blot auf Transkription und Expression des mutierten Ionenkanals getestet.

Im Northern Blot konnte mit Hilfe einer für den humanen HCN4 spezifischen Sonde (8.3 *Sequenz der für hHCN4 spezifischen Sonde*) die mRNA des Transgens in den Nachkommen der Founder A und F detektiert werden (Abb. 8 B). Bei 3,8 kb zeigte Founder A ein schwaches und Founder F ein starkes Signal. In der RNA, die aus dem Tier der Linie C isoliert worden war, konnte kein Transkript nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle wurde die RNA aus einem Kontrolltier isoliert, das keines der beiden Transgene ins Genom integriert hatte. Als Positivkontrolle dienten 100 pg einer *in vitro* synthetisierten hHCN4-cRNA, die mit der RNA des Kontrolltiers als Träger-RNA vermischt worden war. Mit einer Sonde gegen das Haushaltsgen Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde die Qualität und Quantität der RNA überprüft.

Der Western Blot spiegelte auf Proteinebene das Ergebnis des Northern Blots wider (Abb. 8 C): Das aus dem Transgen resultierende Protein konnte in den Foundern A und F detektiert werden. Auf der Höhe von 61 kDa erhielt man sowohl mit einem Antikörper gegen den HA-Tag als auch mit einem Antikörper gegen den N-Terminus der HCN4-Kanaluntereinheit ein schwaches Signal in Founder A und ein starkes Signal in Founder F. In der Linie C konnte kein transgenes Protein nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle wurden die Proteine aus dem Herzen eines Kontrolltiers isoliert und aufgetragen. Als Positivkontrolle wurden Proteine aus HEK293-Zellen isoliert, die zuvor transient mit den Plasmiden pcDNA1/Amp HA-hHCN4-1631delC (siehe 8.2.3 *pcDNA1/Amp HA-hHCN4 1631delC*) und pcDNA1/Amp-mHCN4 (freundlicherweise von Benjamin Kaupp, Forschungszentrum Jülich, zur Verfügung gestellt) transfiziert worden waren.

Mit dem Anti-HCN4 Antikörper konnte nicht nur die 61 kDa schwere transgene Untereinheit, sondern auch die endogene Untereinheit auf der Höhe von 127 kDa detektiert werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Deletion einer Base im Transgen durch Verschiebung des Leserasters zu einem verkürzten Protein führt. Des Weiteren bestand die Möglichkeit, die Signalstärken der Banden zu vergleichen. In den exprimierenden Foundern

war das Signal von HA-hHCN4-SND stärker als das von mHCN4. Dies ließ auf eine höhere Proteinmenge des Transgens schließen. Es galt jedoch zu beachten, dass dieser Vergleich nicht auf zellulärer Ebene möglich war, da die Gene von unterschiedlichen Promotoren kontrolliert wurden und sich im Expressionsmuster unterschieden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde das transgene Protein ausschließlich mit dem Anti-HCN4 Antikörper nachgewiesen und auf den Anti-HA Antikörper verzichtet.

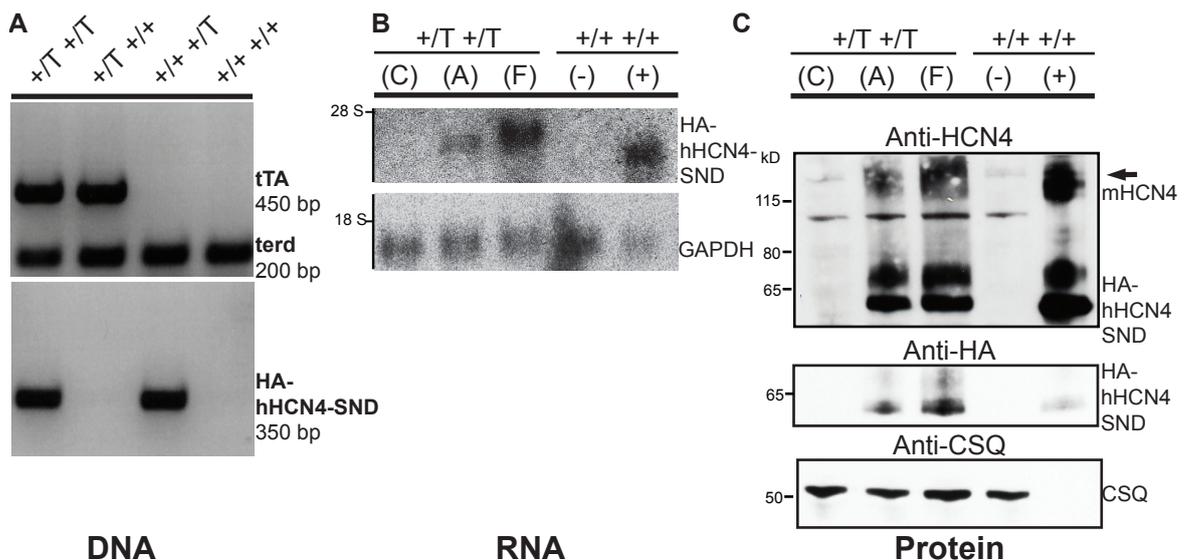


Abb. 8: Genotypisierung und Expressionsanalysen auf RNA- und Proteinebene

(A) DNA-Banden nach einer Genotypisierungs-PCR. In doppelt transgenen Tieren (+/T +/T) waren sowohl tTA- als auch hHCN4-Bande vorhanden, während in einfach transgenen Tieren (+/T +/+ bzw. +/+ +/T) nur jeweils eine Bande detektiert werden konnte. Tiere, in denen nur die endogene Kontrollbande terd amplifiziert wurde, waren Wildtyp-Mäuse (+/+ +/+). (B) Im Northern Blot konnte in doppelt transgenen Tieren der Founder A und F mit einer HA-hHCN4-SND spezifischen Sonde mRNA nachgewiesen werden, wobei die Signalstärke unterschiedlich stark war. In Founder C konnte kein Signal detektiert werden. Als Negativ- und Positivkontrolle wurde Gesamt-RNA eines Kontrolltiers alleine (-) und vermischt mit HA-hHCN4-SND-cRNA (+) aufgetragen. Als Größenvergleich wurden die Laufhöhen der ribosomalen RNAs (28 S und 18 S) eingezeichnet. Qualität und Quantität wurden mit einer GAPDH-Sonde überprüft. (C) Nachweis des HA-hHCN4-SND Konstrukt in Founder A und F mit einem spezifischen Anti-HCN4- und Anti-HA-Antikörper. In Founder C war wie im Kontrolltier (-) kein Protein nachzuweisen. Als Positivkontrolle wurden Proteinlysate aus transient transfizierten HEK293-Zellen geladen, die mHCN4 und HA-hHCN4-SND exprimierten. Gleiche Proteinmengen wurden mit einem Anti-Calsequestrin (CSQ) Antikörper überprüft.

5.3 Charakterisierung der positiven Founderlinien

5.3.1 Funktionalität des Tet-Systems: Kontrolle, Induzierbarkeit und Reversibilität der Expression

Zunächst wurde in beiden Foundern die Funktionalität des Tet-Systems überprüft. Wichtig war hier zum einen, dass die alleinige Anwesenheit des Respondertransgens nicht bereits

zur Expression der mutierten HCN4-Untereinheit führte. Dies wurde in Tieren getestet, die einfach transgen für das Responderkonstrukt waren. Zum anderen galt es zu untersuchen, ob die Verabreichung von Doxzyklin (DOX) zur Unterdrückung der Transgenexpression führte. Hierfür wurden doppelt transgene Tiere, die lebenslang mit DOX behandelt wurden, bzw. nicht behandelte Tiere verwendet. Als Kontrolle diente ein Wildtyp-Tier.

Von den Tieren wurden die Herzen präpariert und aus dem gesamten Gewebe die Proteine isoliert. Mittels Western Blot wurde die Transgenexpression getestet (Abb. 9 A). In beiden Founderlinien konnte in den Spuren, in denen Proteine aus doppelt transgenen (+/T +/T) mit DOX-Behandlung (DOX +) Tieren aufgetragen worden waren, keine Bande

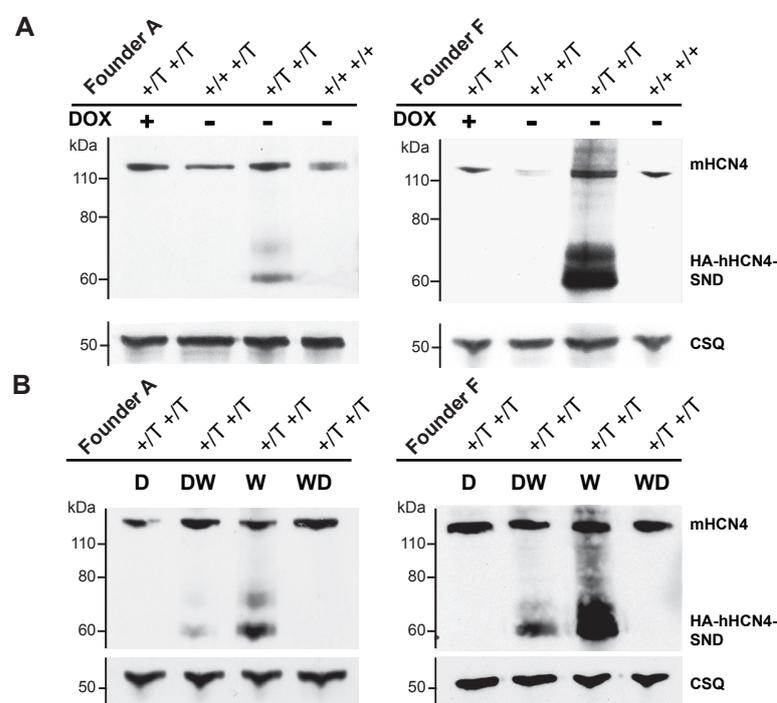


Abb. 9: Western Blots zur Überprüfung der Funktionalität des Tet-Systems bezogen auf Kontrolle, Induzierbarkeit und Reversibilität der Genexpression in den Foundern A und F

(A) Von beiden Foundern (A, F) wurden Proteine von doppelt transgenen Mäusen (+/T +/T) mit und ohne DOX-Behandlung (DOX - bzw DOX +) und von einfach transgenen (+/+ +/T) und Kontrolltieren (+/+ +/+) ohne Behandlung untersucht. Das transgene Protein HA-hHCN4-SND konnte nur in den doppelt transgenen Tieren ohne Behandlung nachgewiesen werden. Weder in doppelt transgenen Tieren mit DOX noch in einfach transgenen Tieren, die nur das mutierte hHCN4-cDNA ins Genom integriert haben, konnte HA-hHCN4-SND detektiert werden. Die endogene HCN4-Kanaluntereinheit, mHCN4, war in allen Proben nachweisbar. Die Proteinmenge wurde mit einem Antikörper gegen Calsequestrin (CSQ) überprüft. (B) Die Transgenexpression war in beiden Foundern durch Absetzen von DOX induzierbar (DW) und konnte wie in den Tieren, die mit Wasser behandelt wurden (W), nachgewiesen werden. Die Bandenintensität war jedoch schwächer. Weder in den Tieren mit DOX (D) noch in den WD Tieren konnte das HA-hHCN4-SND detektiert werden. Die Expression war folglich reversibel. Die Signalstärke des endogenen Kanals veränderte sich nicht. Durch den Nachweis von Calsequestrin wurde sichergestellt, dass gleiche Proteinmengen analysiert wurden.

auf der Höhe von 61 kDa detektiert werden. Das Gleiche galt für die Proteine, welche aus den Herzen einfach transgener Tiere für HA-hHCN4-SND (+/T +/+) isoliert worden waren. In doppelt transgenen Tieren ohne DOX-Behandlung (DOX -) war es möglich, in beiden Foundern eine Bande auf der erwarteten Höhe nachzuweisen. Die Intensität der Bande war in Founder A schwächer als in Founder F. Ein Vergleich des Expressionsniveaus des Transgens mit dem der endogenen HCN4-Kanaluntereinheit, die bei 127 kDa detektiert werden konnte, zeigte, dass die Menge an Transgen im Gesamtherzen etwa genauso groß wie in Founder A war. In Founder F hingegen war das Signal des Transgens wesentlich stärker als das des endogenen Proteins. Dies spiegelte die Ergebnisse wider, die bereits unter *5.2.2 Untersuchung auf Transgenexpression in doppelt transgenen Mäusen* beobachtet wurden.

Die Intensität der endogenen HCN4-Kanaluntereinheit war in allen Spuren etwa gleich stark. Offenbar veränderte die Anwesenheit des Transgens nicht das Expressionsniveau des murinen HCN4-Proteins. Um zu überprüfen, ob in allen Spuren etwa gleich viel Protein aufgetragen worden war, wurde mit einem Anti-Calsequestrin Antikörper ein endogenes Protein nachgewiesen. Die Intensität der Banden bei 55 kDa war in allen Spuren vergleichbar stark.

Für die elektrophysiologische Charakterisierung der Tiere war es wichtig zu untersuchen, ob die Transgenexpression induzierbar und reversibel war. Hierfür wurden doppelt transgene Tiere beider Founderlinien entweder lebenslang mit DOX behandelt (D), zunächst mit DOX behandelt und anschließend mit Wasser versorgt (DW), lebenslang mit Wasser behandelt (W) oder die Behandlung von Wasser auf DOX umgestellt (WD). Die Herzen der Tiere wurden präpariert und aus dem Gewebe die Proteine isoliert. Das Transgen wurde mit einem Anti-HCN4-Antikörper im Western Blot nachgewiesen (Abb. 9 B). In beiden Founderlinien konnte in den mit DOX behandelten Tieren kein Transgen nachgewiesen werden. Es war also möglich, die Transgenexpression durch DOX zu supprimieren. In den Tieren konnte jedoch eine Transgenexpression induziert werden, wenn die DOX-Behandlung für sechs Wochen (Founder A) bzw. für vier Wochen (Founder F) abgesetzt wurde. Das Transgen konnte in beiden Linien nachgewiesen werden. Ein Vergleich der Bandenintensität zeigte, dass die Transgenexpression in den Tieren, die ausschließlich mit Wasser aufwuchsen, stärker war als in den Tieren, in denen die Expression durch Absetzen der DOX-Behandlung induziert worden war. In den Tieren, die während der Entwicklung mit Wasser versorgt und anschließend mit DOX behandelt wurden, konnte kein Transgen nachgewiesen werden. Die Expression war folglich gänzlich unterdrückt.

5.3.2 Expressionsmuster der transgenen HA-hHCN4-SND Untereinheit

Für die Interpretation der Daten war es von Bedeutung, das Expressionsmuster der transgenen Kanaluntereinheit zu charakterisieren. Hierfür war zum einen interessant, in welchem Teil des Herzens das Protein exprimiert wurde, und zum anderen, inwiefern sich das Expressionsmuster und die Expressionsstärke der transgenen Kanaluntereinheit von den endogenen HCN-Kanaluntereinheiten unterschied. Des Weiteren wurde untersucht, ob zwischen den Founderlinien Unterschiede beobachtet werden konnten. Dazu wurden Herzen aus Kontrolltieren und aus doppelt transgenen Tieren der jeweiligen Founderlinien präpariert. Die Tiere waren nicht mit DOX behandelt worden. Nach Separation der Vorhöfe und der Kammern wurden die Proteine aus den Geweben isoliert und im Western Blot HA-hHCN4-SND und mHCN4 nachgewiesen (Abb. 10). In einfach transgenen Tieren konnte auf der Höhe von 61 kDa keine Bande detektiert werden. In den doppelt transgenen Tieren konnte in den zwei Foundern (A und F) ein Signal in den beiden Vorhöfen nachgewiesen werden. Während in Founder A keine Expression in den Kammern detektiert werden konnte, war in Founder F der Nachweis des Transgens auch in den beiden Ventrikeln möglich. Der Vergleich der Bandenintensität der transgenen Untereinheit innerhalb der Founder zeigte, dass die Expression bei beiden in den Vorhöfen stärker als in den Ventrikeln war. Zwischen rechtem und linkem Vorhof bzw. zwischen rechter und linker Kammer schien

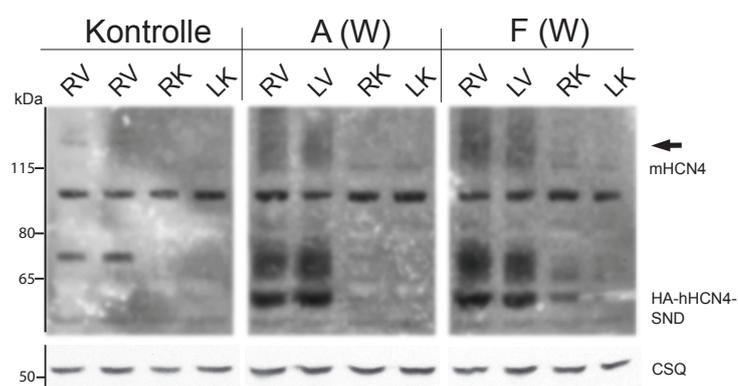


Abb. 10: Western Blots zur Überprüfung des Expressionsmusters von HA-hHCN4-SND in den beiden Foundern

Es wurden Proteine aus dem rechten und linken Vorhof (RV und LV) und der rechten und linken Kammer (RK und LK) eines Kontrolltiers und doppelt transgener Tiere der Founder A und F ohne DOX-Behandlung untersucht. Das transgene Protein HA-hHCN4-SND konnte nur in den doppelt transgenen Tieren nachgewiesen werden. Die Expression war in den Vorhöfen stärker als in den Ventrikeln. Die Bande der endogenen Kanaluntereinheit war im rechten Vorhof am deutlichsten sichtbar. Die Proteinmenge wurde einem Antikörper gegen Calsequestrin (CSQ) überprüft.

das Signal jedoch nicht zu differieren. Auf der Höhe von 127 kDa konnte die endogene HCN4-Kanaluntereinheit detektiert werden. Das Bandenmuster unterschied sich zwischen Kontrolltier und den beiden doppelt transgenen Tieren nicht. Im rechten Vorhof war das Signal stärker als in den anderen Herzteilen. Verglichen mit der Intensität der HA-hHCN4-SND Banden war das Signal jedoch schwächer. Als Ladekontrolle wurde Calsequestrin nachgewiesen, dessen Banden in allen Spuren in etwa gleich stark waren.

5.4 Ultraschall Untersuchungen zur Überprüfung der ventrikulären Funktion

5.4.1 Ultraschall-Analyse in DW Tieren

Um zu untersuchen, ob die Expression des Transgens Auswirkungen auf die Anatomie des Muskels oder auf die Kontraktionseigenschaften des Herzens hatte, wurde eine Echokardiografie der Maus Herzen durchgeführt. Im Versuch wurden die auf das Körpergewicht normalisierte linksventrikuläre Masse, das linksventrikuläre enddiastolische Volumen, die kontraktionsbedingte Flächenverkleinerung unter basalen Bedingungen und nach Stimulation, das Schlagvolumen und das Herzzeitvolumen bestimmt. Zunächst wurde das Experiment mit Kontrollen und DW Mutanten durchgeführt. Die Tiere wurden bis zu ihrer 10. Lebenswoche mit DOX behandelt und echokardiografisch untersucht. Anschließend wurde die Antibiotikum-Behandlung beendet, das Transgen exprimiert und die Untersuchung durchgeführt. Ein schematischer Versuchsablauf ist in Abb. 12 A dargestellt. Die echokardiografische Analyse erfolgte zunächst unter Basalbedingungen, d. h. unter Isoflurannarkose, wobei die Herzfrequenz mittels der Isoflurankonzentration in der Einatemluft auf etwa 500 min⁻¹ eingestellt wurde. Anschließend wurde die Kontraktilität des Muskels durch Dobutamin erhöht, um zu untersuchen, ob die Mutanten auf positiv inotrope Stimulation reagieren können. In der Abb. 11 sind 2D-Darstellungen eines Schnitts durch die kurze Herzachse eines Kontrolltiers und einer Mutante mit (Abb. 11 A und B) und ohne DOX-Behandlung (Abb. 11 C und D) während der enddiastolischen Phase dargestellt. Als Ebene wurde die Höhe der Papillarmuskeln gewählt. Der linke Ventrikel ist jeweils nach links gerichtet und der rechte Ventrikel nach rechts. Zwischen Kontrolltier und Mutante mit DOX-Behandlung ist kein offensichtlicher morphologischer Unterschied zu erkennen. Nachdem die Tiere auf Wasser umgestellt worden waren, erschienen die linksventrikulären Wandstärken etwas dicker. In der quantitativen Analyse konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

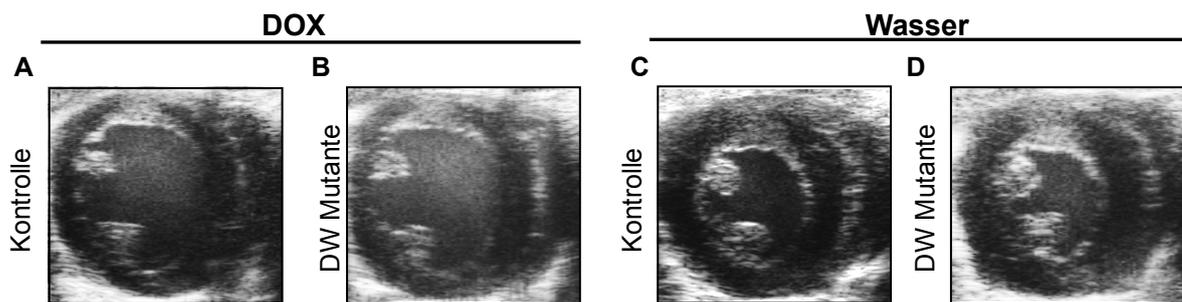


Abb. 11: 2D-Ultraschallbilder des parasternalen Schnitts durch den linken und rechten Ventrikel eines Kontrolltiers und einer Mutante mit DOX (A, B) und Wasser (C, D).

Die auf das Körpergewicht normalisierte linksventrikuläre Masse (LVM/BW) unterschied sich in den Mutanten weder mit noch ohne DOX-Behandlung von den Kontrollen (Abb. 12 B und D). LVM/BW lag in den Kontrollen mit DOX bei $4,0 \pm 0,1$ mg/g und in den Mutanten des Founders A mit DOX bei $4,3 \pm 0,3$ mg/g (Abb. 12 B). Die Umstellung auf Wasser hatte keine signifikanten Veränderungen in der linksventrikulären Masse zur Folge. In den Mutanten lag der Quotient bei $3,9 \pm 0,3$ mg/g und in den Kontrollen bei $4,1 \pm 0,1$ mg/g (Abb. 12 D).

Das linksventrikuläre enddiastolische Volumen (LVEDV) lag in den Kontrollen mit DOX bei $103,4 \pm 7,3$ μ l und das der Mutanten mit DOX bei $110,6 \pm 9,9$ μ l (Abb. 12 C). Die Expression des Transgens hatte keinen Effekt auf das LVEDV. Das Volumen erhöhte sich in beiden Gruppen zwar leicht auf $106,0 \pm 8,4$ μ l in den Kontrollen und $117,2 \pm 11,6$ μ l, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb. 12 E).

Die kontraktionsbedingte prozentuale Flächenverkleinerung lag unter Basalbedingungen in den Kontrollen und Mutanten mit DOX bei $48,2 \pm 2,8$ % bzw. bei $47,2 \pm 3,8$ % (Abb. 12 F). Nach Stimulation mit Dobutamin verstärkte sich die Flächenverkleinerung in beiden Gruppen um etwa 10 %. Sie lag nun in den Kontrollen bei $58,9 \pm 3,4$ % und in den Mutanten bei $59,8 \pm 3,5$ % (Abb. 12 G). Nach Beenden der DOX-Behandlung und der Induktion des Transgens in den Mutanten erniedrigte sich die prozentuale kontraktionsbedingte Flächenverkleinerung. Sie lag in den Kontrollen bei $39,0 \pm 3,2$ % und in den Mutanten bei $41,1 \pm 1,9$ % (Abb. 12 H). Somit lag diese im Vergleich zu den DOX-Werten niedriger. Die Mutanten unterschieden sich jedoch nicht von den Kontrolltieren. Eine Stimulation mit Dobutamin bewirkte auch hier etwa eine Erhöhung der Flächenverkleinerung um 10 % (Abb. 12 I). In den Kontrollen wurde eine kontraktionsbedingte Flächenverkleinerung von $52,8 \pm 3,3$ % gemessen und in den Mutanten eine von $52,9 \pm 6,3$. Der Unterschied war nicht signifikant.

Ein Vergleich des Schlagvolumens der Kontrollen und der Mutanten mit DOX zeigte keinen

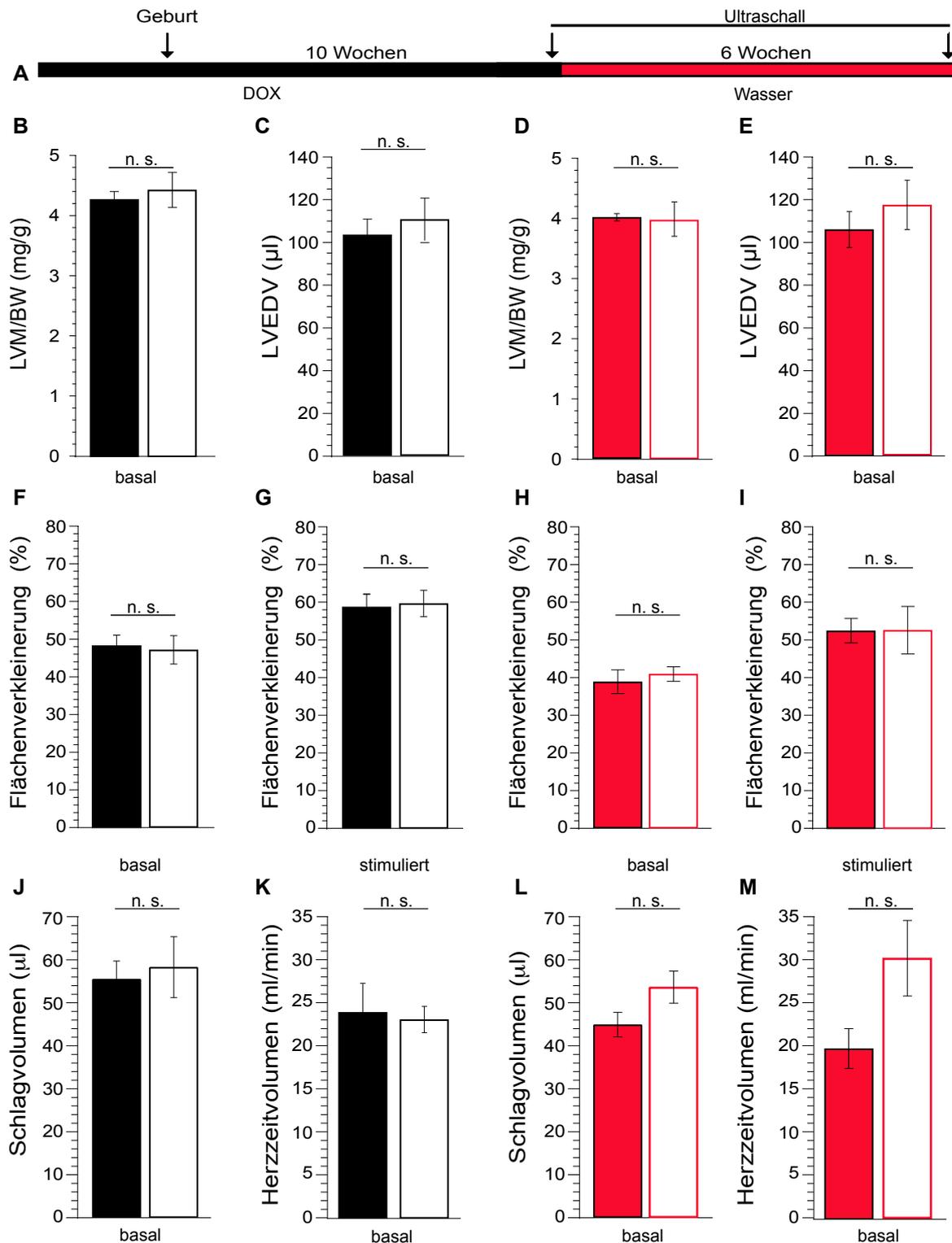


Abb. 12: Quantitative Analyse des Ultraschalls zur Überprüfung der ventrikulären Anatomie und Funktion in DW Mutanten (Founder A)

(A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. (B-M) Analyse der linksventrikulären Anatomie und Funktion der Kontrollen (gefüllte Balken, $N=5$) und Mutanten (offene Balken, $N=6$) auf DOX (schwarz) und Wasser (rot). (B, D) Quotient aus linksventrikulärer Masse zum Körpergewicht (LVM/BW), (C, E) linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (LVEDV), kontraktionsbedingte Flächenverkleinerung unter Basalbedingungen (F, H) und nach Stimulation (G, I), Schlagvolumen (J, L) und Herzzeitvolumen (K, M). Fehlerbalken: \pm SEM. n. s.: nicht signifikant.

signifikanten Unterschied (Abb. 12 J). Die Werte lagen bei $55,5 \pm 4,2 \mu\text{l}$ in den Kontrollen und bei $58,3 \pm 7,1 \mu\text{l}$ in den Mutanten mit DOX. Nachdem die Tiere auf Trinkwasser umgestellt worden waren, war das Schlagvolumen reduziert. In den Kontrollen lag es bei $44,8 \pm 2,8 \mu\text{l}$ und in den Mutanten bei $53,5 \pm 3,7 \mu\text{l}$. Es gab folglich einen Trend zu einem erhöhten Schlagvolumen in den Mutanten. Der Effekt war jedoch nicht signifikant ($P = 0,09$).

Das Herzzeitvolumen in den Kontrollen und Mutanten mit DOX war nicht signifikant unterschiedlich. Es lag in den Kontrollen bei $23,9 \pm 3,3 \text{ \% ml/min}$ und in den Mutanten bei $23,1 \pm 1,5 \text{ ml/min}$ (Abb. 12 K). Nach Absetzung der DOX-Behandlung blieb das Volumen in den Kontrollen vergleichbar. Es lag bei $19,9 \pm 2,3 \text{ ml/min}$. In den Mutanten führte die Transgenexpression zu einer Erhöhung des Herzzeitvolumens auf $30,2 \pm 4,4 \text{ ml/min}$ (Abb. 12 M). Der Effekt war nicht signifikant ($P = 0,07$).

Nach der zweiten Messung wurden die Mäuse präpariert und das Gesamtherzgewicht, das Gewicht der Vorhöfe und das der linken und rechten Kammer gravimetrisch bestimmt. Außerdem wurden zusätzlich noch Lunge und Leber gewogen. Alle Gewichte wurden auf das Körpergewicht der jeweiligen Maus normalisiert. Der Quotient aus Herzgewicht zu Körpergewicht (HW/BW) lag bei 5,6 (Abb. 13 A). Kontrollen ($5,6 \pm 0,3$) und Mutanten ($5,6 \pm 0,2$) ohne DOX-Behandlung unterschieden sich nicht signifikant. Auch der Quotient aus dem Gewicht der Vorhöfe und des Körpergewichts der Mäuse unterschied sich in beiden Gruppen nicht signifikant und lag bei $0,35 \pm 0,04$ in den Kontrollen und bei $0,34 \pm 0,03$ in den Mutanten (Abb. 13 B). Das Gleiche galt für den linken Ventrikel. Hier wurde ein Wert von $4,1 \pm 0,1$ für die Kontrollen und $3,9 \pm 0,1$ für die Mutanten errechnet (Abb. 13 C). Der Quotient aus dem Gewicht der rechten Herzkammer und des Körpergewichts lag in den Kontrollen bei $0,9 \pm 0,1$ und in den Mutanten bei $1,1 \pm 0,1$ (Abb. 13 D).

Die Normalisierung der Masse von Lunge und Leber auf das Körpergewicht zeigte ein signifikant erniedrigtes Gewicht der Lunge in den Mutanten mit Trinkwasserbehandlung im Vergleich zu den Kontrollen. Der Quotient der Mutanten lag bei $6,1 \pm 0,3$ und der der Kontrollen bei $7,0 \pm 0,3$. Der Quotient aus Lebergewicht zu Körpergewicht war nicht signifikant unterschiedlich. Er lag in den Mutanten bei $49,8 \pm 0,3$ und in den Kontrollen bei $50,0 \pm 0,8$.

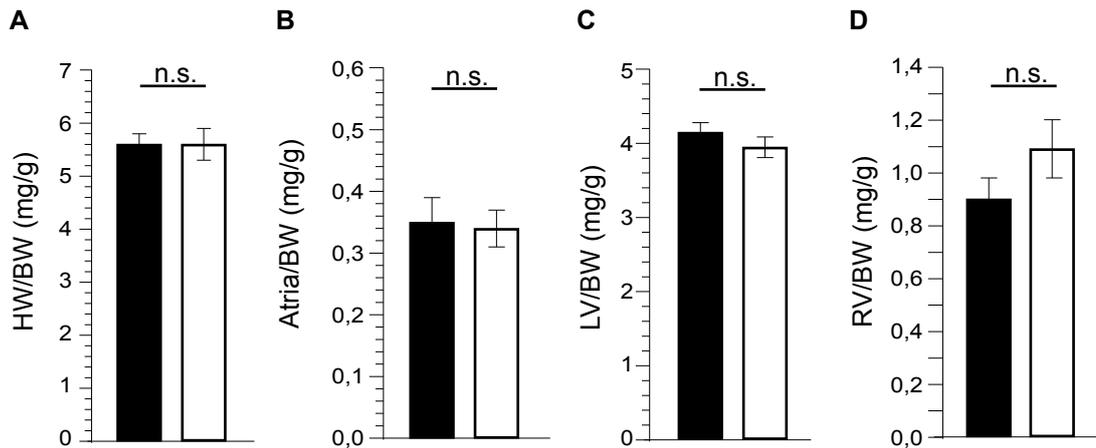


Abb. 13: Normalisierte Herz-, Vorhof-, links und rechtsventrikuläre Gewichte

Auf Körpergewicht normalisiertes Herzgewicht (A), Vorhofgewicht (B), linksventrikuläres Gewicht (C) und rechtsventrikuläres Gewicht (D) in Kontrollen (schwarze Balken, $N=5$) und Mutanten (weiße Balken, $N=6$) des Founders A. Fehlerbalken: \pm SEM; n. s.: nicht signifikant.

5.4.2 Ultraschall-Analyse in Tieren ohne DOX-Behandlung

Die Ultraschalluntersuchungen wurden ebenfalls in Tieren ohne DOX-Behandlung durchgeführt. Im Alter von 10 Wochen wurden die Daten zunächst unter Basalbedingungen und anschließend nach Dobutaminstimulation erhoben. Eine schematische Darstellung des Versuchsablaufs ist in Abb. 14 A dargestellt. Wie in den DW-Tieren wurde das linksventrikuläre enddiastolische Volumen (LVEDV), die auf das Körpergewicht normalisierte linksventrikuläre Masse (LVM/BW), die kontraktionsbedingte Flächenverkleinerung unter basalen Bedingungen und nach Stimulation, die Auswurffraktion und das Herzzeitvolumen bestimmt. Zwischen Kontrolltieren und doppelt transgenen Tieren konnte in keinem der beiden Founder unter Basalbedingungen ein signifikanter Unterschied in LVM/BW und im LVEDV gemessen werden.

LVM/BW lag in den Mutanten des Founders A bei $3,7 \pm 0,2$ mg/g und in den Kontrollen bei $4,4 \pm 0,3$ mg/g (Abb. 14 B). In den Mutanten des Founders F lag der Quotient bei $4,2 \pm 0,4$ mg/g und die Kontrollen bei $4,1 \pm 0,1$ mg/g (Abb. 14 D). LVEDV lag in den Mutanten des Founders A bei $99,1 \pm 11,9$ μ l und in den Kontrollen bei $95,6 \pm 7,4$ μ l (Abb. 14 C). Das der Mutanten des Founders F lag bei $86,2 \pm 5,03$ μ l und das der Kontrollen bei $93,0 \pm 9,1$ μ l (Abb. 14 E).

Die kontraktionsbedingte Flächenverkleinerung lag unter Basalbedingungen bei $40,4 \pm 2,3$ % in den Tieren von Founder A. Die Kontrollen lagen bei $41,7 \pm 5,7$ % (Abb. 14 F). In doppelt transgenen Tieren des Founders F wurde eine kontraktionsbedingte Flächenverkleinerung

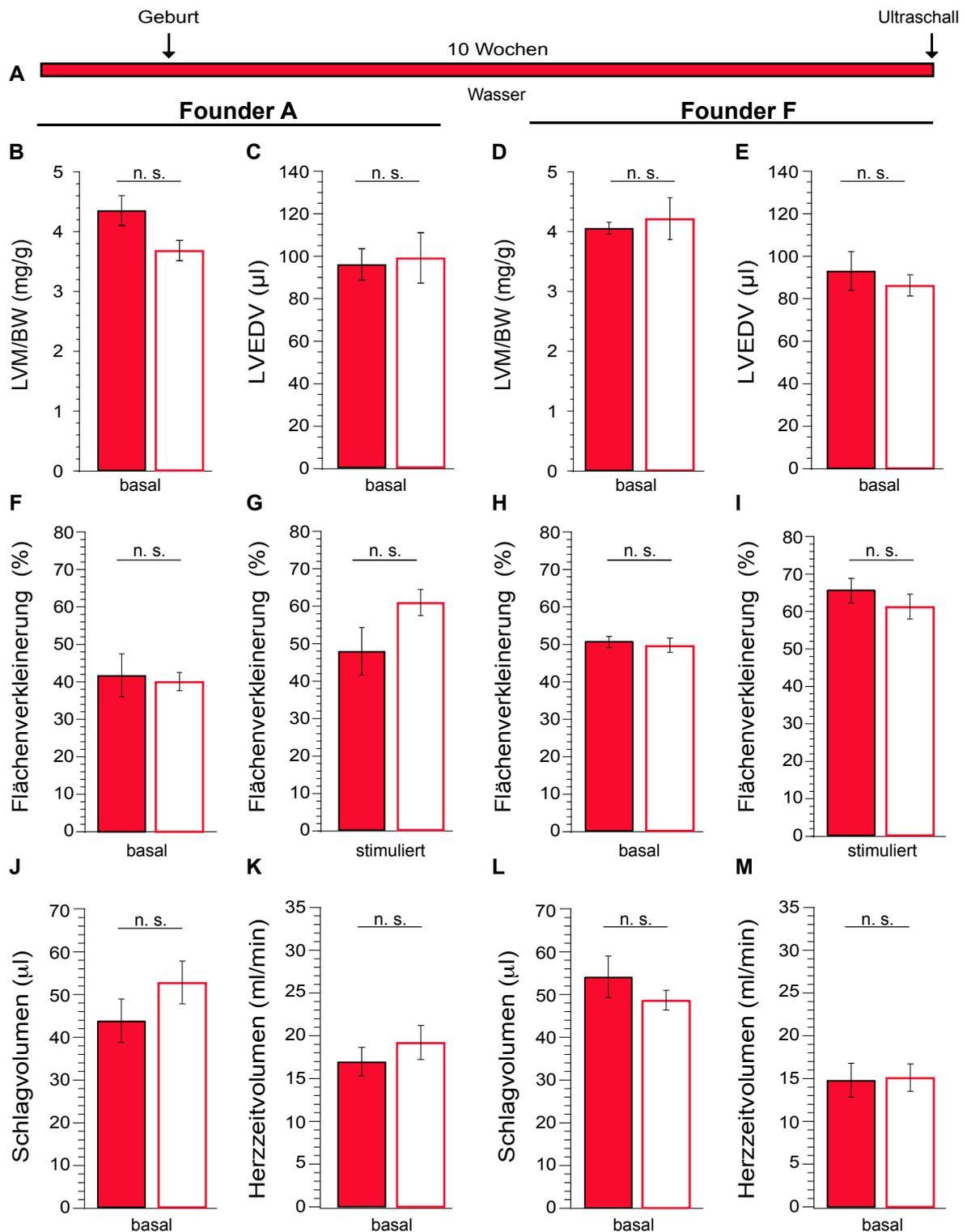


Abb. 14: Quantitative Analyse des Ultraschalls zur Überprüfung der ventrikulären Anatomie und Funktion in Mutanten ohne DOX-Behandlung
 (A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Untersucht wurden Founder A (links) und Founder F (rechts), wobei die Kontrollen ($N=4$ (A), $N=6$ (F)) in roten Balken und die Mutanten ($N=9$ (A), $N=6$ (F)) in weißen Balken dargestellt sind. (B, D) Quotient aus linksventrikulärer Masse zum Körpergewicht (LVM/BW), (C, E) linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (LVEDV), kontraktionsbedingte Flächenverkleinerung unter Basalbedingungen (F, H) und nach Stimulation (G, I), Schlagvolumen (J, L) und Herzzeitvolumen (K, M). Fehlerbalken: \pm SEM. n.s.: nicht signifikant.

von $49,8 \pm 2,1$ % gemessen. Die Kontrollen lagen bei $51,0 \pm 1,3$ % (Abb. 14 F).

Eine Stimulation mit Dobutamin bewirkte eine Erhöhung der Kontraktionskraft und eine Zunahme der Flächenverkleinerung. In den Kontrolltieren von Founder A konnte eine Zunahme um etwa 8 % auf $47,7 \pm 6,3$ % beobachtet werden und in den doppelt transgenen eine Zunahme auf $61,0 \pm 3,5$ % (Abb. 14 G). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. In den Tieren von Founder F bewirkte die Stimulation eine Zunahme auf $66,1 \pm 3,1$ % in den Kontrollen und $61,5 \pm 3,4$ % in den doppelt transgenen Tieren (Abb. 14 I). Wiederum war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant.

Das Schlagvolumen lag in den Tieren von Founder A in den Kontrollen bei $43,8 \pm 5,1$ μ l und in den Mutanten bei $52,8 \pm 5,0$ μ l (Abb. 14 J). Bei Founder F wurden in den Kontrolltieren $54,1 \pm 4,9$ μ l und in den Mutanten $48,7 \pm 2,3$ μ l pro Herzschlag gepumpt (Abb. 14 L). Der Unterschied war in beiden Gruppen nicht signifikant. Das Herzzeitvolumen lag bei $16,6 \pm 1,7$ ml/min in den Kontrollen bzw. bei $19,2 \pm 2,0$ ml/min in den Mutanten des Founders A (Abb. 14 K) und bei $14,9 \pm 2,0$ ml/min in den Kontrolltieren und bei $15,2 \pm 1,6$ in den Mutanten des Founders F (Abb. 14 M).

Um eine Hypertrophie des linken oder rechten Ventrikels oder eine Veränderung der Vorhöfe zu detektieren, wurden die Herzen der Tiere nach dem Ultraschall präpariert und die Gesamtmasse bzw. die Masse der Vorhöfe und des linken und rechten Ventrikels bestimmt. Die Gewichte wurden in Relation zum Körpergewicht gesetzt und sind in Abb. 15 grafisch dargestellt. Der Quotient aus Herzgewicht und Körpergewicht war in den doppelt transgenen Tieren weder in Founder A noch in Founder F im Vergleich zu den Kontrollen verändert. Er lag in den Kontrollen bei $5,5 \pm 0,2$ bzw. $6,0 \pm 0,4$ und bei $5,1 \pm 0,1$ in den Mutanten des Founders A und $5,5 \pm 0,2$ in den Mutanten des Founders F (Abb. 15 A und E). Die Relation der Vorhöfe zum Körpergewicht lieferte im Founder A in den Kontrollen einen Wert von $0,43 \pm 0,04$ und in den doppelt transgenen Tieren von $0,29 \pm 0,02$ (Abb. 15 B). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. In den Tieren des Founder F lag der Wert in den Kontrollen bei $0,36 \pm 0,06$ und in den Mutanten bei $0,37 \pm 0,06$ (Abb. 15 F). Die linksventrikuläre Masse lag nach Normierung zum Körpergewicht in den Kontrollen des Founders A bei $4,1 \pm 0,2$ und in den Mutanten bei $3,8 \pm 0,1$ (Abb. 15 C). Für die Kontrolltiere des Founders F wurde ein Wert von $4,2 \pm 0,2$ und für die Mutanten von $3,8 \pm 0,1$ errechnet (Abb. 15 G). Der Quotient aus rechtsventrikulärer Masse und Körpergewicht lag in den Kontrollen und den Mutanten des Founders A bei $0,9 \pm 0,1$ (Abb. 15 D). In den Tieren des Founders F wurde für die Kontrollen ein Wert von $1,2 \pm 0,1$ und für die Mutanten $1,1 \pm 0,1$ errechnet (Abb. 15 H).

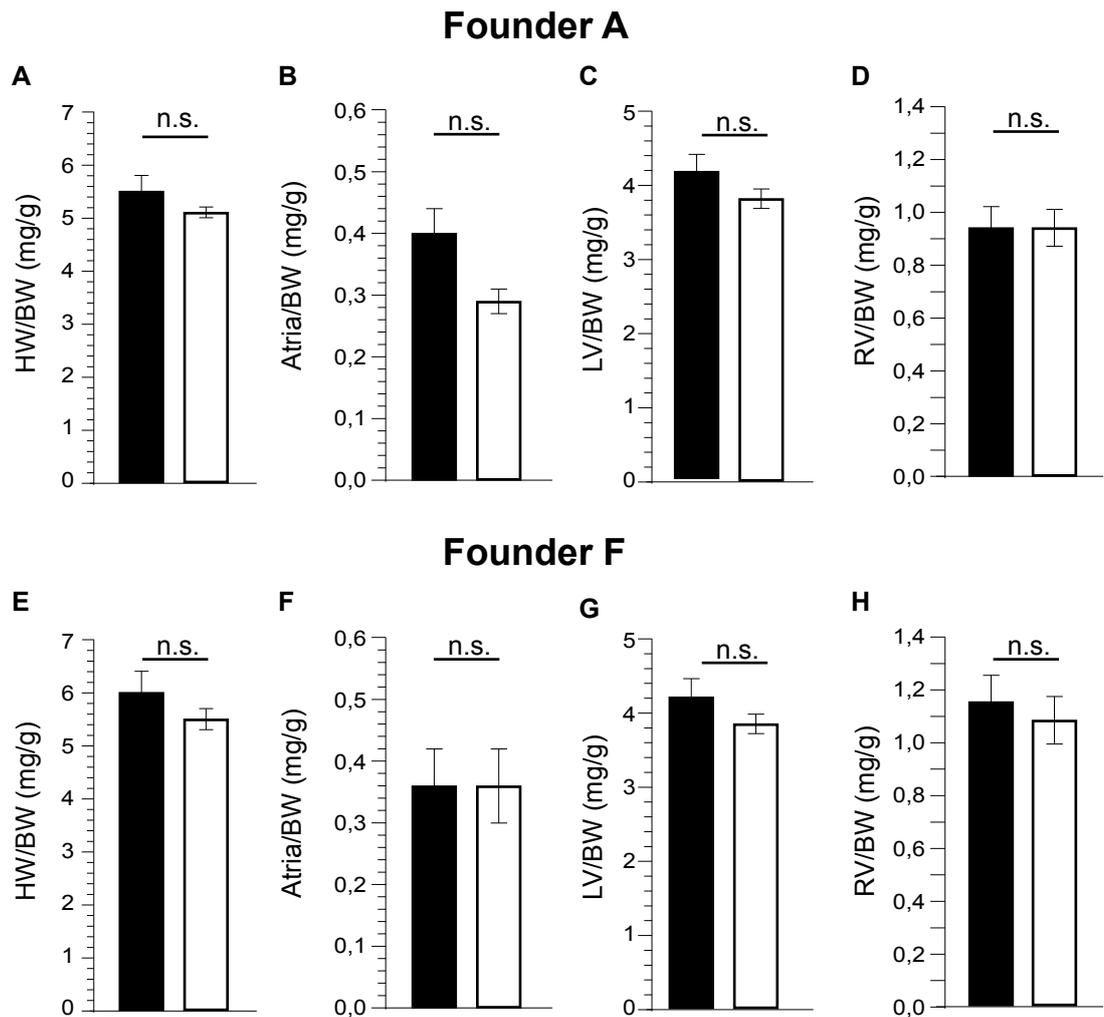


Abb. 15: Normalisierte Herz-, Vorhof-, links und rechtsventrikuläre Gewichte von Tieren ohne DOX-Behandlung. Untersucht wurden Tiere des Founders A (oben) und des Founders F (unten)

Auf Körpergewicht normalisiertes Herzgewicht (A, E), Vorhofgewicht (B, F), linksventrikuläres Gewicht (C, G) und rechtsventrikuläres Gewicht (D, H) in Kontrollen (schwarze Balken, $N=4$ (oben), $N=6$ (unten)) und Mutanten (weiße Balken) des Founders A ($N=9$) und F ($N=6$). Fehlerbalken: \pm SEM; n. s.: nicht signifikant

5.5 Elektrophysiologische Untersuchungen

5.5.1 Elektrophysiologie in akut isolierten Schrittmacherzellen

Die elektrophysiologischen Untersuchungen in isolierten Schrittmacherzellen des Sinus- und des AV-Knotens wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Matteo Mangoni an der Universität Montpellier durchgeführt. Es wurden Tiere ohne DOX-Behandlung, die das Transgen ein Leben lang exprimierten, verwendet. Um Nebeneffekte durch eine Expression im Ventrikel zu vermeiden, wurden Tiere des schwächer exprimierenden Founders A gewählt.

5.5.1.1 Eigenschaften des I_f in isolierten Sinusknotenzellen

Zunächst wurde der I_f in Schrittmacherzellen aus Kontrolltieren und Mutanten in der Spannungsklemme untersucht. Ausgehend von einem Haltepotenzial von -35 mV wurde in Schritten von 10 mV für 3 s eine Spannung von -40 bis -140 mV angelegt. Die gemessenen Stromfamilien wurden abhängig von der Zeit aufgetragen. In Abb. 16 A ist der in Kontrollzellen gemessene Einwärtsstrom dargestellt, dessen Amplitude und Aktivierungskinetik bei

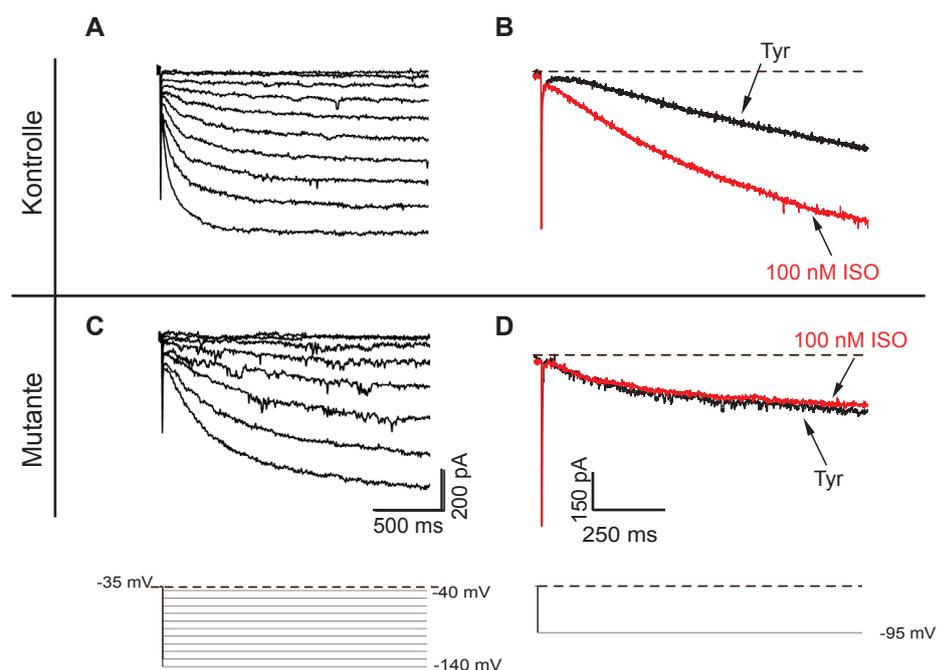


Abb. 16: I_f -Spuren gemessen in Schrittmacherzellen aus Kontrolltieren und Mutanten

Bei verschiedenen Membranpotenzialen wurde I_f in Schrittmacherzellen aus Kontrolltieren (A) und Mutanten (C) gemessen. Das Pulsprotokoll ist unter den Stromkurven dargestellt. Bei einem Membranpotenzial von -95 mV wurde der Effekt nach β -adrenerger Stimulation in Kontrolle (B) und Mutante (D) untersucht. Zunächst wurde in Tyrode-Lösung (Tyr, schwarze Spur) gemessen. Durch Zugabe von 100 nM ISO (rote Spur) vergrößert sich die Stromamplitude in den Kontrollzellen. In den Mutanten hatte die Zugabe von 100 nM ISO keinen Effekt.

negativeren Spannungen zunahm. Die I_f Aktivierungskinetiken der Schrittmacherzellen aus Mutanten waren bei einem angelegten Potenzial von -120 bis -140 mV wesentlich langsamer als in den Kontrollzellen (Abb. 16 C). Um den Effekt einer β -adrenergen Stimulation auf den I_f zu untersuchen, wurde der Strom zunächst bei einem Potenzial von -95 mV gemessen. Die Stromspuren aus Kontrollzellen und Mutanten unterschieden sich nicht signifikant (Abb. 16 B bzw. D). Imitierte man durch Applikation von Isoprenalin (ISO) zur extrazellulären Lösung eine β -adrenerge Stimulation, vergrößerte sich die Stromamplitude in den Kontrollzellen signifikant. Im Gegensatz dazu hatte die β -adrenerge Stimulation mit 100 nM ISO keinen Effekt auf die transgenen Schrittmacherzellen. Die Stromamplitude veränderte sich im Vergleich zu den Kontrollbedingungen in Tyrode-Lösung nicht.

Aus den gemessenen Stromamplituden und der Zellkapazität ließ sich die Stromdichte errechnen. Diese unterschied sich unter Kontrollbedingungen in Kontrollzellen und Mutanten nicht (Abb. 17 A und B, schwarze Kurve). Nach β -adrenerger Stimulation mit 100 nM ISO erhöhte sich die I_f -Dichte in den Kontrollzellen signifikant (Abb. 17 A, rote Kurve). Im Gegensatz dazu hatte die β -adrenerge Stimulation keinen Effekt auf die Stromdichten der den transgenen Schrittmacherzellen (Abb. 17 B, rote Kurve).

Mit Hilfe eines Rampenprotokolls, bei dem die Spannung kontinuierlich auf negativere Potenziale geklemmt wurde, konnte aus den gemessenen Strömen die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle berechnet werden. Die halbmaximale Aktivierung wurde ermittelt,

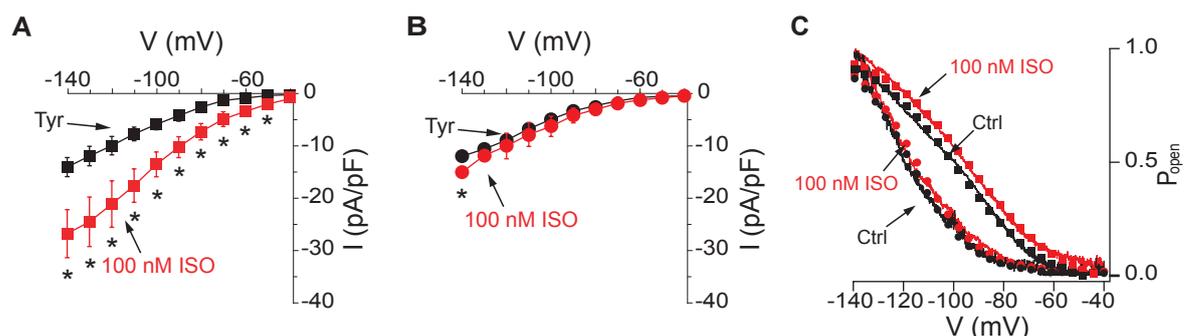


Abb. 17: I_f -Stromdichten und Kanaloffenwahrscheinlichkeiten in Schrittmacherzellen

(A) Die Stromdichte (I) des F-Stroms nahm in den Kontrollzellen in Tyrode-Lösung (Tyr) in Abhängigkeit von der Spannung zu (schwarze Quadrate). Durch Applikation von 100 nM ISO erhöhte sich die Stromdichte signifikant (rote Quadrate). (B) Unter Kontrollbedingungen (Tyr) hatten die Mutanten eine vergleichbare I_f -Stromdichte (schwarze Kreise). Die Zugabe von ISO veränderte diese nur bei einer Spannung von -140 mV und hatte bei den anderen Potenzialen keinen Effekt (rote Kreise). (C) Die halbmaximale Aktivierung ($V_{1/2}$) verschob sich in den Kontrollzellen im Vergleich zur Tyrode-Lösung (schwarze Quadrate) durch ISO um +9 mV zu positiveren Werten (rote Quadrate). Die Kanalverfügbarkeit war in den Mutanten zu negativeren Werten verschoben (schwarze Kreise) und wurde durch die Zugabe von ISO nicht signifikant verändert (rote Kreise). Fehlerbalken: \pm SEM, (* = $P < 0,05$).

indem die Offenwahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Spannung aufgetragen wurde (Abb. 12 C). In den Kontrollzellen lag sie in Tyrode-Lösung bei einer Spannung von -101 ± 3 mV. Die β -adrenerge Stimulation bewirkte eine Verschiebung der Aktivierungskurve zu positiveren Werten. Folglich lag auch $V_{1/2}$ bei einem positiveren Wert von -92 ± 2 mV. In den Mutantenzellen lag die halbmaximale Aktivierung in der extrazellulären Kontrolllösung bei -121 ± 3 mV. Sie war somit um 20 mV negativer als die der Kontrollzellen. Eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung über β -adrenerge Stimulation durch 100 nM ISO hatte in den Mutantenzellen eine nicht signifikante Verschiebung der halbmaximalen Aktivierung nach -123 ± 4 mV zur Folge.

Eine quantitative Analyse bezüglich der halbmaximalen Aktivierung ($V_{1/2}$), Steigungsfaktor und Aktivierungskonstante (τ_{act}) des unter Kontrollbedingungen (Tyr) und nach β -adrenerger Stimulation mit ISO in Kontroll- und Mutantenzellen gemessenen I_f und die statistische Analyse mit einem Mann-Whitney-U-Test sind in Tab. 1 zusammengefasst.

Parameter	Tyrode-Lösung				Nach ISO Stimulation			
	Kontrollen		Mutanten		Kontrollen		Mutanten	
	(A)	N	(B)	N	(C)	N	(D)	N
$V_{1/2}$ (mV)	-101 ± 3	6	-121 ± 3	10	-92 ± 2	7	-123 ± 4	6
Steigungsfaktor	$15,8 \pm 1,7$	6	$13,0 \pm 1,9$	10	$17,7 \pm 1,4$	7	$19,3 \pm 3,0$	6
τ_{act} (ms)	428 ± 65	7	1195 ± 169	7	371 ± 66	7	1780 ± 413	7
Statistik	P (A vs. B)		P (C vs. D)		P (A vs. C)		P (B vs D)	
$V_{1/2}$ (mV)	0,0053		< 0,0001		0,0312		0,6221	
Steigungsfaktor	0,3463		0,6165		0,4095		0,0752	
τ_{act} (ms)	0,0019		0,0103		0,0234		0,1040	

Tab. 1: Quantitative Charakterisierung von I_f in Sinusknotenzellen aus Kontrollen und Mutanten

In Kontroll- und Mutantensinusknotenzellen wurde die Spannung der halbmaximalen Aktivierung ($V_{1/2}$), der Steigungsfaktor und die Aktivierungskonstante (τ_{act}) unter Kontrollbedingungen (Tyr) und nach β -adrenerger Stimulation mit 100 nM ISO bestimmt. Die Werte entsprechen Mittelwerten \pm SEMs. Die Zellzahlen (N) sind für jedes Experiment angegeben. Die gemessenen Werte wurden mit einem Mann-Whitney-U-Test statistisch analysiert. Verglichen wurden jeweils Kontrolle und Mutante in Tyrode-Lösung und nach ISO Stimulation P (A vs. B), P (C vs. D), P (A vs. C) und P (B vs. D).

Zur Kontrolle, dass die Zugabe von ISO zur extrazellulären Lösung zu einer β -adrenergen Stimulation in den Sinusknotenzellen führte, wurden der vom L-Typ Calcium-Kanal vermittelte Strom analysiert. Die transportierte Ladung in Kontroll- und Mutantenzellen

wurde vor und nach der Applikation von 100 nM ISO bestimmt, statistisch ausgewertet und grafisch dargestellt (Abb. 18). In beiden Gruppen nahm die transportierte Ladung deutlich durch Zugabe von 100 nM ISO zu. Es konnte jedoch weder unter Kontrollbedingungen noch bei 100 nM ISO ein Unterschied zwischen Kontrollen und Mutanten festgestellt werden.

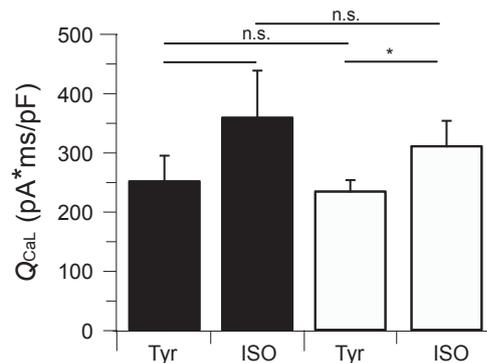


Abb. 18: Durch Calciumkanäle des L-Typs transportierte Ladung vor und nach Stimulation mit 100 nM ISO

Die von den Calciumkanälen transportierte Ladung nahm sowohl in den Kontrollzellen (schwarze Balken) als auch in den transgenen Zellen (offene Balken) nach der Stimulation mit ISO signifikant zu (* = $P < 0,05$). Kontrollzellen und Mutanten waren weder in Tyrode-Lösung (Tyr) noch nach ISO-Stimulation signifikant unterschiedlich. Fehlerbalken: \pm SEM; n. s.: nicht signifikant.

5.5.1.2 Rhythmische Aktivität der Sinusknotenzellen

Aus dem Sinusknoten isolierte Schrittmacherzellen haben eine intrinsische Aktivität, welche in den Kontrollzellen in der Stromklemme als rhythmische, aufeinanderfolgende Aktionspotenziale gemessen werden konnte. Durch Zugabe von 2 nM ISO erhöhte sich deren Frequenz (Abb. 19 A). In den aus den Mutanten isolierten Zellen traten die Aktionspotenziale unregelmäßig und sporadisch auf. Teilweise blieben die Zellen über mehrere Sekunden inaktiv. Durch Zugabe von 2 nM ISO konnte dieser Phänotyp teilweise vermindert werden. Nach einiger Zeit war es möglich, auch in den Mutantenzellen rhythmische Aktionspotentiale zu messen (Abb. 19 B). Diese wurden quantitativ bezüglich auf die Parameter Kontraktionsfrequenz, Aktionspotenzialamplitude, mittleres diastolisches Potenzial (MDP), Aktionspotenzialdauer (APD), Reizschwelle des Aktionspotenzials und die langsame diastolische Depolarisierung (*slow diastolic depolarisation*, SDD) analysiert (Tab. 2).

Aktionspotenzial (AP) Parameter	Sinusknotenzellen aus		P
	Kontrollen (N=15)	Mutanten (N=10)	
Kontraktionsfrequenz (min ⁻¹)	247 ± 16	165 ± 32	0,0209
AP-Amplitude (mV)	81 ± 4	83 ± 3	0,8228
MDP (mV)	-58 ± 1	-51 ± 2	0,0036
APD (ms)	112 ± 5	150 ± 15	0,0139
AP-Reizschwelle (mV)	-45 ± 2	-35 ± 9	0,1821
SDD (V/s)	0,084 ± 0,014	0,019 ± 0,007	0,0014

Tab. 2: Eigenschaften der Aktionspotenziale in Sinusknotenzellen aus Kontrolltieren und Mutanten

Sinusknotenzellen aus transgenen Tieren (N=10) hatten eine signifikant langsamere Kontraktionsrate im Vergleich zu Kontrollzellen (N=15). Aktionspotenzial (AP)-Amplitude und -Reizschwelle unterschieden sich nicht. Das mittlere diastolische Potenzial (MDP) ist in Mutantenzellen depolarisiert und die Dauer des APs (APD) ist verlängert. Die langsame Depolarisation (SDD) dauerte in Mutantenzellen länger. Die Werte entsprechen Mittelwerten ± SEM. Die statistische Analyse erfolgte mit ANOVA und anschließendem Tukey's HSD *posthoc*-Test.

In Abb. 19 C sind gemessene Beispielaktionspotenziale aus Kontroll- und Mutantenzellen vergrößert dargestellt. Die schwarzen Spuren entsprechen dem Membranpotenzial unter Kontrollbedingungen. In den Kontrollzellen sind einzelne, rhythmische Aktionspotenziale zu erkennen, deren Frequenz sich durch die Zugabe von ISO bis zu einer Endkonzentration von 100 nM erhöht. In den aus den transgenen Tieren isolierten Schrittmacherzellen war keine rhythmische Veränderung des Membranpotenzials zu messen. Die Aktionspotenziale traten unregelmäßig mit Pausen auf (Abb. 19 D). Nach β -adrenerger Stimulation durch 100 nM ISO zeigten die Zellen rhythmische Aktivität. Die Aktionspotenziale folgten jedoch in größeren Abständen aufeinander als in den Kontrollzellen (Tab. 3). Des Weiteren lag in den Mutanten eine Verschiebung des diastolischen Membranpotenzials im Vergleich zu den Kontrollzellen vor. Diese Depolarisation wurde bei längerer rhythmischen Aktivität der Zelle nach ISO-Stimulation aufgehoben.

Die Schlagfrequenz der Kontrollzellen war in Tyrode-Lösung signifikant schneller verglichen mit den rhythmisch aktiven Mutantenzellen. Mit ISO konnte die Frequenz zwar dosisabhängig in beiden Gruppen erhöht werden, die signifikante Differenz in der Schlagfrequenz blieb jedoch zwischen den beiden Gruppen unabhängig von der ISO-Konzentration erhalten (Tab. 3 und Abb. 19 E). Etwa 30 % der Mutantenzellen waren rhythmisch inaktiv. Durch Zugabe von ISO war es möglich, die Anzahl der ruhenden Zellen dosisabhängig zu verringern. Ein Teil der Zellen (ca. 15 %) blieb jedoch inaktiv (Abb. 19 F).

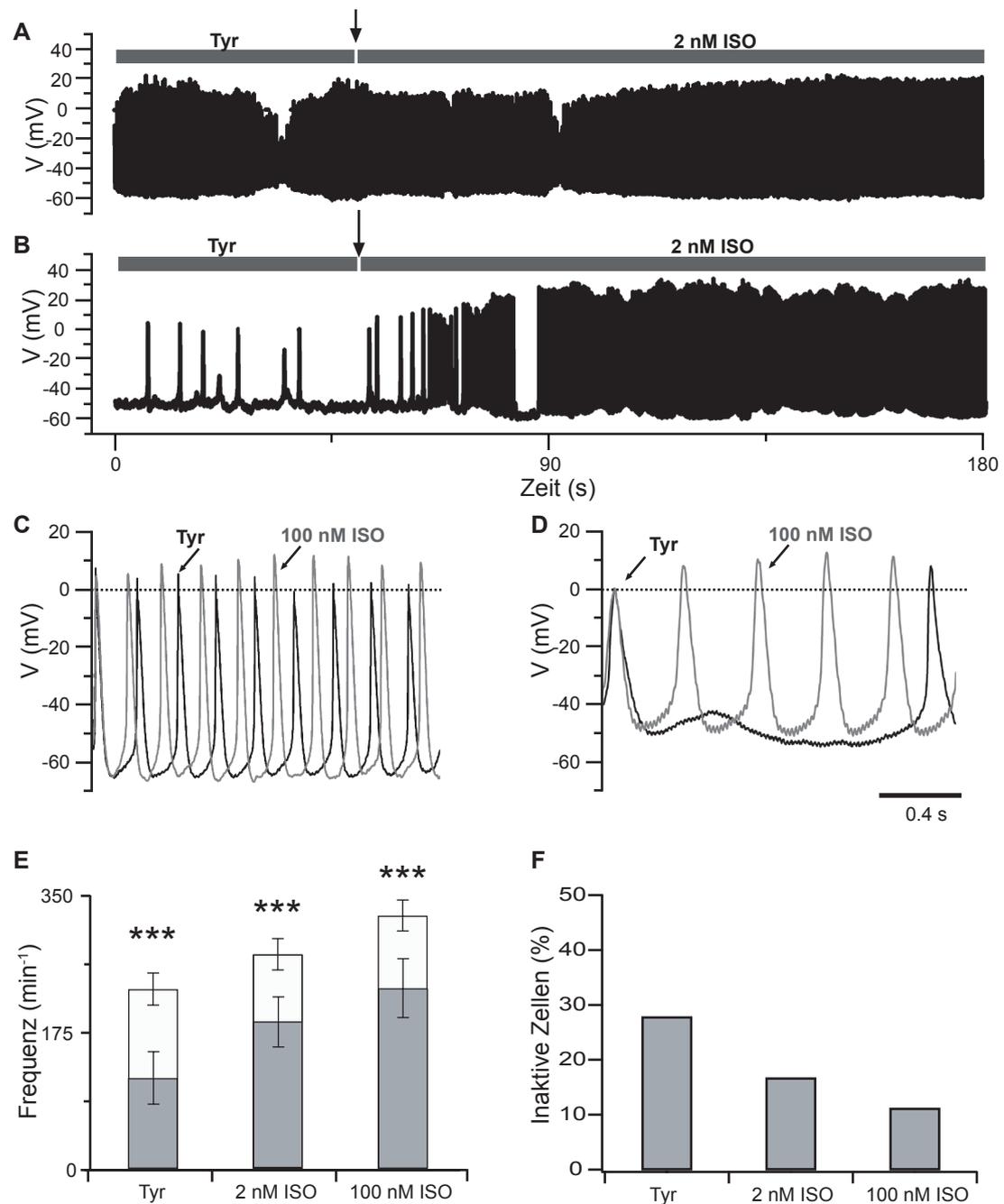


Abb. 19: Schrittmacheraktivität in Sinusknotenzellen aus Kontrolltieren und Mutanten

(A) In Sinusknotenzellen aus Kontrolltieren wurden rhythmisch aufeinanderfolgende Aktionspotenziale gemessen, deren Frequenz durch submaximale Dosis von 2 nM ISO gesteigert werden konnte. (B) Die Aktionspotenziale traten in Mutantenzellen sporadisch auf und wurden durch Oszillationen des Membranpotenzials unterbrochen. Durch 2 nM ISO wurde eine kontinuierliche Aktivität der Zellen ausgelöst. (C) Kürzeres Intervall der Kontrollaktionspotenziale in Tyrode-Lösung (schwarze Spur) und nach maximaler Stimulation mit 100 nM ISO (graue Spur). (D) Vergrößert ist die Membranoszillation aus Mutantenzellen in Tyr mit sporadischen APs dargestellt. Durch 100 nM ISO wird die Zelle rhythmisch aktiv, jedoch ist die Frequenz langsamer als in den Kontrollzellen. (E) Die Schlagfrequenz der Mutantenzellen (graue Balken) ist unter Kontrollbedingungen (Tyr) und bei beiden ISO-Konzentrationen signifikant langsamer im Vergleich zu den Kontrollzellen (weiße Balken). (F) Etwa 30 % der Sinusknotenzellen, die aus Mutanten isoliert wurden, hatten keine spontane Schrittmacheraktivität. Der Anteil der stillen Zellen konnte dosisabhängig mit ISO-Stimulation verringert werden. Fehlerbalken: \pm SEM; *** = $P < 0,001$

	Frequenz (min ⁻¹)		P
	Kontrollen	Mutanten	
Tyr	231 ± 21	117 ± 35	0,0001
2 nM ISO	275 ± 20	188 ± 35	0,0003
100 nM ISO	325 ± 20	232 ± 43	0,0002

Tab. 3: β -adrenerge Stimulation der Schrittmachertätigkeit von Sinusknotenzellen

Sinusknotenzellen aus transgenen Tieren ($N=12$) haben eine signifikant langsamere Kontraktionsrate als die Kontrollzellen ($N=10$). Stimulation mit ISO erhöht die Frequenz dosisabhängig. Bei maximaler Stimulation erreichen die Mutanten die basale Frequenz der Kontrollen. Die Werte entsprechen Mittelwerten \pm SEMs. Die statistische Analyse erfolgte mit ANOVA und anschließendem Tukey's HSD *posthoc*-Test.

5.5.1.3 Rhythmische Aktivität der AV-Knotenzellen

Neben dem Sinusknoten als primären Schrittmacher gibt es im Herzen weitere Bereiche, die bei Ausfall des Sinusknotens die Erregung einleiten können. Eine wichtige Rolle spielt zum Beispiel der AV-Knoten. Auch hier gibt es Schrittmacherzellen, die eine intrinsische Aktivität haben und eine Kontraktion in den Ventrikeln hervorrufen können. Im Vergleich zu den Sinusknotenzellen ist ihre Stimulationsfrequenz allerdings etwas geringer. Da die cAMP-insensitive Kanaluntereinheit auch im AV-Knoten exprimiert wurde, sollte untersucht werden, ob die rhythmische Aktivität in den AV-Knotenzellen durch die cAMP-Insensitivität des I_f verändert war. In AV-Knotenzellen aus Kontrolltieren konnten rhythmisch auftretende Aktionspotenziale gemessen werden (Abb. 20 A). Die Zellen aus doppelt transgenen Tieren hingegen hatten eine arrhythmische Aktivität. Die Aktionspotenziale traten nur sporadisch auf und blieben zeitweise gänzlich aus. Im Vergleich zur Kontrollzelle war das diastolische Membranpotenzial zu einer positiveren Spannung verschoben. Es lag bei etwa -50 mV (Abb. 20 B), während das der Kontrollen bei etwa -55 mV lag. Die Zellen, die aus Kontrolltieren isoliert wurden, kontrahierten spontan mit einer Frequenz von 217 ± 21 min⁻¹. Diese Frequenz ließ sich durch Stimulation mit ISO dosisabhängig steigern (Abb. 20 C). Die Kontraktionsfrequenz lag nach 2 nM ISO bei 257 ± 34 min⁻¹ und nach 100 nM ISO bei 274 ± 23 min⁻¹. In den AV-Knotenzellen aus doppelt transgenen Tieren war die Kontraktionsrate signifikant verlangsamt. Sie lag unter Basalbedingungen bei 62 ± 27 min⁻¹. Durch Stimulation mit ISO konnte man die Frequenz wie in den Kontrolltieren steigern. Nach 2 nM ISO kontrahierten die Zellen mit einer Frequenz von 102 ± 53 min⁻¹. Bei maximaler Stimulation von 100 nM ISO waren die Werte nicht mehr signifikant unterschiedlich. Die Mutanten lagen bei 211 ± 50 min⁻¹ (Abb. 20 D).

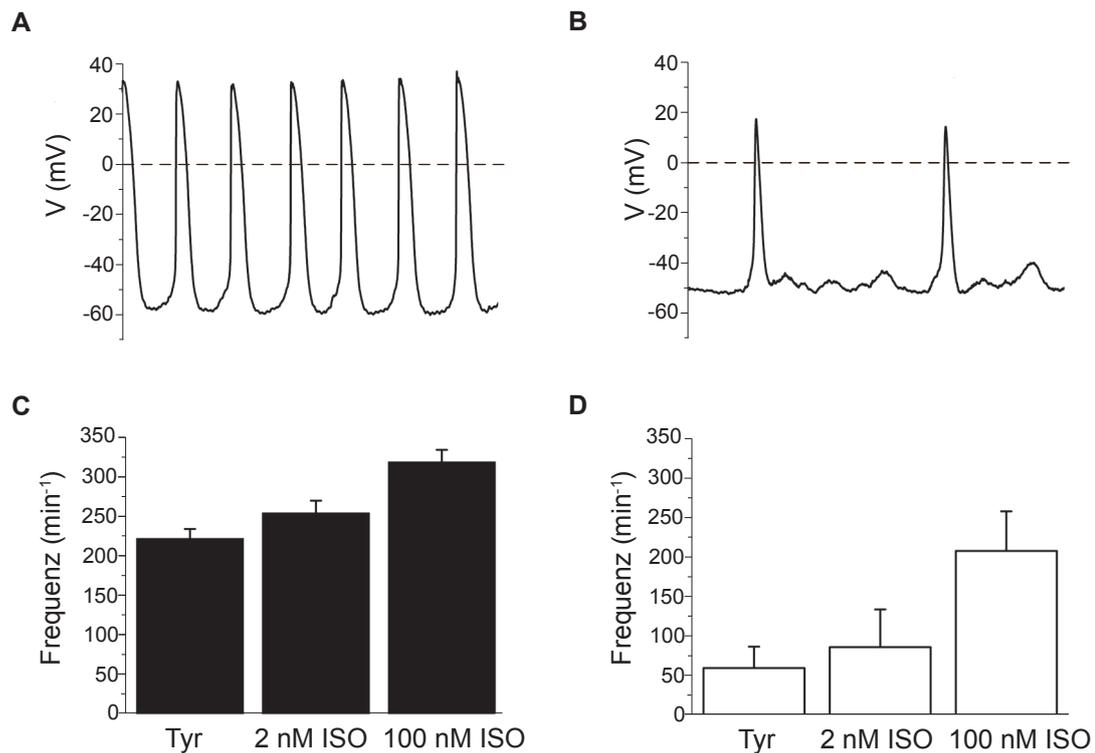


Abb. 20: Schrittmacheraktivität in AV-Knotenzellen aus Kontrolltieren und Mutanten
 Aktionspotenziale in Tyrode-Lösung gemessen in Kontrollzellen (A) und Mutantenzellen (B). Kontraktionsfrequenz in Kontrollzellen (C) und Mutantenzellen (D) unter Kontrollbedingungen (Tyr) und nach Stimulation mit 2 nM bzw. 100 nM ISO.

5.5.2 Telemetrische EKG Messungen

Mit Hilfe von *in vivo* EKG-Telemetriemessungen wurde anschließend untersucht, welchen Beitrag der unstimulierte und der mit cAMP stimulierte I_f zur Herzfrequenz leisten. Hierfür wurden PhysioTel Telemetriesender in adulte Mäuse implantiert und die Elektroden so gelegt, dass die elektrischen Potenzialänderungen am Herzen an der Körperoberfläche abgeleitet und im Zeitverlauf aufgezeichnet werden konnten. Die Tiere konnten sich dabei frei in den Käfigen bewegen, während das Signal über eine Empfängerplatte an einen angeschlossenen Computer übertragen und von diesem digital gespeichert wurde.

Anschließend wurde den Tieren der spezifische HCN-Kanal-Blocker Ivabradin intraperitoneal injiziert. Aus dem Unterschied zwischen der cAMP-insensitiven und I_f blockierten Herzfrequenz konnten Rückschlüsse auf den unstimulierten Beitrag des Stroms zur Herzfrequenz gezogen werden.

Um einen Effekt durch die Injektion ausschließen zu können, wurden die Tiere zunächst mit NaCl behandelt. Anschließend erfolgte die Injektion des Kanalblockers. Die Herzfrequenz

der Kontrolltiere nach NaCl-Injektion lag bei $535 \pm 25 \text{ min}^{-1}$ und damit signifikant über der Herzfrequenz der Mutanten, die mit einer Frequenz von $452 \pm 23 \text{ min}^{-1}$ schlugen (Abb. 21). Nach der Injektion von 3 mg/kg Ivabradin verringerte sich die mittlere Herzrate der Kontrolltiere auf $442 \pm 23 \text{ min}^{-1}$ und lag somit im Bereich der basalen Mutantenschlagfrequenz. In den Mutanten hatte eine Injektion von 3 mg/kg Ivabradin keinen signifikanten Effekt im Vergleich zur basalen Herzrate. Die mittlere Frequenz betrug $425 \pm 40 \text{ min}^{-1}$. Eine Erhöhung der Dosis auf 6 mg/kg hatte weder in den Kontrolltieren noch in den Mutanten eine zusätzliche Auswirkung. Es wurden Frequenzen von $442 \pm 16 \text{ min}^{-1}$ in den Kontrollen und $425 \pm 57 \text{ min}^{-1}$ in den Mutanten gemessen.

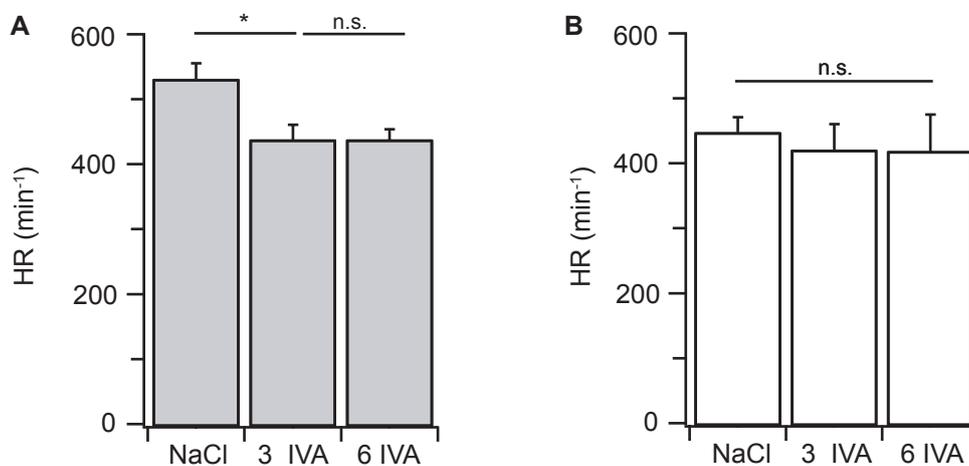


Abb. 21: Herzfrequenzen nach NaCl- und Ivabradin-Injektion in Kontrolltieren und Mutanten
 (A) In den Kontrolltieren bewirkte die Injektion von 3 mg/kg Ivabradin (3 IVA) eine signifikante Reduktion der Frequenz (HR) im Vergleich zur NaCl-Injektion. 6 mg/kg Ivabradin (6 IVA) hatte keinen zusätzlichen Effekt. (B) In den Mutanten war die Herzfrequenz nach NaCl-Injektion niedriger als in den Kontrolltieren. Weder die Injektion von 3 mg/kg noch von 6 mg/kg Ivabradin hatte auf die Herzfrequenz der Mutanten einen signifikanten Effekt. (* = $P < 0,05$)

Inwiefern sich die cAMP-Insensitivität des I_f physiologisch auf die Erregung, deren Weiterleitung und auf die Schlagfrequenz des Herzens auswirkte, wurde in adulten Mäusen untersucht. Da die Tiere unterschiedlich mit DOX behandelt wurden, sind sie im Folgenden in zwei Unterpunkten beschrieben.

5.5.2.1 EKG Messungen in DW Mäusen

Um eventuelle Kompensationen des Phänotyps während der Embryonal- oder Postnatalentwicklung, zum Beispiel durch veränderte Expressionsspiegel anderer Ionenkanäle zu vermeiden, wurde den Tieren bereits im Mutterleib DOX über das Trinkwasser verabreicht. Die Behandlung erfolgte sowohl in Kontrollen als auch in transgenen Tieren. Im Alter von 10-12 Wochen wurde den Mäusen ein Telemetrie-Sender implantiert, wodurch es möglich war, in frei beweglichen Mäusen das EKG zu messen. Nachdem sich die Tiere von dem Eingriff erholt hatten, wurde das EKG aufgezeichnet. Anschließend wurde die DOX-Behandlung gestoppt, was zur Transgenexpression führte. Das EKG wurde erneut gemessen. Im Anschluss wurden die M- und die β -Rezeptoren, über die das autonome Nervensystem unter anderem die Herzfrequenz reguliert, mit Hilfe von Atropin und Propranolol blockiert und das EKG der Mäuse untersucht. Eine schematische Darstellung des Versuchsablaufs ist in Abb. 22 A dargestellt.

Das aufgezeichnete EKG wurde hinsichtlich verschiedener Parameter analysiert. Zunächst wurde die mittlere Herzfrequenz der Tiere unter den verschiedenen Bedingungen aktivitätsabhängig ermittelt. Die Aktivitäten wurden in Gruppen gebündelt (Aktivitätsbins) und ein Mittelwert von den entsprechenden Herzfrequenzen gebildet. Die erhaltenen Werte wurden gegeneinander aufgetragen. Die Herzfrequenz der Kontrolltiere mit DOX erhöhte sich in Abhängigkeit von der Aktivität von $456 \pm 24 \text{ min}^{-1}$ in Ruhe auf $623 \pm 20 \text{ min}^{-1}$ bei sehr hoher Aktivität (Abb. 22 B, schwarze Balken). Die Herzfrequenz der Mutanten mit DOX (schwarze, offene Balken) unterschied sich nicht von den Kontrolltieren. Sie lag bei $470 \pm 12 \text{ min}^{-1}$ in Ruhe und bei $630 \pm 12 \text{ min}^{-1}$ bei Aktivität. Wurde die DOX-Behandlung beendet und die Tiere mit Trinkwasser versorgt, veränderte sich die Herzfrequenz der Mutanten signifikant: Durchschnittlich verringerte sich die Schlagfrequenz in jedem Aktivitätsbin um etwa 50 min^{-1} (Abb. 22 C, rote offene Balken) verglichen zu den Kontrolltieren (rote Balken). In Ruhe wurde eine mittlere Frequenz von $450 \pm 24 \text{ min}^{-1}$ in den Kontrolltieren und $398 \pm 5 \text{ min}^{-1}$ in den Mutanten gemessen. Bei hoher Aktivität betrug die mittleren Herzraten $623 \pm 18 \text{ min}^{-1}$ in den Kontrollen und $566 \pm 16 \text{ min}^{-1}$ in den Mutanten. Die Herzrate blieb jedoch weiterhin regulierbar. Die Frequenz der Kontrolltiere mit Wasser-Behandlung unterschied sich nicht von der Frequenz der Tiere mit DOX-Behandlung. Unter Blockade des autonomen Nervensystems sanken die Herzraten in den Kontrolltieren signifikant ab (Abb. 22 D, blaue Balken). In Ruhe lag die mittlere Herzfrequenz in den Kontrollen bei $411 \pm 5 \text{ min}^{-1}$ und erhöhte sich bei Aktivität auf $546 \pm 18 \text{ min}^{-1}$. Die Frequenzen der Mutanten (blaue, offene Balken) unterschieden sich nicht signifikant von denen der Kontrollen. Die mittlere Herzrate

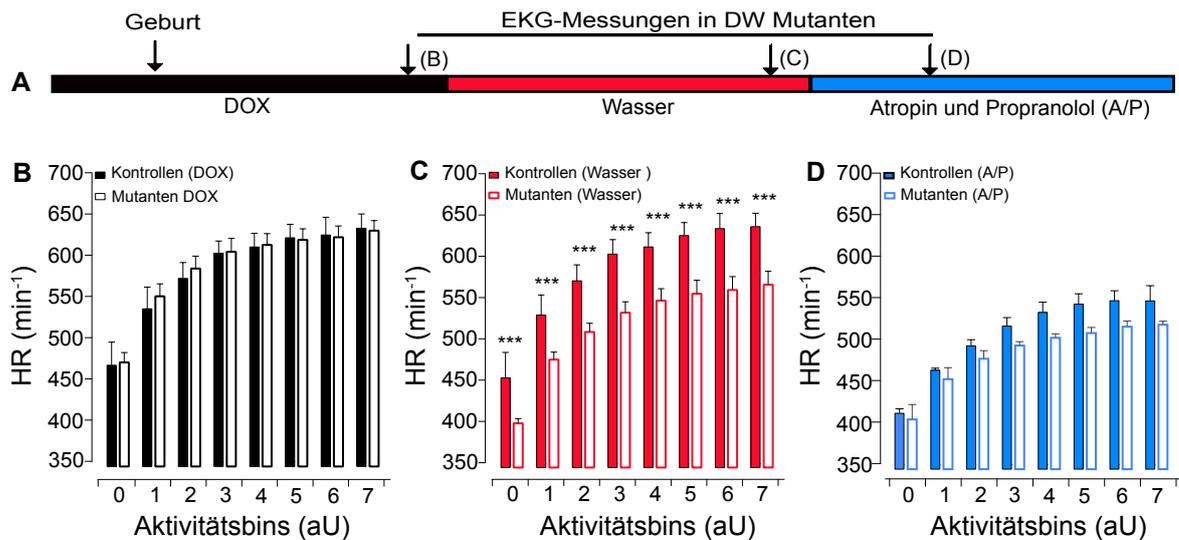


Abb. 22: Telemetrisch gemessene Herzfrequenzen unter DOX, Wasser und pharmakologischer Blockade des autonomen Nervensystems

(A) Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Versuchsdurchführung und der pharmakologischen Behandlung. In den Abbildungen B-C ist jeweils die mittlere Herzfrequenz (HR) in Abhängigkeit von der in Bins unterteilte Aktivität in Kontrolltieren (ausgefüllte Balken, $N=4$) und Mutanten (offene Balken, $N=6$) dargestellt. Unter DOX-Behandlung (B) unterschieden sich die Herzfrequenzen der beiden Gruppen nicht. In beiden nahm die Frequenz mit zunehmender Aktivität zu. (C) Unter Wasser-Behandlung war die Herzfrequenz der Mutanten langsamer im Vergleich zu den Kontrollen. Sie konnte jedoch weiterhin reguliert werden und stieg mit zunehmender Aktivität. (D) Nach Verabreichung von Atropin und Propranolol (A/P) verlangsamte sich die Herzfrequenz. Der Effekt wirkte sich stärker auf die Kontrollen aus. Die von der Aktivität abhängige relative Frequenzsteigerung war in beiden Gruppen kleiner. Fehlerbalken: \pm SEM; *** = $P < 0,001$.

lag bei $404 \pm 10 \text{ min}^{-1}$ in Ruhe und bei $518 \pm 7 \text{ min}^{-1}$ bei hoher Aktivität.

Ein Vergleich der relativen aktivitätsabhängigen Herzfrequenzsteigerungen ($\Delta \text{HR}_{\text{max-min}}$), die aus der in Differenz aus mittlerer maximaler und mittlerer minimaler Herzfrequenz errechnet wurden, zeigte, dass sich die Mutanten mit DOX mit $160 \pm 18 \text{ min}^{-1}$ nicht signifikant von den Kontrolltieren mit DOX ($166 \pm 21 \text{ min}^{-1}$) unterschieden (Abb. 23 A). Nach Verabreichung von Wasser lag die aktivitätsabhängige Frequenzzunahme bei $183 \pm 18 \text{ min}^{-1}$ in den Kontrollen und bei $168 \pm 16 \text{ min}^{-1}$. Unter Blockade des autonomen Nervensystems war die relative Frequenzzunahme in beiden Gruppen geringer und lag in den Kontrollen bei $135 \pm 23 \text{ min}^{-1}$ und in den Mutanten bei $114 \pm 11 \text{ min}^{-1}$.

Von jedem Tier wurde außerdem ein 24 h-EKG analysiert, indem ein gleitender Durchschnitt der Herzfrequenz über zehn Sekunden ermittelt wurde. In jeder Gruppe wurde die mittlere Häufigkeit jeder Herzfrequenz ermittelt und auf die maximale Anzahl normalisiert. Wurde im Anschluss die normalisierte Häufigkeit einer Herzrate gegen die entsprechende Herzrate aufgetragen, erhielt man ein 24 h-Histogramm. In Abb. 23 B sind die Histogramme für die Kontrolltiere unter den verschiedenen Bedingungen dargestellt. In den meisten Fällen waren

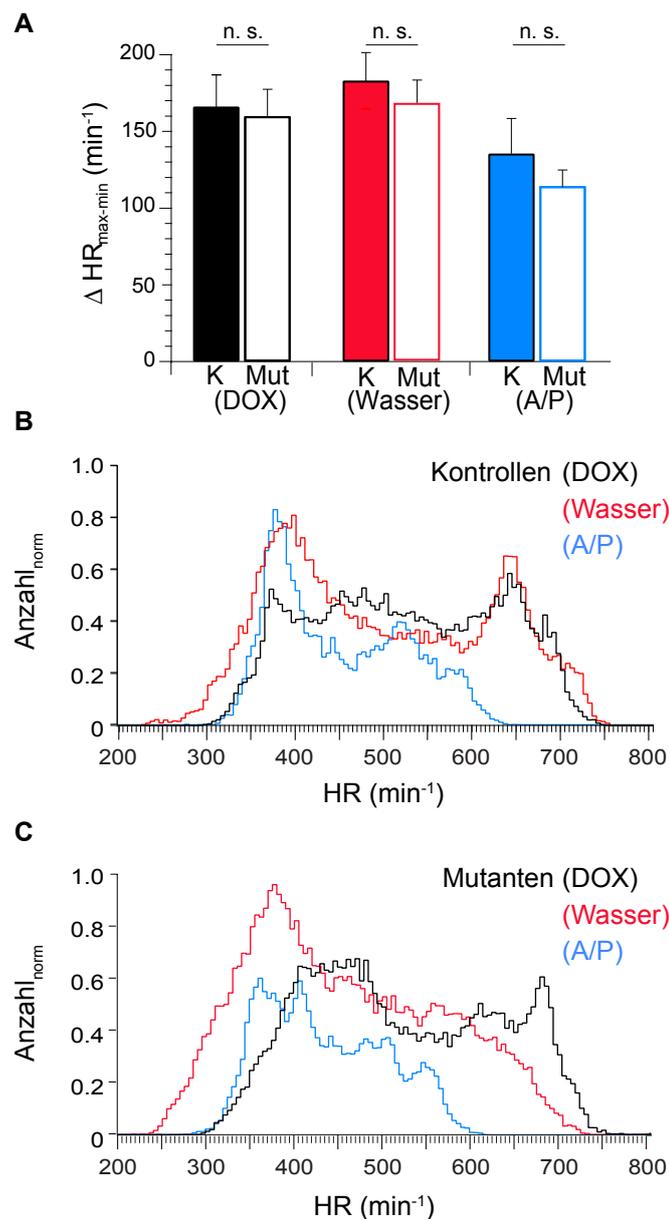


Abb. 23: Relative Frequenzsteigerung und Histogramme der mittleren Herzfrequenzen in DW Tieren

(A) Die relative Frequenzsteigerung ($\Delta HR_{\max-\min}$) unterschied sich nicht in den Kontrollen ($N=4$) und Mutanten ($N=6$) nach Behandlung mit DOX (schwarze Balken), mit Wasser (rote Balken) und mit Atropin und Propranolol (A/P, blaue Balken). (B, C) Verteilung der in Kontrolltieren (B) und Mutanten (C) in 24 h gemessenen mittleren Herzfrequenzen (HR) mit DOX (schwarz), Wasser (rot) und A/P (blau). Fehlerbalken: \pm SEM; n. s.: nicht signifikant

zwei Höchstwerte zu sehen, um die sich die anderen Werte verteilten. In den Kontrolltieren mit DOX (schwarze Linie) lag einer dieser Werte bei 370 min⁻¹ und der andere Wert bei 640 min⁻¹. Nach Wasser-Behandlung (rote Linie) lagen die Höchstwerte bei 400 min⁻¹ und 640 min⁻¹. Unter Blockade des autonomen Nervensystems verschoben sich die Werte nach 380 min⁻¹ und 520 min⁻¹. Dabei war jedoch die Breite der Verteilungskurven wesentlich schmaler im Vergleich zu den vorher genannten Bedingungen. Ebenso verringerte sich

die absolute Bandbreite der gemessenen Herzfrequenzen. Während die Werte nach DOX- und Wasser-Behandlung von $300\text{-}750\text{ min}^{-1}$ bzw. $225\text{-}755\text{ min}^{-1}$ reichten, wurden unter Atropin und Propranolol ausschließlich Werte im Bereich von $310\text{-}630\text{ min}^{-1}$ gemessen. Die normalisierten Histogramme der transgenen Tiere sind in Abb. 23 C dargestellt. Wurde den Tieren DOX verabreicht, so schwankten die Herzraten um die beiden Höchstwerte 450 min^{-1} und 685 min^{-1} . Nach Beendigung der Antibiotikabehandlung verschob sich das Histogramm nach links und die Höchstwerte lagen bei 380 min^{-1} und 560 min^{-1} (rote Linie). Unter autonomer Blockade gab es zwei lokale Maxima bei 360 min^{-1} und 410 min^{-1} und ein weiteres Maximum bei 550 min^{-1} (blaue Linie). Die absolute Bandbreite der Herzrate dieser Tiere mit DOX-Behandlung reichte von $295\text{-}755\text{ min}^{-1}$. Ohne DOX verschob sie sich zwar auf $235\text{-}725\text{ min}^{-1}$, lag aber noch in einer vergleichbaren Größe im Vergleich zu den Werten mit DOX. Unter Atropin und Propranolol verringerte sich die absolute Bandbreite in den Mutanten deutlich. Sie reichte nun nur noch von $290\text{-}615\text{ min}^{-1}$.

Wurde das EKG der einzelnen Tiere analysiert, fielen keine Unregelmäßigkeiten auf. In Abb. 24 A sind 200 ms lange Beispiel-EKG-Spuren von einem Kontrolltier, einer Mutante mit und ohne DOX-Behandlung in Ruhe und bei hoher Aktivität dargestellt. In allen Spuren traten die typischen Merkmale eines EKGs, wie die P-Welle und den QRS-Komplex auf. Lediglich die Frequenz der Herzschläge war in der Mutante ohne DOX langsamer als die des Kontrolltiers und der Mutante mit DOX, die sich nicht voneinander unterschieden.

Um zu überprüfen, ob es zu Verzögerungen in der Erregungsweiterleitung in den transgenen Tieren kam, wurden die einzelnen Bereiche des EKGs detailliert analysiert. Hierfür wurden die Dauer des PQ-Intervals, die der Erregung der Vorhöfe und des AV-Knotens entspricht, und die Dauer des QT-Intervals, die die Erregung des Ventrikels und dessen Repolarisation widerspiegelt, in Ruhe und bei hoher Aktivität bestimmt. QT wurde zusätzlich auf die Herzfrequenz normalisiert und als QT_c angegeben. Die Dauer des PQ-Intervals von Kontrolltieren und Mutanten mit DOX bzw. Wasser in Ruhe unterschied sich nicht (Abb. 24 B). Ebenso gab es keinen Unterschied bei hoher Aktivität. Das QT_c aller drei Gruppen zeigte weder in Ruhe noch bei Aktivität einen signifikanten Unterschied (Abb. 24 C).

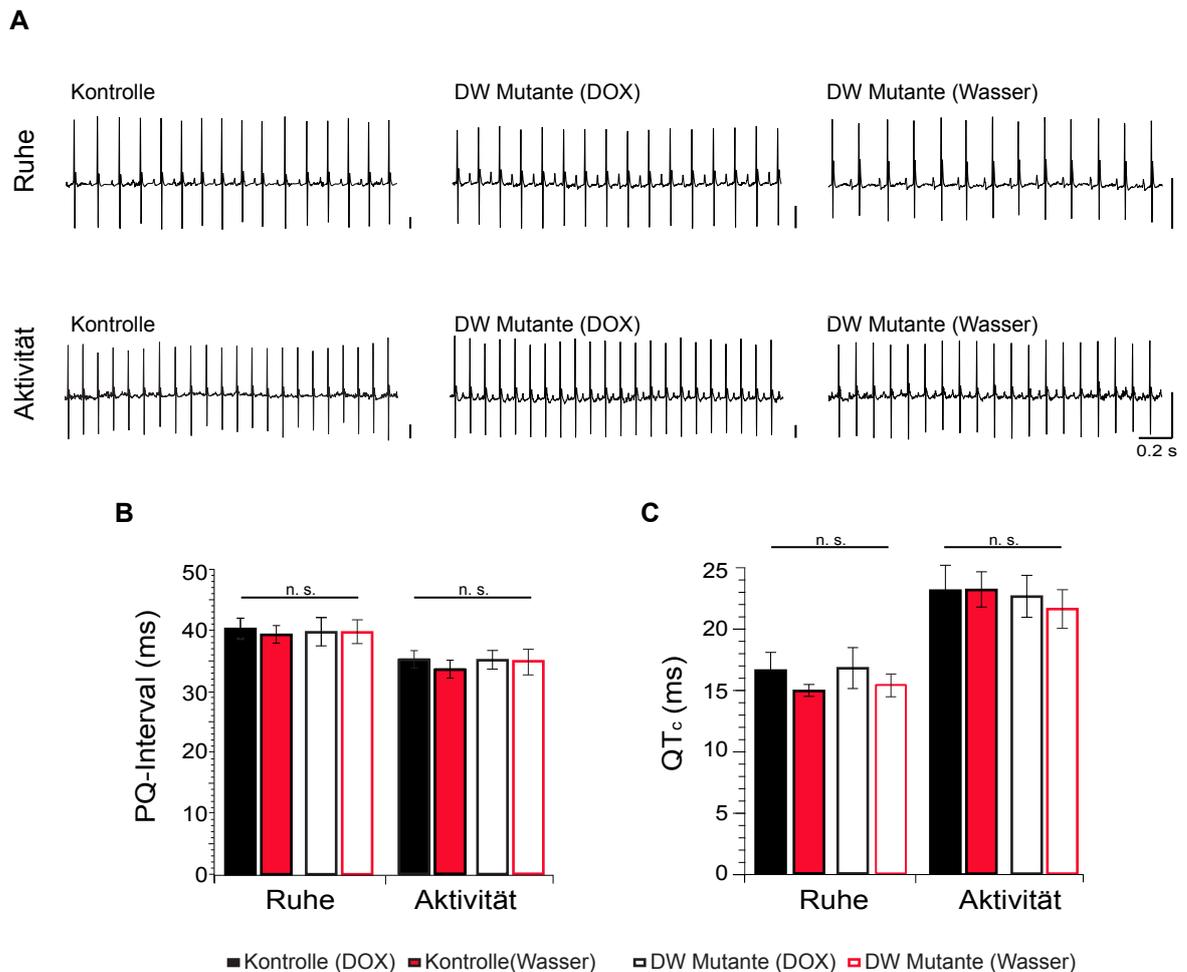


Abb. 24: EKG-Beispielspuren und EKG-Analyse in Ruhe und bei Aktivität

(A) Beispielspuren eines Kontrolltiers und einer Mutante mit DOX und Wasser in Ruhe und bei Aktivität. Der Maßstabsstrich entspricht 0,2 mV. (B) Dauer des PQ-Intervals in Kontrolltieren ($N=6$) während DOX-Behandlung (Kontrolle DOX), nach Wasser-Behandlung (Kontrolle Wasser) und Mutanten ($N=6$) während DOX-Behandlung (Mutante DOX) und Wasser-Behandlung (Mutante Wasser) in Ruhe und bei Aktivität. (C) Normalisierte QT Zeit (QT_c) in Kontrolltieren und Mutanten während DOX-Behandlung und Wasser-Behandlung in Ruhe und bei Aktivität. Fehlerbalken: \pm SEM; n. s.: nicht signifikant.

5.5.2.2 EKG Messungen in WD Mäusen

In diesem Versuchsteil wurde untersucht, ob sich der Phänotyp der Mutanten ändert, wenn sie das Transgen bereits während der Embryonalentwicklung und postnatal exprimieren. Dazu wurden die schwangeren Mäuse und ihre Nachkommen - sowohl Kontrollen als auch Mutanten - bis zur Implantation mit normalem Trinkwasser versorgt. Im Alter von 10-12 Wochen wurde den Mäusen ein EKG-Telemetriesender implantiert. Sobald sich die Mäuse von der Operation erholt hatten, wurde das EKG aufgezeichnet. Anschließend wurde den Mäusen DOX im Trinkwasser verabreicht, um die Expression der cAMP-insensitiven

hHCN4-Kanaluntereinheit zu unterdrücken. Nach vier Wochen erfolgte eine erneute EKG-Messung. Der Ablauf der Behandlung ist schematisch in Abb. 25 A dargestellt. Die Daten wurden auf unterschiedliche Weise analysiert: Zunächst wurden die mittleren Herzfrequenzen der Kontrolltiere mit denen der transgenen Tiere in Abhängigkeit von der Aktivität miteinander verglichen. Eine signifikante Reduktion der Frequenzen war bei fast allen Aktivitäten in den transgenen Tieren zu messen. Die Modulation der Herzrate war jedoch nicht beeinträchtigt. Wie in den DW Tieren nahm die mittlere Herzfrequenz mit zunehmender Aktivität zu und die absoluten Werte waren nur in den Bereich niedrigerer Frequenzen verschoben. Wurden dieselben Tiere für vier Wochen mit DOX behandelt und die Transgenexpression supprimiert, verschwand der Unterschied der mittleren Herzfrequenzen bei höheren Aktivitäten. In Ruhephasen bzw. bei geringen Aktivitäten war weiterhin ein Unterschied in den Herzraten zu messen, der im Vergleich zu den Wasserwerten sogar ausgeprägter war. Dieser Effekt wurde ebenfalls in den relativen aktivitätsabhängigen Frequenzsteigerungen deutlich. Die Differenz aus mittlerer maximaler und mittlerer minimaler Herzfrequenz ($\Delta HR_{\text{max-min}}$) unterschied sich in Mutanten und Kontrollen ohne DOX-Behandlung nicht

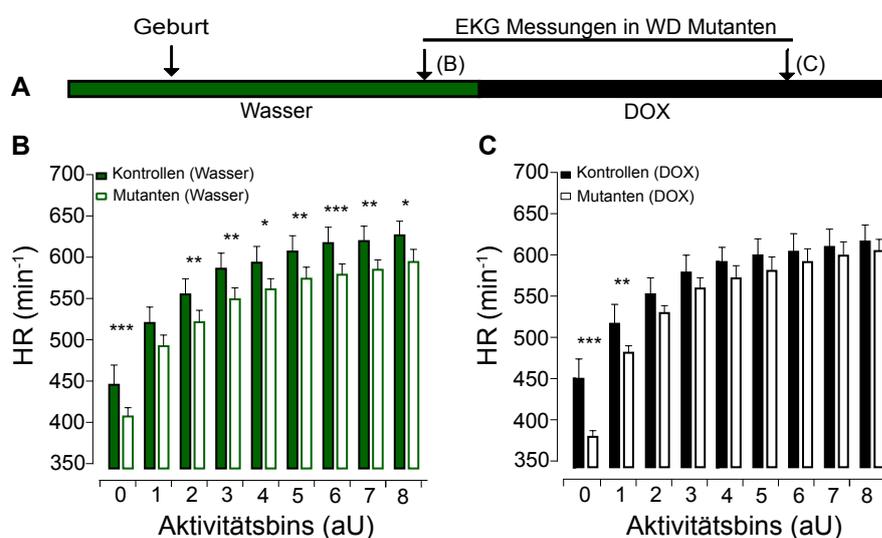


Abb. 25: Telemetrisch gemessene Herzfrequenzen ohne und mit DOX-Behandlung

(A) Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Versuchsdurchführung und der pharmakologischen Behandlung. In den Abbildungen B und C ist jeweils die mittlere Herzfrequenz (HR) in Abhängigkeit von der in Bins eingeteilten Aktivität in Kontrolltieren (ausgefüllte Balken, $N=5$) Mutanten (offene Balken, $N=6$) dargestellt. Nach Umstellung auf Wasser-Behandlung (B) schlugen die Herzen der Mutanten in fast allen Bins signifikant langsamer als die Herzen der Kontrollen. In beiden nahm die Frequenz mit zunehmender Aktivität zu und ließ sich folglich regulieren. (C) Mit DOX verschwand der Herzfrequenzunterschied der Mutanten bei höheren Aktivitäten. In Ruhe und bei niedrigeren Aktivitäten war die Frequenz der Mutanten deutlich langsamer im Vergleich zu den Kontrollen. Fehlerbalken: \pm SEM; * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$.

signifikant (Abb. 26 A). $\Delta HR_{\text{max-min}}$ lag in den Kontrollen bei $183 \pm 18 \text{ min}^{-1}$ und in den Mutanten bei $166 \pm 20 \text{ min}^{-1}$. Nach DOX-Behandlung gab es einen Trend dafür, dass der Bereich der gemessenen Herzfrequenzen in den Mutanten größer war als in den Kontrollen. Die Δ -Werte der Kontrollen lagen bei $166 \pm 20 \text{ min}^{-1}$ und die der Mutanten bei $219 \pm 14 \text{ min}^{-1}$. Die in 24 h gemessenen mittleren Herzraten der mit Wasser bzw. DOX behandelten

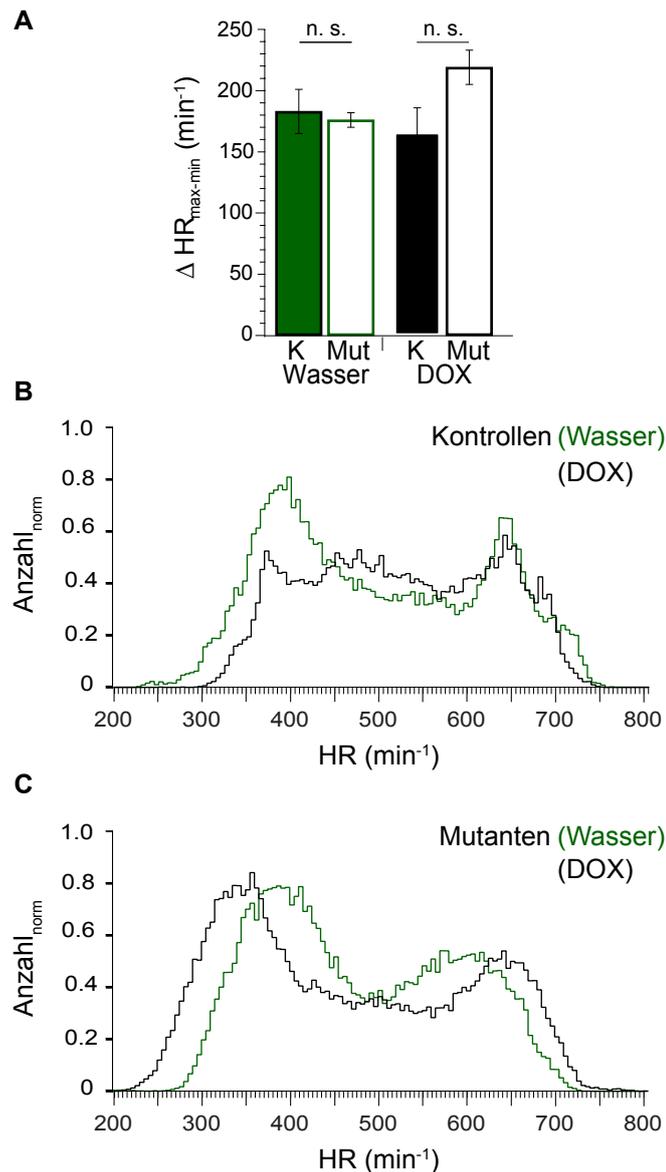


Abb. 26: Relative Frequenzsteigerung und Histogramme der mittleren Herzfrequenzen in WD Tieren

(A) Die relative Frequenzsteigerung ($\Delta HR_{\text{max-min}}$) unterschied sich in den Kontrollen (gefüllte Balken, $N=4$) und Mutanten mit Wasser-Behandlung (offene Balken, $N=6$) nicht. Wurden die Tiere mit DOX behandelt, gab es in den Mutanten einen Trend für eine Vergrößerung des Bereichs zwischen der maximalen und minimalen gemessenen Herzfrequenz. Verteilung der in 24 h gemessenen mittleren Herzfrequenzen (HR) in Kontrolltieren (B, $N=6$) und Mutanten (C, $N=6$) mit Wasser (grün) und DOX (schwarz).

Kontrolltiere lagen zwischen 300 min^{-1} und 750 min^{-1} bzw. 225 min^{-1} und 755 min^{-1} (Abb. 26 B). In den nicht behandelten Mutanten waren die Frequenzen ähnlich wie in den Kontrollen und lagen zwischen 265 min^{-1} und 735 min^{-1} . Durch die Behandlung mit DOX verbreiterte sich das Histogramm und es wurden Werte zwischen 215 min^{-1} und 785 min^{-1} gemessen (Abb. 26 C). Somit war die absolute Bandbreite an gemessenen Herzfrequenzen in den Mutanten mit DOX-Behandlung breiter als die der Mutanten nach Wasser-Behandlung und die der Kontrolltiere. Im Gegensatz zu den DW Mutanten wurde keine Verschiebung der Verteilungskurve in eine Richtung beobachtet. Stattdessen lagen die Werte der beiden Maxima in den mit Wasser behandelten Mutanten mit 385 min^{-1} und 605 min^{-1} näher zusammen. Die Maxima waren in den gleichen Tieren, nachdem sie mit DOX behandelt worden waren, in entgegengesetzte Richtungen verschoben und lagen bei 330 min^{-1} und 650 min^{-1} .

In den EKG-Spuren der einzelnen Tiere konnten Arrhythmien beobachtet werden: Es traten unter anderem sowohl in Ruhe als auch bei Aktivität AV-Blöcke zweiten Grades auf; d. h., eine P-Welle konnte zwar detektiert werden, aber der darauffolgende QRS-Komplex blieb intermittierend aus. Funktionell bedeutete das, dass die Vorhöfe zwar normal erregt wurden, dass die Weiterleitung des Signals zu den Ventrikeln jedoch gestört war und deren Kontraktion ausblieb. Die AV-Blöcke traten entweder einzeln oder mehrfach hintereinander auf (Abb. 27 A). Des Weiteren wurden in den transgenen Tieren nach Wasser-Behandlung supraventrikuläre Extrasystolen beobachtet. Die P-Welle war in diesem Fall biphasisch und das RR-Interval verkürzt. Folglich hatte das Herz einen akzessorischen Schrittmacher außerhalb des Sinusknotens und die Vorhöfe kontrahierten zum Teil retrograd. Nach Behandlung der transgenen Tiere mit DOX verschwanden diese Überleitungsstörungen. Eine quantitative Analyse des EKGs, in der die Dauer des PQ-Intervals und des frequenzkorrigierten QT-Intervals bestimmt wurden, zeigte in den transgenen Tieren eine Verlängerung der PQ-Zeit. Dies war sowohl in Ruhe als auch bei Aktivität der Fall (Abb. 27 B). Man bezeichnet dies auch als AV-Block ersten Grades. Durch die Verabreichung von DOX verschwand dieser Phänotyp. Das korrigierte QT-Intervall (QT_c) war in den transgenen Tieren nach Wasser-Behandlung weder in Ruhe noch bei Aktivität verändert (Abb. 27 C).

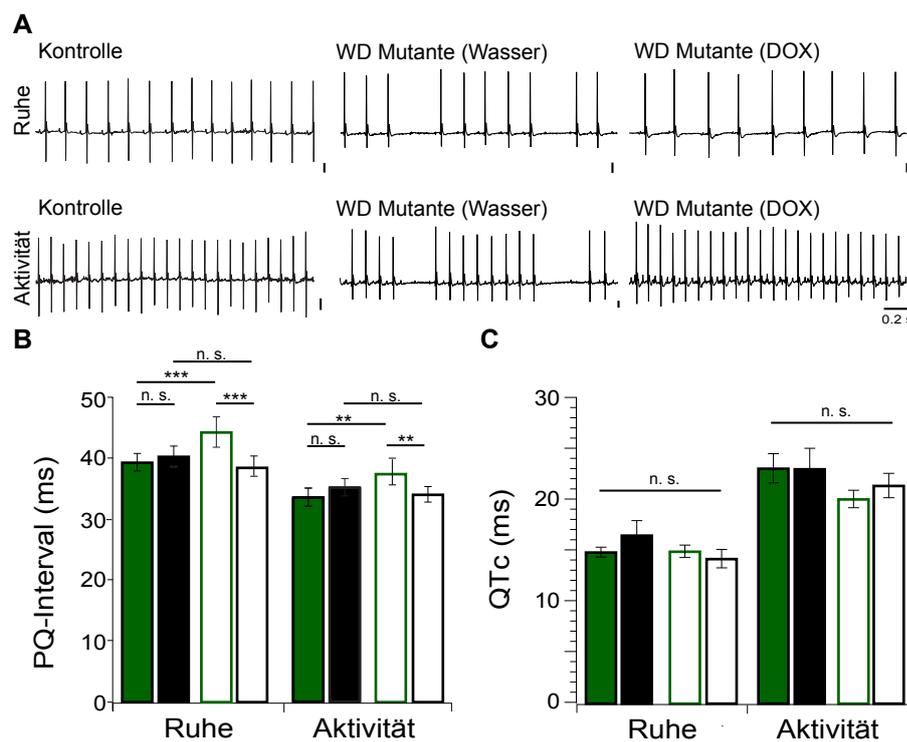


Abb. 27: EKG-Spuren und EKG-Analyse in WD Mutanten

(A) Repräsentative EKG-Spuren eines Kontrolltiers und einer Mutante nach Wasser- und DOX-Behandlung in Ruhe und bei hoher Aktivität. AV-Blöcke zweiten Grades sind im EKG der Mutante ohne Antibiotika-Behandlung zu erkennen, die nach der Behandlung mit DOX verschwinden. (B) In der EKG-Analyse wurde in den Mutanten ohne DOX-Behandlung (grüne, offene Balken) ein verlängertes PQ-Interval in Ruhe und bei Aktivität gemessen als in den Kontrollen ohne DOX-Behandlung (grüne Balken) und den Mutanten (schwarze, offene Balken) und Kontrollen (schwarze Balken) mit DOX-Behandlung. Der Effekt verschwand nach Behandlung mit DOX. (C) Die Dauer des korrigierten QT-Intervalls (QT_c) war nicht verändert (Farben wie in B). Fehlerbalken: \pm SEM; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$.

6 Diskussion

Der komplexe Mechanismus, der der spontanen Aktivität der Sinusknotenzellen zugrunde liegt, beruht auf einem Zusammenspiel von Ionenkanälen, spontaner intrazellulärer Calcium-Freisetzung und Ionttransportern. Der jeweilige Beitrag und die entsprechende Regulation durch das autonome Nervensystem ist jedoch noch nicht bis ins Detail bekannt. Insbesondere die Rolle der HCN-Kanäle als Schrittmacher wird in der Literatur intensiv diskutiert (Maltsev und Lakatta, 2008; Mangoni und Nargeot, 2008; DiFrancesco, 2006; Lipsius und Bers, 2003; Kodama *et al.*, 2002). Während Mutationen in *HCN4* zu Sinusbradykardie und Herzrhythmusstörungen im Menschen führen (Nof *et al.*, 2007; Milanesi *et al.*, 2006; Ueda *et al.*, 2004; Schulze-Bahr *et al.*, 2003), wurde ein ähnlicher Phänotyp bislang nicht in Mausmodellen beschrieben. Weder in *HCN4*- bzw. *HCN2-Knockout* Mäusen (Herrmann *et al.*, 2007; Ludwig *et al.*, 2003) noch in einer *HCN4-R669Q-Knockin* Maus (Harzheim *et al.*, 2008) wurden veränderte Ruhe- oder maximale Herzfrequenzen beobachtet. Im Gegensatz dazu führt die Verwendung des spezifischen I_f -Blockers Ivabradin sowohl im Menschen als auch in Nagetieren zu einer verringerten Herzrate (Barbuti *et al.*, 2007; Leoni *et al.*, 2005; Borer *et al.*, 2003). Dies spricht wiederum für eine Bedeutung des I_f in der Rhythmogenese. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe eines geeigneten Modells die physiologische Bedeutung des I_f für den Herzrhythmus in der adulten Maus untersucht. Von besonderem Interesse war dabei die Regulation durch das autonome Nervensystem über intrazelluläres cAMP.

6.1 Entwicklung eines Mausmodells mit induzierbarer cAMP-Insensitivität von kardialen HCN-Kanälen

Das in dieser Arbeit etablierte Mausmodell exprimiert eine dominant-negative cAMP-insensitive *HCN4*-Kanaluntereinheit. Das Transgen basiert auf einer natürlich vorkommenden humanen Mutation, in der eine Basendeletion in *HCN4* durch Verschiebung des Leserasters zu einem verkürzten C-Terminus des Proteins und damit zum Verlust der Bindestelle der zyklischen Nukleotide führt (Schulze-Bahr *et al.*, 2003). Im heterologen Expressionssystem wird die Mutante an die Zelloberfläche transportiert und hat auf *HCN4*-Wildtyp Untereinheiten einen dominant-negativen Einfluss: Bei Koexpression von Wildtyp

und Mutante verliert die Wildtyp-Kanaluntereinheit die Eigenschaft, durch cAMP moduliert zu werden. Die halbmaximale Aktivierung der Kanäle wird nicht mehr durch cAMP-Bindung zu positiveren Werten verschoben. Die Ionenleitfähigkeit des Kanals bleibt jedoch erhalten (Schulze-Bahr *et al.*, 2003).

Durch das Tet-off System ist es möglich, die Mutante herzspezifisch und zeitlich kontrolliert zu exprimieren. Im Herzen der Maus kann man die Untereinheiten HCN1, HCN2 und HCN4 nachweisen, wobei HCN4 die bevorzugte Untereinheit im Sinusknoten ist (Liu *et al.*, 2007; Marionneau *et al.*, 2005; Moosmang *et al.*, 2001). Durch Verpaarung der Promotormauslinie mit einer GFP exprimierenden Reportermauslinie wurde untersucht, ob der α MHC-Promotor geeignet ist, das Transgen auch im Sinusknoten zu exprimieren. Die aus doppelt transgenen Tieren isolierten Sinusknotenzellen leuchten grün, was darauf schließen lässt, dass die cAMP-insensitive HCN4-Mutante ebenfalls in den Schrittmacherzellen doppelt transgener Tiere exprimiert wird und somit die endogenen HCN-Untereinheiten dominant-negativ beeinflussen kann.

Für die Untersuchung der I_f Modulation durch cAMP wurde eine Responderlinie etabliert, die die humane Kanaluntereinheit mit der beschriebenen Basendeletion exprimiert. Zwei von sechs Foundern (A und F) exprimierten das Transgen nach Verpaarung mit der Promotorlinie und unterschieden sich in Expressionsstärke und -muster. In Founder A ist die Transgenexpression etwas schwächer als in Founder F. Außerdem ist sie auf den Vorhof beschränkt. Dagegen konnte in Founder F das transgene Protein auch im Ventrikel durch Western Blot nachgewiesen werden. In beiden Foundern war die Expressionskontrolle durch DOX funktional, d. h. die Transgenexpression war auf Proteinebene induzierbar und reversibel. In Tieren, die einfach transgen für die humane Kanaluntereinheit (Tre-IH-SND2) waren, wurde keine Expression beobachtet. Beides wurde ebenfalls im Western Blot gezeigt.

Die zelluläre Elektrophysiologie wurde ausschließlich in Tieren des Founders A durchgeführt. Durch die dominant-negativen Eigenschaften des Transgens war die Expression des weniger stark exprimierenden Founders ausreichend. Für die telemetrischen EKG-Untersuchungen der Tiere, die das Transgen während der Entwicklung exprimierten, wurden ebenfalls ausschließlich Tiere der Linie A verwendet. In den telemetrischen EKG-Messungen der DW Tiere wurden beide Founder untersucht. Da sich die Ergebnisse statistisch nicht voneinander unterscheiden, wurden die Daten in einer Gruppe zusammengefasst. Des Weiteren konnte ein durch den Integrationsort des Transgens hervorgerufener Effekt ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zu der HCN4-R669Q-*Knockin* Maus (Harzheim *et al.*, 2008), in der durch Aminosäureaustausch eine cAMP-insensitive HCN4 Untereinheit exprimiert wird, beeinflusst das in dieser Arbeit beschriebene Mausmodell alle HCN-Untereinheiten. Dadurch, dass

als Promotor nicht der endogene HCN4-Promotor fungiert, sondern ein α MHC-Promotor, der vornehmlich zu einer Expression in den Vorhöfen führt, werden nicht nur die HCN4-Untereinheiten, sondern auch die HCN2-Untereinheiten beeinflusst. Dies führt in den beiden Schrittmacherzentren, Sinus- und AV-Knoten, zu einer Insensitivität des kompletten I_f . Für das mHCN4-R669Q-Konstrukt wurden keine dominant-negativen Eigenschaften gezeigt. Da der homozygote HCN4-R669Q-*Knockin* während der Embryonalentwicklung letal ist, konnten nur heterozygote adulte Mäuse analysiert werden, die noch einen cAMP-sensitiven I_f besitzen. Des Weiteren wird die cAMP-insensitive HCN4-Untereinheit während der Entwicklung exprimiert, was zu kompensatorischen Veränderungen führen könnte. Im Gegensatz dazu ermöglicht der transgene Ansatz, eventuelle Kompensationen während der Entwicklung auszuschließen, da die Transgenexpression erst im adulten Tier induziert wurde. Außerdem fungierte jedes Tier als eigene Kontrolle, weil es mit DOX- und ohne DOX-Behandlung analysiert werden konnte.

Weshalb die in dieser Arbeit beschriebenen Tiere, die während der Embryonalentwicklung das Transgen exprimieren, lebensfähig sind, wohingegen die homozygoten HCN4-R669Q-*Knockin* Mäuse spätestens 12 Tage *p.c.* sterben, bleibt ungeklärt. Zum Zeitpunkt E11,5 hat sich das murine Herz vom tubulären Zustand in einen embryonalen Vierkammerstatus entwickelt (Moormann und Christoffels, 2003). α MHC wird bereits exprimiert, wobei das Expressionslevel im atrioventrikulären Kanal, Vorhof und Einflusstrakt stärker ist als im Ausflusstrakt und Ventrikel (Franco *et al.*, 1998). In diesem Entwicklungsstadium wird der primitive Sinusknoten gebildet und die HCN4-Expression, die zuvor noch im Einflusstrakt als auch im Sinushorn detektiert werden kann, auf den zentralen Sinusknoten lokalisiert. Interessanterweise entsteht diese Region aber nicht aus Zellen des Einflusstrakts, sondern aus benachbarten nichtkardialen Vorgängerzellen (Mommersteeg *et al.*, 2007). Es ist also möglich, dass die α MHC-Expression erst nach dem kritischen Zeitpunkt im Sinusknoten beginnt, nachdem sich die Zellen zu Myokard entwickelt haben. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass das Transgen durch Mosaizismus nicht in allen Sinusknotenzellen mit der gleichen Intensität exprimiert wird. Es wäre also möglich, dass die Aktivität einzelner Zellen ohne oder mit schwächerer I_f -Aktivität ausreicht, um die Schrittmachertätigkeit während der kritischen Phase in der Embryonalentwicklung zu gewährleisten und dadurch die Erregung des Herzens auszulösen.

6.2 Zellulärer Phänotyp bei cAMP-insensitivem I_f

Inwiefern sich die humane Mutation auf den zellulären Phänotyp des Sinusknotens auswirkt, konnte in der von Schulze-Bahr beschriebenen Patientin (Schulze-Bahr *et al.*,

2003) nicht untersucht werden. Das entwickelte Mausmodell war folglich von Bedeutung, um Rückschlüsse auf die Patientensituation zu ziehen und den zellulären Mechanismus zu verstehen. In den aus doppelt transgenen Mäusen isolierten Sinusknotenzellen konnte I_f gemessen werden, was darauf schließen lässt, dass die Mutante auch *in vivo* an die Zelloberfläche transportiert wird. Die I_f -Aktivierungskinetik unterscheidet sich jedoch in den Kontroll- und Mutantenzellen. Die Kanäle öffnen in den transgenen Zellen deutlich langsamer und brauchen länger, um die maximale Leitfähigkeit zu erreichen. Wird der Strom in Kontrollzellen bei einem gegebenen Potenzial vor und nach β -adrenerger Stimulation gemessen, so verändert sich die Amplitude deutlich. In Mutantenzellen führt die Anwesenheit von HA-hHCN4-SND dazu, dass die Zugabe von ISO keinen Effekt mehr auf die Zellen hat. Der komplette I_f ist folglich insensitive für β -adrenerge Stimulation, was darauf schließen lässt, dass die Mutante auch *in vivo* einen dominant-negativen Effekt auf die endogenen Wildtyp-Kanaluntereinheiten hat. Andernfalls wäre eher ein intermediärer Zustand zu erwarten, wie er für die humane Mutation hHCN4-S672R beschrieben wurde (Milanesi *et al.*, 2006).

Interessanterweise lässt sich in Tyrode-Lösung trotz langsamer Aktivierungskinetiken kein Unterschied in den Stromdichten am Ende des 3-s-Pulses in Kontroll- und Mutantensinusknotenzellen messen. Wahrscheinlich führt die Überexpression von HA-hHCN4-SND dazu, dass sich die relativen Stromdichten nicht unterscheiden. Außerdem fehlt der exprimierten Mutante ein C-terminal gelegenes Internalisierungssignal (Hardel *et al.*, 2007), was dazu führen könnte, dass sie in der Zellmembran angereichert wird. Erst nach Stimulation mit ISO ist ein deutlicher Unterschied in den Stromdichten vorhanden: Während die Mutantenzellen nicht reagieren und sich die Werte bei den physiologisch relevanten Potenzialen nicht von denen unter Kontrollbedingungen unterscheiden, nimmt die Stromdichte in den Kontrollzellen signifikant zu.

Die spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit der HCN-Kanäle verschiebt sich in den Kontrollzellen nach Applikation von ISO signifikant zu positiveren Werten. Die halbmaximale Aktivierung des I_f liegt bei -101 ± 3 mV vor und bei -92 ± 2 mV nach β -adrenerger Stimulation. Ein vergleichbarer Effekt wurde in Sinusknotenzellen aus Kaninchen gemessen, in denen eine Stimulation mit $1 \mu\text{M}$ ISO eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit um $+7,8$ mV auslöst (DiFrancesco und Tatora, 1991). Dass eine Stimulation mit ISO in der Ganzzellkonfiguration einen geringeren Effekt hat als eine direkte Stimulation mit cAMP, ist wahrscheinlich auf einen basalen, zytoplasmatischen cAMP-Spiegel zurückzuführen (DiFrancesco und Mangoni, 1994). Allem Anschein nach ist in der Zelle eine basale Aktivität der Adenylatzyklase vorhanden, da bei muskarinischer Stimulation ein inhibitorischer Effekt auf I_f beobachtet wurde (DiFrancesco und Tromba, 1988). Dadurch verschiebt sich die halbmaximale Aktivierung um -20 mV. Interessanterweise

liegt die Spannung der halbmaximalen Aktivierung der Mutantenzellen bei -121 ± 3 mV, also in dem Bereich, der in Kontrollzellen nur in einem cAMP-freien Milieu erreicht wird. Eine Stimulation mit ISO hat keinen signifikanten Effekt auf die Offenwahrscheinlichkeit. Die Expression der cAMP-insensitiven Mutante führte dazu, dass die Zelle so reagiert, als wäre sie unter muskarinischer Stimulation. Der Aktivierungsbereich des I_f ist folglich in einem Spannungsbereich eingefroren, der negativer als das diastolische Membranpotenzial liegt. Letztendlich bedeutet das, dass der Kanal unter physiologischen Bedingungen der Sinusknotenzelle nicht funktional ist. Dieser Befund passt auch zu der Tatsache, dass Ivabradin in doppelt transgenen Mäusen keinen Effekt auf die Herzfrequenz hat und dass sich die homozygoten cAMP-insensitiven HCN4-R669Q-*Knockin* Mäuse phänotypisch nicht von den HCN4-*Knockout* Mäusen unterscheiden (Stieber *et al.*, 2003).

Des Weiteren war die rhythmische Aktivität der Mutantenschrittmacherzellen beeinträchtigt. Unter Kontrollbedingungen konnten zum Teil nur unterschwellige Oszillationen gemessen werden, die von unregelmäßig auftretenden Aktionspotenzialen unterbrochen wurden. Das diastolische Membranpotenzial war sowohl in Sinusknoten- als auch AV-Knotenzellen zu depolarisierten Werten verschoben. Bis jetzt gibt es noch keine eindeutige Erklärung, wodurch dieser Effekt zustande kam. Eventuell sind kompensatorische Mechanismen dafür verantwortlich, die zur Fehlregulation anderer Ionenkanäle führen. Durch Stimulation mit ISO ließ sich zwar eine Rhythmizität in den Zellen hervorrufen, deren Frequenz war aber im Vergleich zu den Kontrollzellen geringer und konnte auch durch maximale Stimulation nicht weiter angehoben werden. Wahrscheinlich ist das Einsetzen der Aktivität auch nicht auf die HCN-Kanäle, sondern auf Modulation anderer Ströme zurückzuführen, die ebenfalls sensibel für β -adrenerge Stimulation sind: $I_{Ca,L}$ (Zaza *et al.*, 1996), TTX unempfindlicher I_{Na} (Li *et al.*, 1993) oder Ryanodinrezeptor vermittelte Calcium-Freisetzung (Li *et al.*, 1993; Zaza *et al.*, 1996; Rigg *et al.*, 2000; Vinogradova *et al.*, 2002), die wiederum I_{NCX} verstärkt (Vinogradova *et al.*, 2002; Rigg *et al.*, 2000). Im Einklang mit diesen Daten stand auch das Schlagverhalten der transgenen Schrittmacherzellen. Während die Kontrollzellen regelmäßig kontrahierten und die Frequenz dosisabhängig durch ISO erhöht wurde, gab es Schrittmacherzellen aus doppelt transgenen Tieren, die entweder gar nicht oder langsamer kontrahierten. Zwar konnten einige Zellen durch β -adrenerge Stimulation aktiviert werden, die Kontraktionsfrequenz der Kontrollzellen wurde jedoch nie erreicht. Ein Vergleich der Frequenzen der Kontroll- mit den Mutantenzellen zeigte fast eine Parallelverschiebung der Werte um ungefähr 85 min^{-1} . Interessanterweise spiegelte der zelluläre Phänotyp den im EKG gemessenen humanen (Schulze-Bahr *et al.*, 2003) und den *in vivo* Phänotyp des Mausmodells wider.

6.3 *In vivo* Elektrophysiologie

Die telemetrischen EKG-Messungen wurden so analysiert, dass sie annähernd mit den Patientendaten des Belastungs-EKGs verglichen werden konnten. Das EKG wurde über einen Zeitraum von drei Tagen aufgezeichnet und anschließend die Herzfrequenz aktivitätsabhängig analysiert. Wie erwartet nahm die Herzfrequenz mit steigender Aktivität des Tieres zu. Der Vorteil dieser Analyse war, dass Effekte ausgeschlossen werden konnten, die zum Beispiel durch Anfassen der Mäuse ausgelöst werden. Die β -adrenerge Stimulation wurde ausschließlich durch körperliche Anstrengung hervorgerufen.

Um kompensatorische Mechanismen während der Entwicklung auszuschließen, wurden zunächst doppelt transgene Tiere analysiert, die bereits *in utero* mit DOX behandelt worden waren. Zwischen den doppelt transgenen Tieren und Kontrolltieren mit DOX-Behandlung wurde kein Unterschied in der Herzfrequenz festgestellt. Durch das Beenden der pharmakologischen Behandlung wurde die Transgenexpression in denselben Tieren induziert, was zur Folge hatte, dass sich die Herzfrequenz in den doppelt transgenen Tieren veränderte. Wie für die Sinusknotenzellen beobachtet gab es nahezu eine Parallelverschiebung der Werte nach unten. Welcher Founder untersucht wurde, spielte dabei keine Rolle. Dadurch konnte ein Effekt durch den Transgenintegrationsort ausgeschlossen werden. Interessanterweise ist die Verringerung der Herzfrequenz durch das Transgen vergleichbar mit dem Effekt, der bei Ivabradin-Behandlung in Mäusen beobachtet wird. Mit Ivabradin wurde eine Verringerung der Herzfrequenz um 20 % gemessen (Leoni *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2004). Die absolute Regulation durch β -adrenerge Stimulation bleibt zwar erhalten, der Bereich ist jedoch zu niedrigeren Herzfrequenzen verschoben. Dies zeigt deutlich, dass weitere Schrittmachermechanismen neben dem I_f in den Prozess der Herzfrequenzerhöhung nach β -adrenerger Stimulation involviert sein müssen. Zu nennen wären hier unter anderem $I_{Ca,L}$, I_{Na} , I_{st} , I_{NCX} und Ryanodinrezeptor vermittelte Calcium-Freisetzung (Li *et al.*, 1993; Zaza *et al.*, 1996; Rigg *et al.*, 2000; Vinogradova *et al.*, 2002). Deutlich wird dies auch unter pharmakologischer Blockade des autonomen Nervensystems. Unterbindet man jegliche Modulation durch muskarinische und β -adrenerge Rezeptoren, führt das zu einer Verlangsamung der mittleren Herzfrequenzen und der Unterschied in der absoluten Herzfrequenz zwischen den Kontrollen und Mutanten verschwindet. Des Weiteren verkleinert sich in beiden Gruppen deutlich die Bandbreite gemessenen Herzfrequenzen und die Regulierbarkeit durch das autonome Nervensystem verschwindet.

Im Gegensatz zu den anderen Mausmodellen, in denen der *Knockout* von HCN2 zu Sinusknotendysrhythmien (Ludwig *et al.*, 2003) und der induzierte *Knockout* von HCN4 bzw. der HCN4-R669Q-*Knockin* zu Sinuspausen führt (Herrmann *et al.*, 2007; Harzheim *et al.*, 2008), wurden in doppelt transgenen Mäusen, in denen die Transgenexpression

im adulten Tier induziert wurde, keine Arrhythmien detektiert. In der EKG-Analyse traten keine Unterschiede in der Dauer des PQ-Intervalls, QRS-Komplexes oder der korrigierten QT-Zeit (QT_c) auf. Die Erregungsausbreitung über die Vorhöfe und den AV-Knoten in die Ventrikel verlief in der gleichen Zeit wie in den Kontrolltieren. Ausschließlich der initiale Auslöser durch den Sinusknoten war verzögert. Folglich hat die dominant-negative cAMP-insensitive HCN4-Untereinheit den gleichen Effekt wie eine pharmakologische Behandlung mit Ivabradin: Die Herzfrequenz wird verringert, aber die Kontraktion und die ventrikuläre Arbeitsleistung bleiben unverändert (Du *et al.*, 2004; Thollon *et al.*, 1997).

Die Herzfrequenz der Mutanten, die das Transgen bereits während der Entwicklung exprimieren, ist im Vergleich zu den Kontrolltieren bei fast allen Aktivitäten signifikant verringert. Jedoch ist die Reduktion nicht so stark ausgeprägt wie in den Mutanten, in denen die Transgenexpression erst im adulten Alter induziert wurde. Die DOX-Behandlung der Tiere und die daraus resultierende Unterdrückung der Transgenexpression führt dazu, dass sich die Herzfrequenz der Mutanten an die der Kontrolltiere mit DOX bei hohen Aktivitäten angleicht. Interessanterweise bewirkt die DOX-Behandlung, dass die Herzrate in Ruhe und bei geringeren Aktivitäten noch weiter absinkt. In den Histogrammen wurde deutlich, dass sich das jeweilige Maximum bei niedriger und hoher Aktivität in den Mutanten nach DOX-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollen nach außen verschiebt; d. h. in Ruhe haben die Tiere eine Tendenz zu niedrigeren Herzfrequenzen und bei Aktivität zu höheren Herzfrequenzen. Dass die Herzen plötzlich schneller schlagen, liegt wahrscheinlich daran, dass durch die unterdrückte Transgenexpression die cAMP-Regulation der endogenen Kanäle wieder möglich ist. Warum der Phänotyp aber bei niedrigen Frequenzen beobachtet wird, kann nicht bis ins Detail erklärt werden. Aus einer Langzeitstudie ist bekannt, dass es im Sinusknoten von Mäusen, in denen durch Verabreichung von Ivabradin eine dauerhafte Bradykardie hervorgerufen wurde, zu einer Veränderung der Transkription verschiedener Ionenkanäle kommt. Zum Beispiel werden die Transkripte von HCN4 und Kir3.1 um 52 % bzw. 41 % hochreguliert (Leoni *et al.*, 2005). Unter der Annahme, dass das HCN4-Protein mit dem cAMP-insensitiven Transgen heteromerisiert, hätte diese Regulation keinen Effekt. Im Gegensatz dazu würde die verstärkte Expression einer der Untereinheiten, die für $I_{K(ACh)}$ verantwortlich sind, gerade unter muskarinischer Stimulation zu einer verringerten Herzfrequenz führen, was die vorliegenden Daten erklären könnte. Interessanterweise führt eine langanhaltende Bradykardie auch zu einer Erniedrigung der für den spannungsgesteuerten Calciumkanal des T-Typs ($Ca_v3.1$) kodierenden mRNA um 29%. Der für ein *Knockout* Mausmodell, das $Ca_v3.1$ nicht mehr exprimiert, beschriebene kardiale Phänotyp (Mangoni *et al.*, 2006) ähnelt dem Phänotyp des in dieser Arbeit beschriebenen Modells. Die Herzfrequenz ist ebenfalls reduziert und die AV-Weiterleitung verlangsamt, was sich in einer Verlängerung des PQ-Intervalls in den Knockout-Tieren

bemerkbar machte. Auf zellulärer Ebene war die rhythmische Schrittmacheraktivität in isolierten Sinusknotenzellen und die diastolische Depolarisation der Aktionspotenziale verlangsamt. Da beide Einwärtsströme zur diastolischen Depolarisation der Zelle beitragen, wäre es nicht verwunderlich, dass das Entfernen einer der beiden Komponenten zu einem ähnlichen Phänotyp führen würde. Da dieser Phänotyp aber in den Tieren, die die cAMP-insensitive Kanaluntereinheit erst im Erwachsenenalter exprimieren, nicht beobachtet wurde, ist es wahrscheinlich, dass es in beiden Modellen zu einer Adaption während der Entwicklung durch veränderte Kanalexpression im Sinusknoten oder im ganzen Herzen kommt. Der beobachtete Phänotyp wäre folglich nur ein sekundärer Effekt der veränderten Genexpression und könnte nicht auf das eigentliche Transgen bzw. den *Knockout* zurückgeführt werden. Um dies genauer zu untersuchen, könnte unter anderem der *Knockout* des Calciumkanals erst im Erwachsenenalter der Maus induziert werden. Träte der Phänotyp erneut auf, wäre dies ein Hinweis dafür, dass die Überleitungsstörungen durch den fehlenden T-Typ-Kanal vermittelten Calciumeinstrom hervorgerufen werden. Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt in ventrikulären Myozyten zur Aktivierung des Ryanodinrezeptors und zur Ausschüttung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (Venetucci *et al.*, 2008, Lehnart *et al.*, 2004). Diese Calcium induzierte Calcium-Freisetzung ist für die Sinusknoten- und Vorhofzellen ebenfalls wahrscheinlich und ein fehlender T-Typ Calciumeinstrom würde die Auslösung des Aktionspotenzials verlangsamen und folglich die Erregungsausbreitung über den Vorhof verlängern. Im Gegensatz dazu wäre ein Ausbleiben der Überleitungsstörungen ein Hinweis darauf, dass der Phänotyp auf eine Adaption zurückzuführen ist.

6.4 Ventrikuläre Funktion

In Mausmodellen mit chronischer Bradykardie wurde häufig auch eine Hypertrophie beschrieben (Zhai *et al.*, 2005; Fabritz *et al.*, 2004; Sah *et al.*, 1999). Für die Interpretation der in dieser Arbeit erhobenen Daten war es wichtig zu untersuchen, ob es durch die Transgenexpression und die chronische Bradykardie zu Veränderungen der linksventrikulären Arbeitsleistung oder der Anatomie der Maus Herzen kam. Dafür wurden sowohl Mutanten, die das Transgen immer exprimierten, und Mutanten, in denen die Transgenexpression erst im Erwachsenenalter induziert wurde, echokardiografisch untersucht. Im Vergleich zu den Kontrollen hatte keine der beiden Mutantengruppen Einschränkungen in der Kontraktilität des linken Ventrikels. Auch anatomisch unterschieden sich die Mutanten nicht von den Kontrollen: Weder das linksventrikuläre Volumen noch die auf das Körpergewicht normalisierte linksventrikuläre Masse waren signifikant verändert. Die nach dem Ultraschall gravimetrisch ermittelten und normalisierten Massen der Ventrikel und Vorhöfe ließen

ebenfalls auf eine unveränderte Anatomie des Herzens schließen. Diese Daten zeigen, dass die in den Tieren gemessene Bradykardie und der zelluläre Phänotyp primär auf die Expression der cAMP-insensitiven HCN4-Untereinheit zurückzuführen ist. Ein durch krankhaftes Myokard verursachter Nebeneffekt konnte ausgeschlossen werden.

Eine akute Verringerung der Herzfrequenz kann auf einige Formen von ischämischen Herzerkrankungen, wie zum Beispiel stabiler Angina pectoris, akuter Herzbeschwerden oder Herzversagen eine positive Auswirkung haben. Häufig werden dafür β -Blocker eingesetzt (Abraham *et al.*, 2008; O'Rourke, 2007; Bhatt und Stone, 2006). Von Nachteil sind allerdings die negativ inotropen Eigenschaften der Adrenozeptor-Antagonisten (Heusch, 2008). Im Gegensatz zu den β -Blockern wirkt Ivabradin lediglich negativ chronotrop und hat keine Auswirkungen auf die ventrikuläre Kontraktilität, sondern bewirkt ganz im Gegenteil sogar eine Erhöhung des Schlagvolumens, so dass letztendlich das Herzzeitvolumen unverändert bleibt (Berdeaux 2007, Mulder und Thuillez, 2006; Mulder *et al.*, 2004; Vilaine *et al.*, 2003; Simon *et al.*, 1995). Dies ist auf den Frank-Starling-Mechanismus zurückzuführen. Durch die langsame Herzfrequenz, werden die Vorhöfe mit einem größeren Volumen gefüllt. Man spricht von einer erhöhten Vorlast. Dadurch werden auch die Herzkammern mit einem größeren Volumen gefüllt. Dies führt zu einer stärkeren Dehnung der Muskelzellen und zu einer erhöhten Kontraktionskraft, so dass letztendlich das Schlagvolumen erhöht wird (Endoh, 2006). Unter der Annahme, dass die Expression der cAMP-insensitiven HCN4-Kanaluntereinheit einen ähnlichen Effekt wie Ivabradin hat, lassen sich folgende Effekte erklären: In den Mutanten, die mit DOX behandelt wurden, unterscheidet sich das Schlagvolumen nicht von den Kontrollen. Sobald die Tiere jedoch auf Wasser umgestellt werden und das Transgen exprimiert wird, gibt es einen Trend zu einem erhöhten Schlagvolumen in den Mutanten. Dadurch könnte bei verringerter Herzfrequenz die gleiche Blutmenge ausgeworfen werden. Gleichzeitig würde dies auch bedeuten, dass bei gleicher Frequenz in den Mutanten mehr Blutvolumen pro Herzschlag gepumpt werden müsste, was man in den Tieren auch beobachten konnte. Nach der Transgenexpression gab es in den Mutanten einen Trend zu einem erhöhten Herzzeitvolumen. Dies lässt sich auf ein erhöhtes Schlagvolumen zurückführen, da die Herzfrequenz in allen Tieren konstant bei etwa 500 min^{-1} gehalten wurde. Über die Gründe, warum das Schlag- und Herzzeitvolumen in den Mutanten, die das Transgen ein Leben lang exprimieren, nicht verändert ist, kann nur spekuliert werden. Die Möglichkeit, dass es durch die Expression des Transgens während der Embryonalentwicklung und postnatal zur Kompensation kommt, wurde bereits in 6.3 *In vivo Elektrophysiologie* diskutiert. Durchaus könnten diese Veränderungen auch dazu führen, dass das Schlagvolumen in den Mutanten unverändert ist, da die Bradykardie in den Tieren nicht so ausgeprägt ist wie in den Mutanten, in denen diese erst im Erwachsenenalter induziert wurde. Um diese Theorie zu überprüfen, könnten

die Mäuse von der Embryonalentwicklung an bis zum Messtag mit Ivabradin behandelt und überprüft werden, welche Auswirkungen die Substanz auf die Parameter Herzzeitvolumen und Schlagvolumen hat.

6.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Mausmodell etabliert, das herzspezifisch und induzierbar eine mutierte HCN4-Untereinheit exprimiert. Die gewählte Mutation führt in einer Patientin zur Sinusknotenfehlfunktion und zur chronotropen Inkompetenz. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte der pathophysiologische Mechanismus der humanen Mutation aufgeklärt werden. In freilaufenden Mäusen hat HA-hHCN4-SND eine Herzfrequenzverringern in Ruhe und bei Aktivität zur Folge. Die relative Frequenzanpassung durch das autonome Nervensystem bleibt jedoch unverändert. Unter physiologischen Bedingungen ist in Sinusknotenzellen adulter Mäuse eine cAMP-Modulation notwendig, um I_f zu aktivieren. Die aktivitätsbedingte Herzfrequenzregulation ist unabhängig von der cAMP-Modulation der HCN-Kanäle. Stattdessen scheint die Rolle von I_f vielmehr darin zu bestehen, die Frequenz unabhängig von der Aktivität auf ein bestimmtes Niveau anzuheben.

Dass es durch die Transgenexpression während der Embryonal- und Postnatalentwicklung zu Veränderungen der Transkription verschiedener Ionenkanäle kommt, könnte mit Hilfe einer Microarray-Analyse untersucht werden. Hierfür könnte die RNA aus Sinus- und AV-Knoten und aus Vorhof und Ventrikeln isoliert und die Ionenkanalexpression der doppelt transgenen Tiere und der Kontrolltiere verglichen werden. Unter der Annahme, dass in den doppelt transgenen Mäusen das Transkript für Kir3.1 erhöht ist, um die Bradykardie zu kompensieren, könnte man durch die Verpaarung mit einem Kir3.1-*Knockout* Mausmodell diese Regulation unterbinden. Würde anschließend der beobachtete Phänotyp der Überleitungsstörungen im EKG verschwinden, wären diese auf eine Fehlregulation des Kaliumkanals zurückzuführen.

7 Literaturverzeichnis

Abraham, W. T., Greenberg, B. H. und Yancy, C. W. (2008) Pharmacologic therapies across the continuum of left ventricular dysfunction. *Am. J. Cardiol.* **102**: 21G-28G.

Altomare, C., Bucchi, A., Camatini, E., Baruscotti, M., Viscomi, C., Moroni, A. und DiFrancesco, D. (2001) Integrated allosteric model of voltage gating of HCN channels. *J. Gen. Physiol.* **117**: 519-532.

Anselmi, C., Carloni, P. und Torre, V. (2007) Origin of functional diversity among tetrameric voltage-gated channels. *Proteins* **66**: 136-146.

Attwell, D. und Wilson, M. (1980) Behaviour of the rod network in the tiger salamander retina mediated by membrane properties of individual rods. *J. Physiol.* **309**: 287–315.

Bader, C. R., Bertrand, D. und Schwartz, E. A. (1982) Voltage-activated and calcium-activated currents studied in solitary rod inner segments from the salamander retina. *J. Physiol.* **331**: 253–284.

Bader, C. R., MacLeish, P. R. und Schwartz, E. A. (1979) A voltage-clamp study of the light response in solitary rods of the tiger salamander. *J. Physiol.* **296**: 1–26.

Barbuti, A., Baruscotti, M. und DiFrancesco, D. (2007) The pacemaker current: from basics to the clinics. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, **18**: 342-347.

Bell, A. C. und Felsenfeld, G. (2000) Methylation of a CTCF-dependent boundary controls

imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature*. **405**: 482-485.

Berdeaux, A. (2007) Preclinical results with I(f) current inhibition by ivabradine. *Drugs*. **67** Suppl 2: 25-33.

Berul, C. I. (2003) Electrophysiological phenotyping in genetically engineered mice. *Physiol. Genomics* **13**: 207-216.

Bhatt, A. B. und Stone, P. H. (2006) Current strategies for the prevention of angina in patients with stable coronary artery disease. *Curr. Opin. Cardiol.* **21**: 492-502.

Biel, M., Ludwig, A., Zong, X. und Hofmann, F. (1999) Hyperpolarization-activated cation channels: a multi-gene family. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **136**:165-181.

Biel, M., Schneider, A. und Wahl, C. (2002) Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc. Med.* **12**: 206-12.

Borer, J. S., Fox, K., Jaillon, P. und Lerebours, G. (2003) Antianginal and antiischemic effects of Ivabradine, an I(f) inhibitor, in stable angina: a randomized double-blind, multicentered, placebo-controlled trial. *Circulation* **107**: 817-823.

Brown, H. F., DiFrancesco, D. und Noble, S. J. (1979) How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* **280** :235-236.

Bucchi, A., Tognati, A., Milanesi, R., Baruscotti, M. und DiFrancesco D. (2006) Properties of ivabradine-induced block of HCN1 and HCN4 pacemaker channels. *J. Physiol.* **572**: 335-346.

Büter, I. (2006) Spezifisch bradykarde Substanzen: eine Alternative in der Behandlung der koronaren Herzkrankheit? Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Decher, N., Chen, J. und Sanguinetti, M. C. (2004) Voltage-dependent gating of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated pacemaker channels: molecular

coupling between the S4-S5 and C-linkers. *J. Biol. Chem.* **279**: 13859-13865.

DiFrancesco D. (1981a) A new interpretation of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J. Physiol.* **314**: 359-376.

DiFrancesco, D. (1981b) A study of the ionic nature of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J. Physiol.* **314**: 377-393.

DiFrancesco, D. (2006) Serious workings of the funny current. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **90**: 13-25.

DiFrancesco, D. (2006) Funny channels in the control of cardiac rhythm and mode of action of selective blockers. *Pharmacol. Res.* **53**: 399-406.

DiFrancesco, D. und Camm, J. A. (2004) Heart rate lowering by specific and selective I_f current inhibition with ivabradine: a new therapeutic perspective in cardiovascular disease. *Drugs.* **64**: 1757-1765.

DiFrancesco, D. und Mangoni, M. E. (1994) Modulation of single hyperpolarization-activated channels (I_f) by cAMP in the rabbit sino-atrial node. *J. Physiol.*, **473**: 473-482.

DiFrancesco, D. und Tortora, P. (1991) Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature*, **351**: 145-147.

DiFrancesco, D. und Tromba, C. (1988) Muscarinic control of the hyperpolarization-activated current I_f in rabbit sino-atrial node myocytes. *J. Physiol.* **405**: 493-510.

Du, X. J., Feng, X., Gao, X. M., Tan, T. P., Kiriazis, H. und Dart, A. M. (2004) I_f channel inhibitor Ivabradin lowers heart rate in mice with enhanced sympathoadrenergic activities. *Br. J. Pharmacol.* **142**: 107-112.

Endoh, M. (2006) Signal transduction and Ca²⁺ signaling in intact myocardium. *J. Pharmacol. Sci.* **100**: 525-37.

Fabritz, L., Kirchhof, P., Fortmüller, L., Auchampach, J. A., Baba, H. A., Breithardt, G., Neumann, J., Boknik, P. und Schmitz, W. (2004) Gene dose-dependent atrial arrhythmias, heart block, and brady-cardiomyopathy in mice overexpressing A₃ adenosine receptors. *Cardiovasc. Res.* **62**: 500– 508.

Franco, D., Lamers, W. H. und Moormann A. F. M. (1998) Patterns of expression in the developing myocardium: towards a morphologically integrated transcriptional model. *Cardiovasc. Res.*, **38**: 25-53.

Gauss, R., Seifert, R. und Kaupp, U. B. (1998) Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature.* **393**: 583-587.

Gossen, M. und Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5547-5551.

Guo, J., Mitsuiye, T. und Noma, A. (1997) The sustained inward current in sino-atrial node cells of guinea-pig heart. *Pflügers Arch.* **433**:390 –396.

Halliwel, J. V. und Adams, P. R. (1982) Voltageclamp analysis of muscarine excitation in hippocampal neurons. *Brain Res.* **250**: 71–92

Hardel, N., Harmel, N., Zolles, G., Fakler, B. und Klöcker, N. (2007) Recycling endosomes supply cardiac pacemaker channels for regulated surface expression. *Cardiovasc. Res.* **79**: 52–60.

Harzheim, D., Pfeiffer, K. H., Fabritz, L., Kremmer, E., Buch, T., Waisman, A., Kirchhof, P., Kaupp, U. B., und Seifert, R. (2008) Cardiac pacemaker function of HCN4 channels in mice is confined to embryonic development and requires cyclic AMP. *EMBO J.*, **27**: 692-703.

Herrmann, S., Stieber, J., Stöckl, G., Hofmann, F. und Ludwig A. (2007) HCN4 provides a 'depolarization reserve' and is not required for heart rate acceleration in mice. *EMBO J.* **26**:4423-4432.

- Heusch, G.** (2008) Heart rate in the pathophysiology of coronary blood flow and myocardial ischaemia: benefit from selective bradycardic agents. *Br. J. Pharmacol.* **153**: 1589-1601.
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23-28.
- Ishii, T. M., Takano, M., Xie, L. H., Noma, A. und Ohmori, H.** (1999) Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J. Biol. Chem.* **274**:12835-12839.
- Kaffer, C. R., Srivastava, M., Park, K. Y., Ives, E., Hsieh, S., Battle, J., Grinberg, A., Huang, S. P. und Pfeifer, K.** (2001) A transcriptional insulator at the imprinted H19/Igf2 locus. *Genes Dev.* **14**: 1908-1919.
- Kaupp, U. B. und Seifert, R.** (2001) Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu. Rev. Physiol.* **63**: 235-257.
- Kodama, I., Honjo, H. und Boyett, M. R.** (2002) Are we lost in the labyrinth of the sinoatrial node pacemaker mechanism? *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **13**: 1303-1305.
- Kramer, K., Voss, H.-P., Grimbergen, J. A. und Bast, A.** (1998) Circadian rhythms of heart rate, body temperature, and locomotor activity in freely moving mice measured with radio-telemetry. *Lab Animal* **27**: 23-26.
- Krestel, H. E., Mayford, M., Seeburg, P. H., und Sprengel, R.** (2001) A GFP-equipped bidirectional expression module well suited for monitoring tetracycline-regulated gene expression in mouse. *Nucleic Acids Res.* **2**, E39.
- Lehnart, S. E., Wehrens, X. H., Kushnir, A und Marks, A.R.** (2004) Cardiac ryanodine receptor function and regulation in heart disease. *Ann N Y Acad Sci.* **1015**, 144-159.
- Lei, M., Jones, S. A., Liu, J., Lancaster, M. K., Fung, S. S., Dobrzynski, H., Camelliti, P., Maier, S. K., Noble, D. und Boyett, M. R.** (2004) Requirement of neuronal- and cardiac-type sodium channels for murine sinoatrial node pacemaking. *J. Physiol.* **559**: 835-48.

Leoni, A. L., Marionneau, C., Demolombe, S., Le Bouter, S., Mangoni, M. E., Escande, D. und Charpentier, F. (2005) Chronic heart rate reduction remodels ion channel transcripts in the mouse sinoatrial node but not in the ventricle. *Physiol. Genomics*. **24**: 4-12.

Li, M., West, J. W., Numann, R., Murphy, B. J., Scheuer, T. und Catterall, W. A. (1993) Convergent regulation of sodium channels by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *Science* **261**: 1439-1442.

Liman, E. R., Tytgat, J. und Hess, P. (1992) Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* **5**: 861-871.

Lipsius, S. L. und Bers, D. M. (2003) Cardiac pacemaking: I(f) vs. Ca²⁺, is it really that simple? *J. Mol. Cell Cardiol.* **35**: 891-893.

Liu, J., Dobrzynski, H., Yanni, J., Boyett, M. R. und Lei, M. (2007) Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels. *Cardiovasc. Res.* **73**: 729-38.

López-Bescós, L., Filipova, S. und Martos, R. (2007) Long-term safety and efficacy of ivabradine in patients with chronic stable angina. *Cardiology*. **108**: 387-396.

Ludwig, A., Budde, T., Stieber, J., Moosmang, S., Wahl, C., Holthoff, K., Langebartels, A., Wotjak, C., Munsch, T., Zong, X., Feil, S., Feil, R., Lancel, M., Chien, K. R., Konnerth, A., Pape, H. C., Biel, M. und Hofmann, F. (2003) Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *EMBO J.* **22**: 216-24.

Ludwig, A., Zong, X., Hofmann, F. und Biel, M. (1999a) Structure and function of cardiac pacemaker channels. *Cell Physiol. Biochem.* **9**: 179-186.

Ludwig, A., Zong, X., Jeglitsch, M., Hofmann, F. und Biel, M. (1998) A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature*. **393**: 587-591.

Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M. (1999b) Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J.* **18**: 2323-

2329.

Maccaferri, G., Mangoni, M., Lazzari, A. und DiFrancesco, D. (1993) Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J. Neurophysiol.* **69**: 2129–2136.

Maltsev, V. A. und Lakatta, E. G. (2008) Dynamic interactions of an intracellular Ca²⁺ clock and membrane ion channel clock underlie robust initiation and regulation of cardiac pacemaker function. *Cardiovasc. Res.* **77**, 274-284.

Mangoni, M. E. und Nargeot, J. (2008) Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol. Rev.*, **88**, 919-982.

Mangoni, M. E., Traboulsie, A., Leoni, A. L., Couette, B., Marger, L., Quang, K. L., 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 CaV3.1/1G T-Type Calcium Channels. *Circ. Res.* **98**:1422-1430.

Männikkö, R., Elinder, F. und Larsson, H. P. (2002) Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages. *Nature* **419**: 837-841.

Marionneau, C., Couette, B., Liu, J., Li, H., Mangoni, M. E., Nargeot, J., Lei, M., Escande, D. und Demolombe, S. (2005) Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J. Physiol.* **562**: 223–234.

Matsui, Y., Zsebo, K. M., Hogan, B. L. M. (1990) Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the Sl locus and the ligand for c-kit. *Nature*, **347**, 667-669.

Milanesi, R., Baruscotti, M., Gnecci-Ruscone, T., DiFrancesco, D. (2006) Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. *N. Engl. J. Med.* **354**: 151-157.

Mitchell, G. F., Jeron, A. und Koren, G. (1998) Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am. J. Physiol.* **274**: H747-751.

Mommersteeg, M. T. M., Hoogaars, W. M. H., Prall, O. W. J., de Gier-de Vries, C., Wiese, C., Cout, D. E. W., Papaioannou, V. E., Brown, N. A., Harvey, R. P., Moorman, A. F. M., Christoffels, V. M. (2007) Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circ. Res.* **100**: 354-362.

Moormann, A. F. M. und Christoffels, V. M. (2003) Cardiac chamber formation: Development, genes, and evolution. *Physiol. Rev.* **83**: 1223-1267.

Moosmang, S., Stieber, J., Zong, X., Biel, M., Hofmann, F. und Ludwig, A. (2001) Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur. J. Biochem.* **268**: 1646-1652.

Moroni, A., Gorza, L., Beltrame, M., Gravante, B., Vaccari, T., Bianchi, M. E., Altomare, C., Longhi, R., Heurteaux, C., Vitadello, M., Malgaroli, A. und DiFrancesco, D. (2001) Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current I(f). *J. Biol. Chem.* **276**: 29233-29241.

Much, B., Wahl-Schott, C., Zong, X., Schneider, A., Baumann, L., Moosmang, S., Ludwig, A. und Biel, M. (2003) Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J. Biol. Chem.* **278**: 43781-43786.

Mulder, P., Barbier, S., Chagraoui, A., Richard, V., Henry, J. P., Lallemand, F., Renet, S., Lerebours, G., Mahlberg-Gaudin, F. und Thuillez, C. (2004) Long-term heart rate reduction induced by the selective I(f) current inhibitor ivabradine improves left ventricular function and intrinsic myocardial structure in congestive heart failure. *Circulation* **109**: 1674-1679.

Mulder, P. und Thuillez, C. (2006) Heart rate slowing for myocardial dysfunction/heart failure. *Adv. Cardiol.* **43**: 97-105.

Nof, E., Luria, D., Brass, D., Marek, D., Lahat, H., Reznik-Wolf, H., Pras, E., Dascal, N., Eldar, M. und 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**: 463-470.

O'Rourke, S. T. (2007) Antianginal Actions of Beta-Adrenoceptor Antagonists. *Am. J. Pharm. Educ.* **71**: Article 95.

Pape, H. C. (1996) Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu. Rev. Physiol.* **58**: 299-327.

Ragueneau, I., Laveille, C., Jochemsen, R., Resplandy, G., Funck-Brentano, C. und Jaillon, P. (1998) Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the effects of ivabradine, a direct sinus node inhibitor, on heart rate in healthy volunteers. *Clin. Pharmacol. Ther.* **64**: 192-203.

Rigg, L., Heath, B. M., Cui, Y. und Terrar, D. A. (2000) Localisation and functional significance of ryanodine receptors during beta-adrenoceptor stimulation in the guinea-pig sino-atrial node. *Cardiovasc. Res.* **48**: 254-264.

Ruzylo, W., Tendera, M., Ford, I. und Fox, K. M. (2007) Antianginal efficacy and safety of ivabradine compared with amlodipine in patients with stable effort angina pectoris: a 3-month randomised, double-blind, multicentre, noninferiority trial. *Drugs.* **67**: 393-405.

Sah, V. P., Minamisawa, S., Tam, S. P., Wu, T. H., Dorn, G. W., Ross, J. Jr., Chien, K. R. und Brown, J. H. (1999) Cardiac-specific overexpression of RhoA results in sinus and atrioventricular nodal dysfunction and contractile failure. *J. Clin. Invest.* **103**:1627-1634.

Sambrook, J. und Russel, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3. Auflage, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Santoro, B., Chen, S., Luthi, A., Pavlidis, P., Shumyatsky, G. P., Tibbs, G. R. und Siegelbaum, S. A. (2000) Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J. Neurosci.* **20**: 5264-5275.

Santoro, B., Grant, S. G., Bartsch, D. und Kandel, E. R. (1997) Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to

eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**: 14815-14820.

Santoro, B. und Tibbs, G. R. (1999) The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **868**: 741-64.

Schulze-Bahr, E., Neu, A., Friederich, P., Kaupp, U. B., Breithardt, G., Pongs, O. und Isbrandt, D. (2003) Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J. Clin. Invest.* **111**: 1537-1545.

Seifert, R., Scholten, A., Gauss, R., Mincheva, A., Lichter, P. und Kaupp, U. B. (1999) Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**: 9391-9396.

Shi, W., Wymore, R., Yu, H., Wu, J., Wymore, R. T., Pan, Z., Robinson, R. B., Dixon, J. E., McKinnon, D. und Cohen, I. S. (1999) Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ. Res.* **85**: e1-6.

Simon, L., Ghaleh, B., Puybasset, L., Giudicelli, J. F. und Berdeaux A. (1995) Coronary and hemodynamic effects of S 16257, a new bradycardic agent, in resting and exercising conscious dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275**: 659-666.

Stieber, J., Herrmann, S., Feil, S., Löster, J., Feil, R., Biel, M., Hofmann, F. und Ludwig, A. (2003) The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**: 15235-15240.

Stieber, J., Stöckl, G., Herrmann, S., Hassfurth, B. und Hofmann, F. (2005) Functional expression of the human HCN3 channel. *J. Biol. Chem.* **280**: 34635-34643.

Stillitano, F., Lonardo, G., Zicha, S., Varro, A., Cerbai, E., Mugelli, A. und Nattel, S. (2008) Molecular basis of funny current (I_f) in normal and failing human heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* **45**: 289-299.

Tardif, J.C., Ford, I., Tendera, M., Bourassa, M. G. und Fox, K. (2005) Efficacy of ivabradine, a new selective I(f) inhibitor, compared with atenolol in patients with chronic stable angina. *Eur. Heart J.* **26**: 2529-2536.

Thollon, C., Bedut, S., Villeneuve, N., Cogé, F., Piffard, L., Guillaumin, J. P., Brunel-Jacquemin, C., Chomarot, P., Boutin, J. A., Peglion, J. L. und Vilaine, J. P. (2007) Use-dependent inhibition of hHCN4 by ivabradine and relationship with reduction in pacemaker activity. *Br J Pharmacol.* **150**: 37-46.

Thollon, C., Bidouard, J. P., Cambarrat, C., Lesage, L., Reure, H., Delescluse, I., Vian, J., Peglion, J. L. und Vilaine, J. P. (1997) Stereospecific in vitro and in vivo effects of the new sinus node inhibitor (+)-S 16257. *Eur. J. Pharmacol.* **339**: 43-51.

Ueda, K., Nakamura, K., Hayashi, T., Inagaki, N., Takahashi, M., Arimura, T., Morita, H., Higashieuesato, Y., Hirano, Y., Yasunami, M., Takishita, S., Yamashina, A., Ohe, T., Sunamori, M., Hiraoka, M., Kimura, A. (2004) Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia. *J. Biol. Chem.* **279**: 27194-27198.

Vemana, S., Pandey, S. und Larsson, H. P. (2004) S4 movement in a mammalian HCN channel. *J. Gen. Physiol.* **123**: 21-32.

Venetucci, L. A., Trafford, A. W., O'Neill, S. C. und Eisner, D. A. (2008) The sarcoplasmic reticulum and arrhythmogenic calcium release. *Cardiovasc. Res.* **77**: 285-292.

Verkerk, A. O., Wilders, R., van Borren, M. M., Peters, R. J., Broekhuis, E., Lam, K., Coronel, R., de Bakker, J. M. und Tan, H. L. (2007) Pacemaker current (I(f)) in the human sinoatrial node. *Eur. Heart J.* **28**: 2472-2478.

Vilaine, J. P., Bidouard, J. P., Lesage, L., Reure, H. und Péglion, J. L. (2003) Anti-ischemic effects of ivabradine, a selective heart rate-reducing agent, in exercise-induced myocardial ischemia in pigs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **42**: 688-696.

Vinogradova, T. M., Bogdanov, K. Y. und Lakatta, E. G. (2002) beta-adrenergic stimulation modulates ryanodine receptor Ca²⁺ release during diastolic depolarization to accelerate

pacemaker activity in rabbit sinoatrial nodal cells. *Circ. Res.* **90**: 73-79.

Vinogradova, T. M., Lyashkov, A. E., Zhu, W., Ruknudin, A.M., Sirenko, S., Yang, D., Deo, S., Barlow, M., Johnson, S., Caffrey, J. L., Zhou, Y. Y., Xiao, R. P., Cheng, H., Stern, M. D., Maltsev, V. A. und Lakatta, E. G. (2006) High basal protein kinase A-dependent phosphorylation drives rhythmic internal Ca²⁺ store oscillations and spontaneous beating of cardiac pacemaker cells. *Circ Res* **98**: 505–514.

Yu, Z., Redfern, C. S. und Fishman, G. I. (1996) Conditional transgene expression in the heart. *Circ. Res.* **79**: 691-697.

Zagotta, W. N., Olivier, N. B., Black, K. D., Young, E. C., Olson, R. und Gouaux, E. (2003) Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature.* **425**: 200-205.

Zaza, A., Robinson, R. B. und DiFrancesco D. (1996) Basal responses of the L-type Ca²⁺ and hyperpolarization-activated currents to autonomic agonists in the rabbit sino-atrial node. *J. Physiol* **491**: 347-355.

Zhang, H. und Vassalle, M. (2001) Role of I(K) and I(f) in the pacemaker mechanisms of sino-atrial node myocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **79**: 963-976.

Zhai, P., Yamamoto, M., Galeotti, J., Liu, J., Masurekar, M., Thaisz, J., Irie, K., Holle, E., Yu, X., Kupersmidt, S., Roden, D. M., Wagner, T., Yatani, A., Vatner, D., E., Vatner, S., F., und Sadoshima, J. (2005) Cardiac-specific overexpression of AT₁ receptor mutant lacking G α q/G α i coupling causes hypertrophy and bradycardia in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* **115**: 3045-3056.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

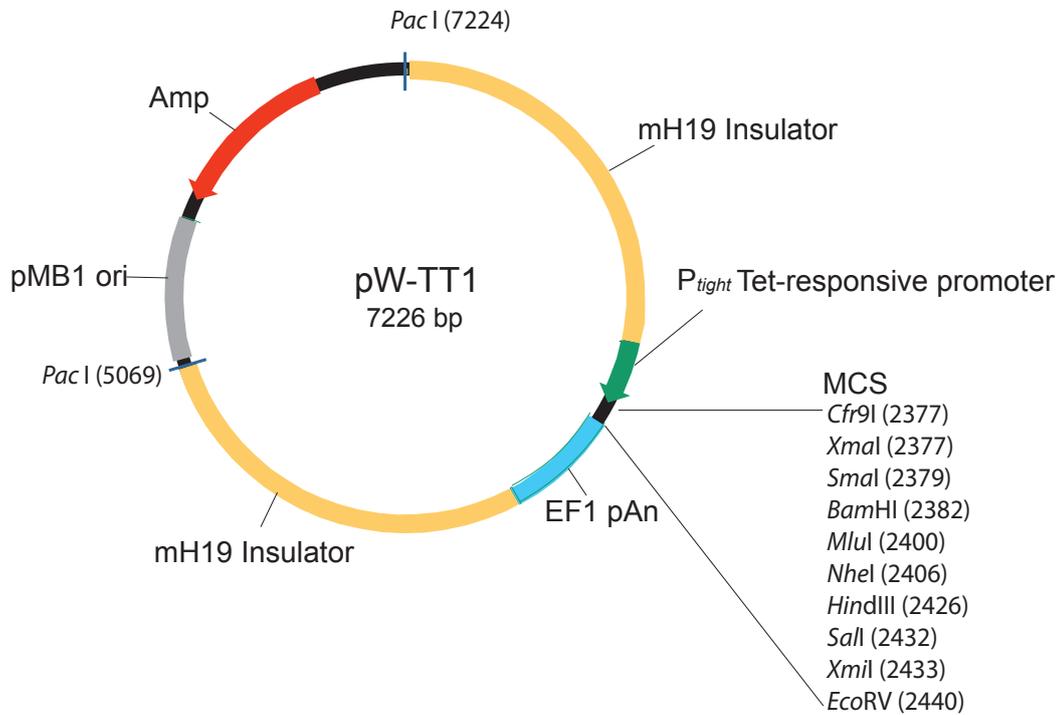
α MHC:	<i>Myosine heavy chain alpha</i> (schwere alpha-Myosinkette)
AP:	Aktionspotenzial
APD:	Aktionspotenzialdauer
AS:	<i>area shortening</i> (Kontraktionsbedingte Flächenverkleinerung)
aU:	<i>arbitrary Units</i> (Künstliche Einheit)
AV-Knoten:	Atrioventrikulärer Knoten
bp:	Basenpaare
min ⁻¹ :	Schläge pro Minute
BSA:	<i>bovine serum albumin</i> (Albumin aus Rinderserum)
cAMP:	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA:	komplementäre DNA
CNBD:	<i>cyclic nucleotide binding domain</i> (Bindedomäne für zyklische Nukleotide)
CNG:	<i>cyclic nucleotide-gated</i>
CSQ:	Calsequestrin
C-Terminus:	Carboxyl-Terminus
CT:	<i>Crista terminalis</i>
DEPC:	Diethylpyrocarbonat
DMEM:	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12</i>
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
dNTP:	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
DOX:	Doxyzyklin
DW:	Doxyzyklin-Wasser

ECL:	<i>enhanced chemiluminescence</i> (verstärkte Chemilumineszenz)
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
EKG:	Elektrokardiogramm
EKV-Modus:	EKG-basierte Kilohertz Visualisierung
<i>et al.</i> :	und andere Mitarbeiter
FCS:	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FS:	<i>fractional shortening</i>
g:	relative Erdbeschleunigung
GAPDH:	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP:	grün fluoreszierendes Protein
h	human, Stunde
HA:	Hämagglutinin
HA-hHCN4-SND:	HA-markierte humane HCN4-Kanaluntereinheit mit trunkiertem C-Terminus
HCN:	<i>hyperpolarized-activated cyclic-nucleotide-gated</i>
HEK293:	<i>human embryonic kidney</i> (humane, embryonale Nierenzellen)
HEPES:	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-piperzino)-ethansulfonsäure
HRP:	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
Hz:	Hertz
ISO:	Isoprenalin
K:	Kontrolle
KB-Lösung:	Kraftbrühe-Lösung
kDa:	Kilo-Dalton
K _v -Kanal:	spannungsabhängiger Kaliumkanal
LB:	Luria Bertani
Luminol:	3-Aminophthalsäurehydrazid
LVEDD:	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVESD:	Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
LVM/BW:	Quotient aus linksventrikulärer Masse und Körpergewicht
MANOVA:	<i>Multivariate analysis of variance</i> (multivariate Varianzanalyse)
MDP:	Mittleres diastolisches Potenzial
MEM:	<i>minimal essential medium</i> (Minimalmedium)
ml:	Milliliter
min:	Minuten
ml/min:	Milliliter pro Minute
MOPS:	(4-(N-Morpholino)-propan)-sulfonsäure

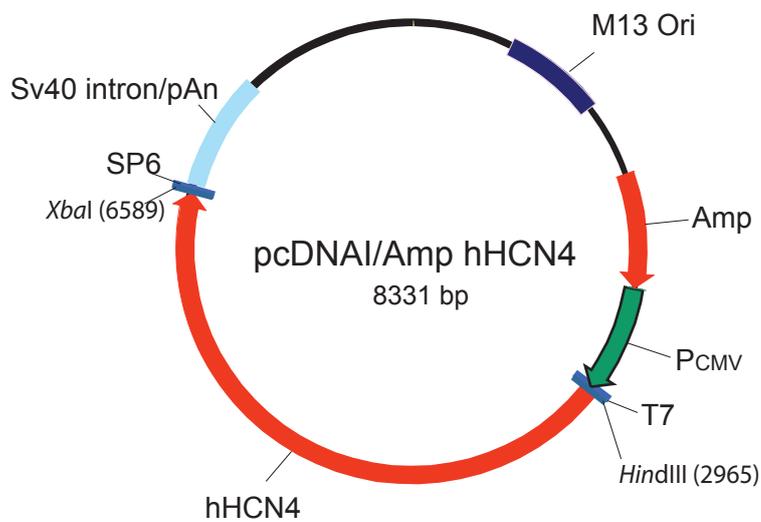
MPI:	Max-Planck-Institut
mRNA:	messenger Ribonukleinsäure
Mut:	Mutante
<i>N</i> :	Anzahl
n.s.	statistisch nicht signifikant unterschiedlich
N-Terminus:	Aminoterminus
OD _x :	optische Dichte bei x nm
PBS:	<i>phosphat buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Salzlösung)
p.c.:	<i>post coitum</i> (nach Befruchtung)
PCR:	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PEG:	Polyethylenglykol
RNA:	Ribonukleinsäure
rpm:	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT:	Raumtemperatur
s:	Sekunde
SAN:	<i>sinoatrial node</i> (Sinusknoten)
SDD:	<i>slow diastolic depolarization</i> (langsame diastolische Depolarisierung)
SDS:	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SEM:	<i>standard error of the mean</i> (Mittlerer Standardfehler)
SOB:	<i>super optimal broth</i>
SSC:	<i>sodium chloride sodium citrate</i> (Natriumchlorid Natriumzitrat)
terd:	Für endogenen T-Zellrezeptor codierendes Gen
Tet:	Tetrazyklin
T _m :	Schmelztemperatur
TRE:	<i>tetracycline response element</i> (Tetrazyklin-sensitives Bindeelement)
Tris:	Tris(-hydroxymethyl)-aminoethan
tTA:	Tetrazyklinabhängiger Transaktivator
Tyr:	Tyrode-Lösung
U:	Units
ü. N.	über Nacht
V:	Volt
VCS:	<i>vena cava superior</i> (obere Hohlvene)
(v/v):	Volumen pro Volumen
WD:	Behandlung in der Reihenfolge: Wasser-Doxyzyklin
(w/v):	Gewicht pro Volumen
ZMNH:	Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg

8.2 Plasmidkarten

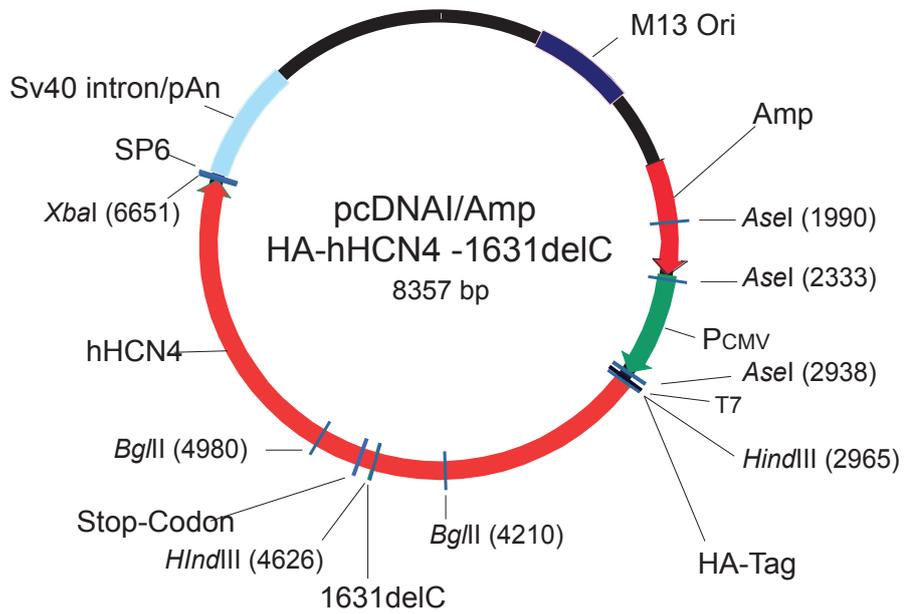
8.2.1 pW-TT1



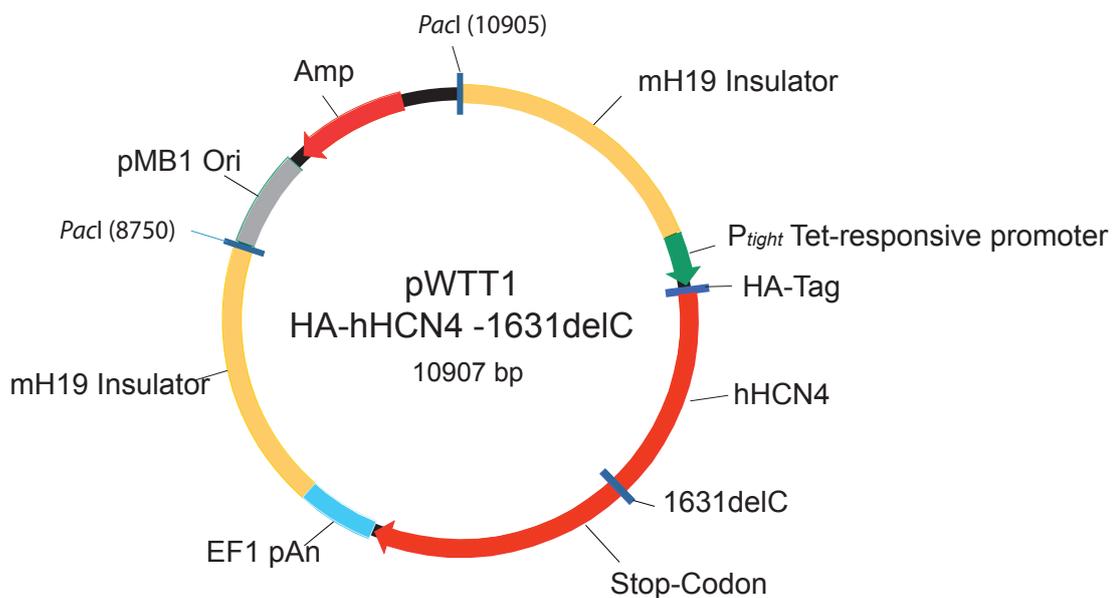
8.2.2 pcDNA1/Amp hHCN4



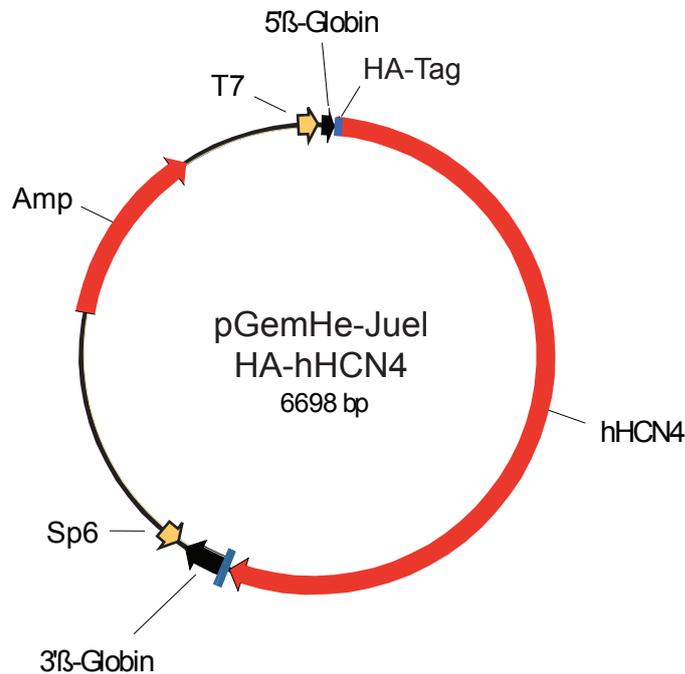
8.2.3 pcDNA1/Amp HA-hHCN4 1631delC



8.2.4 pWTT1 HA-hHCN4 1631delC



8.2.5 pGemHe-Juel-HA-hHCN4



8.3 Sequenz der für hHCN4 spezifischen Sonde

```

GGCATGTCCGACGTCTGGCTCACCATGCTCAGCATGATCGTGGGTGCCACCTGC
TACGCCATGTTTCATTGGCCACGCCACTGCCCTCATCCAGTCCCTGGACTCCTCCCGG
CGCCAGTACCAGGAAAAGTACAAGCAGGTGGAGCAGTACATGTCCTTTCAACAAG
CTCCGCCCCGACACCCGGCAGCGCATCCACGACTACTACGAGCACCGCTACCAGGG
CAAGATGTTTCGACGAGGAGAGCATCCTGGGCGAGCTAAGCGAGCCCCTGCGG
GAGGAGATCATCAACTTTAACTGTCGGAAGCTGGTGGCCTCCATGCCACTGTTTGC
CAATGCGGACCCCAACTTCGTGA

```

8.4 Sequenz des HA-Tags

```
TACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCC
```

8.5 Wissenschaftlicher Werdegang

- 1998 – 2001: Vordiplom im Fach Biochemie an der Universität Bielefeld**
Schwerpunktfächer: Anorganische Chemie, organische Chemie, physikalische Chemie, Biochemie
- 2001: Sechsmonatiges Auslandspraktikum an der Universität Salamanca.**
Thema des Projekts: Isolation and purification of a cellulase produced by *Bacillus favisporus*
- 2001 – 2004: Diplom im Fach Biochemie an der Universität Hamburg**
Schwerpunktfächer: Molekulare Medizin, Neurobiologie, Biochemie und Molekularbiologie
- 2004 – 2006: Internationaler Aufbaustudiengang im Fach Molekularbiologie an der Universität Hamburg**
- 2007: Teilnahme an der wissenschaftlichen Vortragsreihe der Onassis Stiftung**
Thema: Channels and Channelopathies
- 2004 – 2009: Promotion am Zentrum für molekulare Neurobiologie in Hamburg**
Thema der Arbeit: Rolle der cAMP-Sensitivität der HCN-Kanäle für die Herzfrequenzregulation in der adulten Maus

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dirk Isbrandt danke ich für die Überlassung des sehr interessanten Themas, für die engagierte Betreuung meiner Arbeit, sowie für seine umfassende wissenschaftliche Anleitung.

Für die bereitwillige Übernahme des Dissertationsgutachtens danke ich Herrn Prof. Dr. Konrad Wiese.

Herrn Prof. Dr. Olaf Pongs danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für sein reges Interesse an meinem Projekt.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Matteo Mangoni und Frau Dr. Laurine Marger für die äußerst produktive Zusammenarbeit und die elektrophysiologische Charakterisierung der Sinusknotenzellen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Heimo Ehmke danke ich für sein fortwährendes Interesse und seine Diskussionsbereitschaft. Ebenfalls danke ich allen Mitgliedern der DFG-Forschergruppe FOR 604, deren konstruktive Kritik und Hilfsbereitschaft bei experimentellen Fragestellungen sehr zum Gelingen dieses Projektes beigetragen haben.

Bei Frau PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer möchte ich mich für ihre Unterstützung bei der Herstellung meiner transgenen Mauslinien bedanken. Herrn Dr. Jörg Faulhaber danke ich für die Einarbeitung in die Technik der Transponderimplantation. Mein großer Dank gilt auch Birgit Geertz und Katrin Wittköpper für die Durchführung der Echokardiografie bzw. für die Hilfe bei der Auswertung. Kathrin Sauter unterstützte mich bei allen Klonierungen und Stefan Schillemeit beim Genotypisieren. Dafür sei beiden herzlichst gedankt.

Den Tierpflegerinnen des ZMNHs, Hille Voß, Eva Kronberg und Anne Seeburg möchte ich für eine ausgezeichnete und zuverlässige Arbeit danken.

Meinen Kollegen und Freunden Sönke Hornig, Quyen Le, Christoph Ogradowczyk, Kathrin Sauter und Sabine Wehrmann danke ich für ihre Unterstützung und vor allen Dingen für all die lustigen Stunden, die wir auch außerhalb des Labors zusammen verbracht haben.

Bei meinem langjährigen Freund und Mentor Dr. Thomas Klenner möchte ich mich für die ausführlichen Gespräche bedanken. In seiner ruhigen und gelassenen Art war es ihm möglich, mich selbst in aussichtslosen Situationen zu ermutigen.

Meiner Familie möchte ich für Ihre Unterstützung danken und dafür, dass sie mir in Niedersteinbach immer einen Platz für Ruhe und Erholung boten.

Mein größter Dank gilt meinem Freund Jan. Durch seine Geduld und sein Vertrauen war er eine große Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit.