Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Anatomische, molekularbiologische und elektrophysiologische Untersuchungen zur Charakterisierung eines Mausmodells mit verändertem Sinusknoten Schrittmacherkanal HCN4



Rasmus Gönner, geb. Pröbstle

aus

Stuttgart

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Christian Wahl-Schott betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 24.10.2021

(Rasmus Gönner geb. Pröbstle)

Dissertation eingereicht am 15.11.2021

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian Wahl-Schott

2. Gutachter: Prof. Dr. Martin Biel

Mündliche Prüfung am 10.12.2021

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einl	leitun	ng	7
	1.1	Der	Sinusknoten als primärer Schrittmacher im Herz	7
	1.2	Нур	perpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) Kanäle	
	1.3	Ma	usmodell mit genetisch verändertem HCN4-Kanal (HCN4FEA)	16
2	Ziel	setzu	ing der Arbeit	
3	Ma	terial	& Methoden	20
	3.1	Che	mikalien, Lösungen und Puffer	20
	3.2	Ger	netisch veränderte Versuchstiere	20
	3.3	Ger	notypisierung von Versuchstieren	20
	3.3	.1	Isolation der genomischen DNA	20
	3.3	.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
	3.3	.3	Agarose-Gelelektrophorese	21
	3.4	Her	z- und Sinusknotenpräparation	22
	3.5	Qua	antitative Echtzeit-PCR	24
	3.5	.1	Sinusknotenpräparation	25
	3.5	.2	RNA-Extraktion	25
	3.5	.3	cDNA-Synthese / Reverse Transkription	26
	3.5	.4	Quantitative Echtzeit-PCR	26
	3.6	We	stern Blot Analyse	27
	3.6	.1	Membranpräparation	27
	3.6	.2	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	28
	3.6	.3	Western Blot Analyse	29
	3.7	Här	natoxylin und Eosin sowie Fibrosierung (Sirius red/Fast green)	Färbungen von
	ventri	kulär	en Querschnitten	30
	3.7	.1	Herstellung von ventrikulären Querschnitten	

	3.7.2	Hämatoxylin und Eosin Färbung 30
	3.7.3	Fibrosierungsfärbung mit Sirius red / Fast green
	3.8 Imn	nunhistochemische Untersuchung von Sinusknoten-präparaten
	3.8.1	Sinusknotenpräparation
	3.8.2	Herstellung von Sinusknotenquerschnitten
	3.8.3	Immunhistochemische Färbungen
	3.8.4	Konfokalmikroskopie
	3.9 Elek Sinusknote	trophysiologische Untersuchungen von whole-mount-Präparationen und isolierten nzellen
	3.9.1	Patch-Clamp-Messungen mit isolierten Sinusknotenzellen
	3.9.2	Mikroelektrodenmessungen an whole-mount-Präparationen des Sinusknotens 36
4	Ergebnis	se
	4.1 ln-v	itro-Präparationen für anatomische Studien, Experimente mit whole-mount Sektionen
	des Sinuskr	notens und Isolation von Sinusknoten-Einzelzellen
	4.1.1	Sektion der Maus und Präparation des Herzens
	4.1.2	Anatomische Studien zur Lokalisation des Sinusknotens
	4.1.3	Erstellung von whole-mount-Präparaten44
	4.1.4	Sektion des Sinusknotens
	4.1.5	Isolation von SAN Einzelzellen
	4.2 Mo	ekularbiologische und histologische Untersuchungen
	4.2.1	Quantitative PCR-Analyse der HCN-Kanal Transkripte in Sinusknoten von WT- und
	HCN4FE	4-Mäusen
	4.2.2	Western Blot Analyse von verschiedenen Gewebeproben des Herzens
	4.2.3	Hämatoxylin und Eosin sowie Fibrosierung (Sirius red / Fast green) Färbungen von
	ventrikul	ären Querschnitten
	4.2.4	Immunhistochemische Analysen von Sinusknotenpräparaten
	4.3 Elek	trophysiologische Untersuchungen von whole-mount-Präparationen und isolierten
	4.3.1	Patch-Clamp-Messungen mit isolierten Sinusknotenzellen 59

	4.3	.2 Mikroelektrodenmessungen an whole-mount-Präparationen des Sinusknotens 62
5	Dis	kussion
	5.1	In-vitro-Präparationen für anatomische Studien, Experimente mit whole-mount-Sektionen
	des Si	nusknotens und Isolation von Sinusknoten-Einzelzellen
	5.2	Grundcharakterisierung des HCN4FEA-Mausmodells mit molekularbiologischen und
	histol	ogischen Untersuchungen
	5.3	Elektrophysiologische Untersuchungen von whole-mount-Präparationen und isolierten
	Sinusl	notenzellen
6	Zus	ammenfassung
7	Lite	raturverzeichnis
8	Abl	kürzungsverzeichnis
9	Abl	pildungsverzeichnis
1	0 1	abellenverzeichnis
1	1 A	Anhang
	11.1	Datentabellen
	11.2	Veröffentlichungen
	11.3	Danksagung

1 Einleitung

Der regelmäßige Herzschlag wird über eine Abfolge präzise aufeinander abgestimmter physiologischer Prozesse im Herzen gewährleistet. Erst diese autonome Regulation der Herzfrequenz garantiert die Aufrechterhaltung aller lebensnotwendigen Funktionen eines Organismus: Die spontane Schrittmacheraktivität des Herzens bestimmt nicht nur die Frequenz und den Rhythmus jeder Herzkontraktion und beeinflusst damit das individuelle Verhalten, sondern auch umgekehrt reagiert der Herzschlag selbst adäquat auf sich verändernde Umweltbedingungen. Ist das Herz dazu nicht (mehr) in der Lage, führen unphysiologische Herzfrequenzen zu pathologischen Defizienzen mit erhöhtem Risiko für kardiovaskuläre Morbidität oder Mortalität. Das genaue Zusammenspiel der einzelnen Schrittmacherzellen im Zellnetzwerk des Sinusknotens, besonders unter dem Einfluss des vegetativen Nervensystems, ist noch nicht vollständig erforscht und Gegenstand aktueller Studien, deren Ergebnisse Ansätze für die Entwicklung neuer Therapiemethoden liefern können ^[1-2].

1.1 Der Sinusknoten als primärer Schrittmacher im Herz

Der Sinusknoten wurde bereits Anfang des 20. Jahrhunderts erstmalig als "sino-auricular Knoten" in verschiedenen Spezies anatomisch genauer beschrieben ^[3]. Er stellt den primären Schrittmacher im Herzen dar, von dem unter physiologischen Bedingungen der autonome Herzschlag ausgeht. In Schrittmacherzellen werden spontane elektrische Erregungen generiert, die sich über das Erregungsleitungssystem ausbreiten und dadurch eine konzertierte Kontraktion des Herzens ausgelöst wird. Der Sinusknoten befindet sich im Herzen einer Maus im rechten Atrium als kommaförmiges Gewebe von ungefähr 1,5 mm Länge ^[4]. Die Längsachse verläuft parallel zum Sulcus terminalis in der Region zwischen der Vena cava superior und Vena cava inferior, wie in Abbildung 1 a und b zu sehen ist.

Entlang des Sulcus terminalis und des interatrialen Septums wird der Sinusknoten vom umgebenden atrialen Muskelgewebe über Bindegewebe aus Fibroblasten, Adipozyten und Kollagenfasern getrennt. Auch die Sinusknotenarterie, die bei Säugern durch die Sinuskotenregion verläuft, ist vom Bindegewebe der Tunica adventitia umhüllt. Die daraus entstehende partielle elektrische Isolation des Sinusknotens verhindert eine Beeinflussung der Schrittmacherfunktion durch das weiter hyperpolarisierte atriale Gewebe. Für die Reizweiterleitung des im Sinusknoten generierten elektrischen Impulses gibt es mehrere definierte sinuatriale Leitungswege (sinuatrial conduction pathways (SACP)) ins Atrium, die als miteinander verzahnte Ausläufer von aus dem Sinusknoten herausragenden Sinusknotenzellen und darin hineinragenden atrialen Zellen identifiziert werden konnten ^[4-8].

7

Der Sinusknoten wird in drei Bereiche unterteilt, die sich neben ihrer Lage innerhalb des Sinusknotens auch strukturell in ihrer zellulären Zusammensetzung unterscheiden. So wird der superiore Abschnitt als *"head"*, der Mittelteil als *"body"* und der inferiore Abschnitt als *"tail"* des Sinusknotens bezeichnet, wie in der schematischen Zeichnung in Abbildung 1 c zu sehen ist ^[9]. Der *Head* des murinen Sinusknotens wird als kompakter Bereich beschrieben, der eng beieinander liegende, kleine Schrittmacherzellen mit wenig Struktur und wenig Bindegewebe aufweist. Dies ist eine Besonderheit des murinen Sinusknotens, da in anderen Spezies der Anteil an Bindegewebe im Sinuskoten deutlich höher ist ^[10]. Der zentrale *Body* zeigt eine organisierte Struktur, die weniger dicht gepackt aufgebaut ist und aus länglichen Sinusknotenzellen besteht, die senkrecht zur Crista terminalis orientiert sind.





Der kaudale Bereich entspricht dem *Tail*. Dieser enthält größere, teilweise sternförmige Zellen, die parallel zur Crista terminalis verlaufen ^[4]. Während die *Head*region und der proximale Teil des *Bodys* direkt subepikardial lokalisiert sind, reichen der verbleibende Teil des Sinusknotenbodys und Teile des *Tails* bis in die endokardiale Muskulatur der Crista terminalis ^[13].

Zusätzlich zu den im Sinusknoten vorhandenen Nicht-Schrittmacherzellen wie atrialen Zellen, Adipozyten und Fibroblasten sind die sinuatrialen Schrittmacherzellen in eine Matrix aus Bindegewebsfasern eingebettet, die vorwiegend aus Elastin und Kollagen bestehen^[14]. Diese lassen sich in drei Gruppen von Zelltypen unterteilen: die Elongated Zellen, mit bis zu 80 µm die längste der Zellgruppen, weisen einen schwach gestreiften Zellkörper mit einem oder mehreren Zellkernen auf. Die zweite Gruppe der Spindle-Zellen ist der ersten Gruppe zwar sehr ähnlich, unterscheidet sich aber darin, dass die Zellen vorwiegend nur einem Zellkern besitzen, sowie vor allem in ihrer deutlich geringeren Länge von bis zu 40 µm. Das Hauptmerkmal der dritten Gruppe, der Spider-Zellen, sind unregelmäßig geformte Verzweigungen mit jeweils stumpfen Enden ^[15-16]. Die heterogene Verteilung der verschiedenen Zelltypen variiert nicht nur je nach Spezies, sondern unterscheidet sich auch innerhalb der drei verschiedenen Sinusknotenregionen eines Organismus. Das ausschließliche Vorkommen nur eines einzigen Zelltyps innerhalb einer Sinusknotenregion wurde bislang nicht beobachtet. Den größten Anteil nicht-atrialer Zellen im murinen Sinusknoten machen Spindle- und *Elongated* Zellen mit einem Anteil von 90 – 95 % aus ^[17]. Die eigenständige Existenz von *Spider*-Zellen im Sinusknoten wurde aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu vermeintlich eng miteinander verbundenen Spindle-Zellen zunächst in Frage gestellt. Da diese jedoch mit großer Mehrheit nur einen Zellkern haben, konnte sie eindeutig als eigener Zelltyp nachgewiesen werden [15, 18]. Welche physiologische Rolle sie aufgrund ihrer besonderen Morphologie einnehmen, ist bislang nicht erforscht.

Das Sinusknotennetzwerk entsteht durch die elektrische Verbindung der einzelnen Sinusknotenzellen über Gap Junctions. Diese bestehen aus sogenannten Connexonen, die aus jeweils sechs Connexin-Membranproteinen zusammengesetzt sind. Das Connexon bildet in der Zellmembran einen Hemikanal, der mit dem Connexon einer benachbarten Zelle eine Verbindung des Zytoplasmas für die Reizweiterleitung ermöglicht ^[5]. Verschiedene Mitglieder der Connexin-Familie wurden im Herzen nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass das Connexin Cx43 zwar im Arbeitsmyokard mit der Muskulatur der Atrien und Ventrikel vorhanden ist, aber nicht im Sinusknotengewebe. Deshalb wird die Abwesenheit von Cx43 als Marker für die Sinusknotenregion verwendet und ermöglicht damit eine deutliche Abgrenzung zwischen atrialem Gewebe und Sinusknotenzellen ^[4-5, 8].

Die zentrale Funktion der Gap Junctions, speziell in den Verbindungsstellen von Sinusknoten und rechtem Atrium, ist die elektrische Weiterleitung der Aktionspotentiale auf das Arbeitsmyokard der

Vorhöfe. Die Impulsleitungsgeschwindigkeit ist jedoch nicht konstant, sondern nimmt aufgrund der verschiedenen Connexin-Expressionsprofile im Sinusknoten, an dessen Rändern und dem Übergang ins Atrium zu. Innerhalb des zentralen Sinusknotens ist die Weiterleitung deutlich langsamer als in den schnellleitenden atrialen Zellen. Die Sinusknotenperipherie stellt mit mehr Zell-zu-Zell Kontakten mit der Expression von Cx43 eine Übergangszone dar ^[1]. Nachdem sich der Impuls ausgehend vom führenden Schrittmacher im Sinusknoten ausgebreitet hat, erreicht er im murinen Herz über zwei verschiedene sinuatriale Leitungswege das atriale Gewebe. Die sinuatriale Leitungszeit beträgt bei der Maus ungefähr 5 ms, gemessen mittels Optical Mapping der elektrischen Aktivität eines atrialen Präparats des murinen Herzens ^[19]. Von dort breitet sich das Signal schnell über die Atrien aus und löst damit deren Kontraktion aus, während die elektrische Erregung im Atrioventrikular-Knoten (AV-Knoten) verzögert wird (siehe Abbildung 2). Dies ermöglicht eine vollständige Füllung der Ventrikel durch die kontrahierenden Atrien, bevor die Erregung auf die Ventrikel übergeht. Vom AV-Knoten findet eine Weiterleitung in das His-Bündel statt, was sich schnell in die linken und rechten Tawara-Schenkel aufteilt.



Abbildung 2 - Schematische Zeichnung eines Herzens mit Erregungsleitungssystem (links) und der Darstellung der Aktionspotential Morphologie (rechts) für verschiedene Regionen des Herzens entsprechend des zeitlichen Ablaufs. Der Sinusknoten und der AV Knoten (beide rot) stammen aus einer genauen Computerrekonstruktion von Kaninchenherzen. SDD, langsame diastolische Depolarisation; MDP, maximales diastolisches Potential. Adaptiert nach Monfredi, et al. ^[14].

Die Erregung wird so endokardial zur Herzspitze geleitet und geht über die Purkinjefasern auf das Arbeitsmyokard mit den ventrikulären Muskelzellen über. Zuletzt werden die epikardialen Muskelzellen des linken Ventrikels depolarisiert. Die Erregungsrückbildung in den Ventrikeln erfolgt in umgekehrter Reihenfolge, da die Aktionspotentiale des epikardialen Arbeitsmyokard kürzer sind als die der Purkinjefasern, der Tawara-Schenkel und der endokardialen ventrikulären Kardiomyozyten. Eine sinuatriale Blockade oder der Ausfall des Sinusknotens kann dazu führen, dass der AV-Knoten als sekundärer Schrittmacher die Pulsgenerierung übernimmt. Der Ersatzrhythmus des AV-Knotens weist jedoch eine geringere Feuerrate als im Sinusknoten auf und die streng koordinierte Abfolge von Kontraktion der Atrien gefolgt von den Ventrikeln ist gestört, was sich in einem verringerten Herzzeitvolumen (Herzfrequenz * Schlagvolumen) widerspiegelt. Im Falle eines AV-Blocks oder dem Ausfall von Sinus- und AV-Knoten kann das His-Bündel einen Kammerersatzrhythmus erzeugen, der aber noch langsamer ist und so das Herzzeitvolumen und damit die Blutversorgung im Organismus nicht mehr sichergestellt wird ^[16, 20].

Damit die Schrittmacherzellen aber überhaupt spontane und rhythmische Aktionspotentiale auslösen können, weisen diese Zellen eine einzigartige Eigenschaft auf, die es ihnen erlaubt, dass sie sich selbst depolarisieren. Das ist in Abbildung 2 für das Aktionspotential im Sinusknoten (gelb) mit dem Schrittmacherpotential oder der langsamen diastolischen Depolarisation (SDD) gezeigt. Im Vergleich mit dem Aktionspotential des atrialen Muskelgewebes (orange) weisen die Schrittmacherzellen kein stabiles Ruhemembranpotential auf, sondern sie erreichen am Ende der Repolarisation nur ein maximales diastolisches Potential (MDP). Dieses wird mit einer langsamen Depolarisation der Membran sogleich wieder verlassen bis der Schwellenwert zum Auslösen eines weiteren Aktionspotentials erreicht ist. Die Zeit zwischen MDP und dem Erreichen des Schwellenwerts bestimmt die Dauer des Schrittmacherzyklus und damit die Herzfrequenz. Veränderungen der Herzfrequenz im Sinusknoten werden über eine Beeinflussung des SDD realisiert, die entweder die Steigung, den Startpunkt mit dem MDP oder den Schwellenwert zum Auslösen eines Aktionspotentials verändert ^[12, 14, 20].

Grundsätzlich sind die Interaktionen der einzelnen Zellen des Sinusknotennetzwerks untereinander die Grundlage für die Synchronisation eines gemeinsamen elektrischen Rhythmus des ganzen Sinusknotens. Meist ergibt sich dies aus einem Zellcluster von dominierenden Sinusknotenzellen im *Head*, die einen führenden Schrittmacher bilden und so eine Frequenz für den restlichen Sinusknoten vorgeben, auch wenn sich vor allem in *Body* und *Tail* weitere langsamere Schrittmacherzentren befinden. Die Lokalisation der führenden Schrittmacherregion ist aber keineswegs statisch, sondern wird durch äußere Einflüsse verschoben ^[21-22]. Dies wird über eine Innervierung des Sinusknotens mit synaptischen Kontakten mit den Nervenenden des Sympathikus und des Nervus vagus bewirkt, wie in

11

Abbildung 1 c schematisch dargestellt wurde ^[12, 23]. Die Einflüsse des vegetativen Nervensystems auf den im Netzwerk entstehenden autonomen Herzrhythmus sind dafür verantwortlich, dass sich die Herzarbeit adäquat an die Belastung des Körpers anpasst. Generell bewirkt das sympathische Nervensystem eine Beschleunigung der Herzfrequenz und das parasympathische (vagale) Nervensystem verlangsamt sie, wobei die aktuelle Herzfrequenz das Resultat beider Einflüsse abbildet. Beim Sympathikus wird eine katecholaminvermittelte Stimulation bewirkt durch Ausschüttung von Noradrenalin an Nervenenden des "en passant" Typs^[23], was dann an den β_1 -Rezeptoren der Herzzellen bindet. Diese Gs-Protein-gekoppelten Rezeptoren aktivieren im Folgenden die membranständige Adenylatcyclase, die aus Adenosintriphosphat (ATP) mittels Veresterung die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysiert und eine hohe zytoplasmatische Konzentration von cAMP generiert. cAMP bindet an verschiedenen Stellen in der Zelle, was zum einen direkte aktivierende Auswirkungen auf Proteine wie z.B HCN-Kanäle hat. Zum anderen nimmt cAMP indirekten Einfluss über die Kontrolle der Proteinkinase A (PKA)-Aktivität, die durch cAMP aktiviert wird und dann selbst in der Zelle an verschiedenen Proteinen mittels Phosphorylierung aktivierend wirkt. Zudem wird die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration durch die Aktivität des Sympathikus erhöht, wodurch die Aktivität der Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) und der Kalzium-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) gesteigert wird. Dies führt wiederum zu einer Phosphorylierung verschiedener Zielproteine. Gemeinsam hat dies einen steileren Anstieg der SDD, eine Erhöhung der Repolarisationsrate und damit eine Erhöhung der Aktionspotentialfrequenz in den Schrittmacherzellen zur Folge. In der Summe führt dies zu einer Erhöhung der Herzfrequenz. Neben diesem positiv chronotropen Effekt wirkt der Sympathikus am Herz auch positiv inotrop, dromotrop und bathmotrop. Auf der anderen Seite aktiviert der Parasympathikus über die Freisetzung von Acetylcholin an den vagalen Nervenenden den muskarinischen Acetylcholinrezeptor 2 (M₂-Rezeptor) auf den Herzzellen. Das gekoppelte Gi-Protein hemmt über dessen Gai-Untereinheit direkt die Adenylatcyclase, sodass weniger cAMP entsteht. Zudem werden über die Gβγ-Untereinheit die G-Protein-gekoppelten einwärts gleichrichtenden Kaliumkanäle GIRK1 und GIRK4 aktiviert, die die Zellen mit einem auswärtsgerichteten Kaliumstrom IK,ACh hyperpolarisieren. Das hat ein negativeres MDP zur Folge und eine flachere Steigung der SDD. Als letzter Schritt wird über Stickstoffmonoxid Freisetzung und weitere Schritte die Phosphodiesterase 2 (PDE II) aktiviert, sodass mit der Hydrolyse von cAMP dessen Konzentration und damit auch die Wirkung an verschiedenen Stellen in der Zelle sinkt. Der Parasympathikus hat damit eine direkte negativ chronotrope und dromotrope Wirkung ^[1, 12, 24]. Die genaue Wirkung der cAMP Konzentration auf die intrazellulären Signalwege ist noch nicht vollständig verstanden.

1.2 Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) Kanäle

Die Erkenntnis darüber, dass Schrittmacherzellen die Fähigkeit besitzen mittels der SDD autonom zu depolarisieren und dadurch spontane Aktionspotentiale auszulösen, führte zur Identifizierung des sogenannten "funny currents" I_F. Eine andere Bezeichnung dafür lautet "Hyperpolarisation activated current" I_h, da der Strom auf der Aktivierung durch Hyperpolarisation basiert, um nach Beendigung eines Aktionspotentials bei Erreichen des MDP mit seinem depolarisierenden Strom die SDD auszulösen ^[25-26]. Die den I_h-Strom vermittelnden Ionenkanäle wurden als "Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated" (HCN)-Kanäle identifiziert. Dies sind spannungsabhängige Kationenkanäle, die eine unspezifische Leitfähigkeit für Natrium- und Kaliumionen aufweisen und in nahezu allen Schrittmacherzellen nachgewiesen werden konnten. Sie können durch Hyperpolarisation aktiviert und durch Depolarisation deaktiviert werden und mit der Bindung von zyklischen Nukleotiden (vor allem cAMP) moduliert werden. Die spezifische Bindung von cAMP fördert die Aktivierung der Kanäle durch eine Verschiebung der Aktivierungskurve hin zu positiveren Spannungen ^[27-29].

Innerhalb der Superfamilie der spannungsgesteuerten Porenschleifen-Kationenkanäle wird die Familie der "cyclic nucleotide binding domain" (CNBD)-Kanäle von drei Subfamilien gebildet, die neben den HCN-Kanälen auch die "cyclic nucleotide-gated" (CNG)-Kanäle und die ether-a-go-go-type (KCNH)-Kanäle umfasst ^[30]. Die HCN Subfamilie besteht aus vier Mitgliedern (HCN1-4), die sich durch ihre Kanaleigenschaften unterscheiden. Die Sequenzidentität beträgt für alle Isoformen circa 90 %, Unterschiede liegen in der Spannungsabhängigkeit, der cAMP-abhängigen Modulation und in der Aktivierungskinetik ^[31]. Im Herz von Mäusen und Menschen konnten alle vier Isoformen identifiziert werden, jedoch mit einem heterogenen Expressionsprofil innerhalb der einzelnen Gewebetypen des Herzens. Im murinen Erregungsleitungssystem stellt HCN4 die vorherrschende Isoform dar. Im Sinusknoten konnte HCN1, HCN2 und HCN4 nachgewiesen werden, wobei der Beitrag von HCN4 am I_h -Strom von 70-80 % den größten Anteil hat. HCN1-Knockout-Mäuse zeigten im Sinusknoten einen um circa 30 % reduzierten I_h . HCN2 spielt hingegen nur eine untergeordnete Rolle, da dessen Expression gering und die Lokalisation im Sinusknoten auf die Randbereiche zum rechten Atrium beschränkt ist ^[17, 29, 32].

In der Zellmembran bilden HCN-Kanäle eine zentrale Kanalpore mit vier Untereinheiten als Homo- oder Heterotetramere der vier Isoformen ^[33]. Wie in Abbildung 3 schematisch dargestellt ist, umfasst jede Untereinheit sechs α -helikale Transmembransegmente (grau, 1-6) und den intrazellulären N- und C-Terminus. Die Kanalpore besteht aus den Segmenten 5 und 6 der vier Untereinheiten und beinhaltet in der namensgebenden Porenschleife den Selektivitätsfilter mit dem GYG Motiv, was für die Aminosäuresequenz Glycin-Tyrosin-Glycin steht. Eine intrazelluläre Schleife zwischen Segment 5 und 4 verbindet die Kanalpore mit der spannungsabhängigen Domäne, die die Segmente 1 bis 4 umfasst. Der Spannungssensor in Segment 4 zeichnet sich durch die insgesamt neun positiv geladenen Argininoder Lysin-Residuen aus, die regelmäßig im Abstand von drei Aminosäuren angeordnet sind ^[34]. Der C-Terminus enthält die Bindestelle für zyklische Nukleotide (cyclic nucleotide binding domain, CNBD), die mit Segment 6 der Kanalpore über einen 90 Aminosäuren langen C-Linker verbunden ist. Dieser C-Linker ist aus sechs α -Helices (A'-F') aufgebaut, die über kurze Loops verbunden sind. Die CNBD selbst umfasst vier α -Helices (A, P, B, C) und ein β -*Jellyroll*-Motiv aus acht β -Strängen zwischen Helix A und B. Die eigentliche Bindung von cAMP erfolgt zwischen dem β -*Jellyroll*-Motiv und der C-Helix in der *anti*-Konfiguration. cAMP ist nicht der einzige Ligand, da auch andere zyklische Nukleotide wie zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) oder zyklisches Cytosinmonophosphat (cCMP) den HCN-



Abbildung 3 - Schematische Darstellung einer HCN-Kanal Untereinheit bestehend aus sechs α -helikalen Transmembransegmenten (grau, 1-6) und dem intrazellulären N- und C-Terminus. Die Segmente 5 und 6 sowie die kurze Porenhelix (grün) bilden mit den anderen drei Untereinheiten die Kanalpore, die auch den Selektivitätsfilter mit dem GYG-Motiv enthält. Die Helices 1 bis 4 formen die spannungsabhängige Domäne inklusive des Spannungssensors mit Segment 4, der regelmäßig an jeder dritten Position die positiv geladenen Arginin- oder Lysin-Residuen (+) aufweist. Der C-Terminus besteht aus sechs α -Helices(A'-F'), die darauffolgende Bindestelle für zyklische Nukleotide (CNBD) umfasst vier α -Helices (A, P, B, C) und ein β -Jellyroll Motiv aus acht β -Strängen zwischen Helix A und B. Die Bindung von cAMP induziert eine Konformationsänderung und fördert die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle. Adaptiert nach Hennis, et al. ^[11].

Einleitung

Kanal modulieren, jedoch mit einer ungefähr 30fach niedrigeren Affinität. Dies beruht bei cGMP vor allem auf der zusätzlichen Energie, die zum Überwinden der Hydrathülle aufgebracht werden muss. Die Interaktion mit der CNBD erfolgt über dieselben sieben Aminosäurereste wie bei cAMP ^[27, 31, 35-36].

Die nach der Bindung von cAMP hervorgerufene Konformationsänderung der CNBD wurde mit Hilfe von Strukturanalysen der C-terminalen Domäne vom murinen HCN2- und humanen HCN4-Kanal sowie dem gesamten humanen HCN1-Kanal mit und ohne gebundenem cAMP untersucht $^{[31, 37-38]}$. Die α -Helices A, B und C rücken mit gebundenem cAMP näher an die β-Rolle heran, die P-Helix wird stabilisiert und es kommen die α -Helices D und E dazu, die im ungebundenen Zustand nicht stabil sind. Der Vorteil der Kristallographie des ganzen HCN1-Proteins besteht darin, dass auch die Auswirkung auf die Kanalpore direkt bestimmt werden kann. Die Konformationsänderung in der CNBD wird über eine seitliche Rotation des C-Linkers auf den Loop zu Segment 6 der Kanalpore übertragen. Dies initiiert eine Rotation der porenformenden inneren Helices zu einem offeneren Zustand des Kanals. Diese Veränderung allein ist zu gering, als dass sie den Kanal öffnen könnte, aber sie entspricht den funktionalen Effekten der cAMP-abhängigen Modulation und der erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit bei einer nachfolgenden Hyperpolarisation [27, 38].

Zudem ist mit der Kristallstruktur der Kanalpore erklärbar, wie die veränderten Eigenschaften des Selektivitätsfilters mit dem GYG-Motiv zustande kommen. Auffällig ist, dass der Selektivitätsfilter auch in selektiven K⁺-Kanälen konserviert ist und dort die Leitfähigkeit von K⁺- gegenüber Na⁺-Ionen im Verhältnis von 1000:1 steht, jedoch bei den weniger selektiven HCN-Kanälen aber nur im Verhältnis 4:1 ^[39]. In den HCN-Kanälen weist der Selektivitätsfilter nur zwei der sonst vier Bindungsstellen für K⁺- Ionen auf, da sich die Position der beiden Sauerstoffatome der Carbonylgruppen der Hauptkette mit einer um 180 ° gedrehten Seitenkette des Tyrosins im GYG-Motiv geändert hat. Mit dieser Veränderung entfallen im HCN-Kanal die ersten beiden Bindungsstellen des Selektivitätsfilters, wodurch dieser weniger selektiv wird ^[38].

1.3 Mausmodell mit genetisch verändertem HCN4-Kanal (HCN4FEA)

Um untersuchen zu können, wie sich die Einflüsse des vegetativen Nervensystems auf die HCN4-Kanäle über die cAMP-abhängige Modulation auswirken, wurde in dieser Arbeit ein genetisch verändertes Mausmodell verwendet, dessen HCN4-Kanäle eine blockierte Bindungsstelle für cAMP und andere zyklische Nukleotide aufweist. Dieses wurde am Lehrstuhl Pharmakologie für Naturwissenschaften im Rahmen einer Dissertation hergestellt (Scharr, 2011)^[40]. Das Ziel des Gentargetings mittels spezifischem Targeting Vektor war das HCN4-Gen, in das an drei Stellen Punktmutationen eingebracht wurden. Diese liegen im Bereich von Exon 4 bis 7 des murinen HCN4-Gens. Die beiden Punktmutationen R669E und T670A liegen in Exon 7 in der CNBD in einer Loop zwischen der P-Helix und dem siebten β -Strang des β -Jellyroll-Motivs, wie in Abbildung 4 b und c dargestellt wurde. Diese beiden Residuen sind hochgradig konserviert in allen Mitgliedern der CNG- und HCN-Kanal-Familien, da die spezifische Bindung von cAMP und anderen zyklischen Nukleotiden auf der Interaktion mit dem β-Jellyroll-Motiv beruht. Dies umfasst sowohl Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Ribose und dem zyklischen Phosphat mit der β-Rolle als auch die starke elektrostatische Verbindung zwischen dem Arginin 669 und dem Phosphat des cAMP^[31]. Die genetischen Veränderungen vom positiv geladenen Arginin zur negativ geladenen Glutaminsäure (R669E) und vom polaren und über die Hydroxygruppe interagierenden Threonin zum aliphatischen und damit hydrophoben Alanin (T670A) verhindern die Interaktion mit dem cAMP, sodass die CNBD funktional blockiert ist. Der Verlust der cAMP-abhängigen Modulation von HCN4 allein ist jedoch bereits in der Embryonalentwicklung bis Tag 11 tödlich ^[41], da das basale cAMP-Level in den Zellen die Aktivierungsspannung in physiologische Bereiche verschiebt ^[42-43]. Damit entspricht die Blockade der cAMP-Bindungsstelle einem fast vollständigen Verlust der HCN4-Komponente des In, analog zu Ergebnissen, die mit einem Mausmodell mit konditionalem HCN4-Knockout erhalten wurden [44]. Daher wurde analysiert, wie mit einer weiteren Punktmutation die spannungsabhängige Aktivierungskurve des Kanals zu positiveren Potentialen zurück in den physiologischen Bereich der nativen HCN4-Aktivierung verschoben werden konnte. Dies wurde mit der dritten Punktmutation Y527F in Exon 4 realisiert (siehe Abbildung 4), wo der Austausch des Tyrosins durch Phenylalanin (Y527F) in der A'-Helix des C-Linkers zu einer Verschiebung der halbmaximalen Aktivierungsspannung V_{0.5} um knapp 10 mV zu positiveren Spannungen in einem heterologen Expressionssystem führte [40, 45].



Abbildung 4 - Schematische Darstellung des HCN4-Kanals und den drei Punktmutationen des HCN4FEA-Mausmodells. (A). Vergrößerte schematische Darstellung einer HCN4 Untereinheit eines HCN4 Tetramers (siehe Einfügung). Die Sekundärstruktur des C-Linker umfasst sechs α-Helices (A'-F'), die darauffolgende Bindestelle für zyklische Nukleotide (CNBD) umfasst vier α-Helices (A, P, B, C) und ein 6-Jellyroll Motiv aus acht 6-Strängen zwischen Helix A und B. Die drei Punktmutationen von HCN4FEA sind mit farbigen Kreisen markiert. (B) Der C-Terminus mit C-linker und CNBD des humanen HCN4-Kanals (PDB #Q9Y3Q4). Die drei Residuen der HCN4FEA Mutationen sind für Y527 violett, R669 orange und T670 pink markiert. Die Mutationen R669E and T670A in der CNBD verhindern die Bindung von cAMP und befinden sich beide in der Loop zwischen der P-Helix und dem siebten β-Strang. Beide Residuen sind in den cyclic nucleotide-gated (CNG)- und HCN-Kanal Familien hochgradig konserviert.^[31, 38]. (C) CNBD des humanen HCN4-Kanals mit gebundenem cAMP. Die hochspezifische Bindung benötigt die beiden Residuen R669 und T670. Abbildung adaptiert nach Fenske, et al. ^[45].

Für die Generierung des Mausmodells wurde das in Abbildung 5 dargestellte Targeting Konstrukt kloniert, was sowohl die drei Punktmutationen in Exon 4 und 7 beinhaltete wie auch eine ACN-Resistenzkassette (*"self exciser"*) in Intron 4, die zur Selektion der veränderten murinen embryonalen Stammzellen durch das Gentargeting mittels Neomycin-Resistenz diente. Darüber wurde zudem eine selbstständige Deletion aus dem Genom von damit erzeugten männlichen chimären Mäusen über die männliche Keimbahn ermöglicht. Der nur in Spermien aktive Promoter des tACE-Gens (Testis-

spezifischer Promotor des Angiotensin-konvertierenden Enzyms) induziert die Expression einer Cre-Rekombinase. Diese erkennt die flankierenden loxP-Stellen der Kassette und schneidet dort die DNA, wodurch die ACN-Kassette herausgetrennt wird. Im Genom verbleiben die Punktmutationen des Targeting-Konstrukts und eine loxP-Stelle anstatt der ACN-Kassette ^[46]. Die auf diese Weise veränderten embryonalen Stammzellen von 129/Sv-Mäusen wurden in C57BL/6N-Embryonen im Acht-Zell-Stadium injiziert und scheinschwangeren Mäusen implantiert, wodurch chimäre Mäuse erhalten wurden. Diese wurden wiederum mit Wildtyp (WT)-Mäusen vom C57BL/6N-Stamm verpaart. Über die dominante Weitergabe der braunen Fellfarbe des 129/Sv-Stamms gegenüber des schwarzen Fells der C57BL/6N-Mäuse wurde die Keimbahngängigkeit der Mutationen in der F1-Generation direkt nachgewiesen ^[40]. Die genaue Analyse der Integration zeigte, dass nicht nur heterozygote, sondern auch die homozygoten HCN4FEA-Mäuse lebensfähig waren und keine Auffälligkeiten in der Entwicklung zeigten. Diese genetisch veränderten Mäuse des HCN4FEA-Mausmodells stellen die Grundlage für die Erforschung der cAMP-abhängigen Modulation des HCN4-Kanals dar.



Abbildung 5 – Targeting Strategie zur Generierung des HCN4FEA Knock-In Mausmodells. Der HCN4 WT Lokus umfasst Exon 3 bis 8, wobei die 3 Punktmutationen in Exon 4 und 7 (blau markiert) lokalisiert sind, zwei davon (R669E, T670A) in der CNBD und eine (Y527F) im C-linker des HCN4-Kanals. Abbildung adaptiert nach Fenske, et al. ^[45].

2 Zielsetzung der Arbeit

Die autonome Herzaktivität beruht auf einer spontanen Generierung von elektrischen Impulsen in den Schrittmacherzellen des Sinusknotens, die durch die I_h-initiierte SDD ausgelöst werden. Dieser Strom wird in den Schrittmacherzellen hauptsächlich vom HCN4-Kanal vermittelt ^[4], dem deshalb auch die Kontrolle des autonomen Herzschlags zugeschrieben wird. Der Einfluss von HCN4 auf den I_h-Strom basiert funktional auf der cAMP-abhängigen Regulation des Kanals, wobei bislang ungeklärt ist, inwiefern sich die Signale des vegetativen Nervensystems über HCN4 auf die Regulierung des Herzschlags auswirken. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde diese Fragestellung anhand eines neuen Knock-in-Mausmodells (HCN4FEA) untersucht. Dessen HCN4-Kanal weist aufgrund dreier Punktmutationen einen vollständigen Verlust der cAMP-Bindung auf, wobei das spannungsabhängige gating des Kanals jedoch erhalten ist. Im Rahmen von anatomischen, molekularbiologischen und elektrophysiologischen Untersuchungen sollten die Eigenschaften des Mausmodells grundlegend charakterisiert werden.

Dafür wurden mehrere in-vitro-Präparationsmethoden etabliert, optimiert und dokumentiert, die zum einen eine präzise Lokalisation des Sinusknotens ermöglichen, zum anderen die reproduzierbare Präparation von kardialem Gewebe und Zellen gewährleisten sollten.

Diese wurden verwendet, um das HCN4FEA-Mausmodell morphologisch und molekularbiologisch mittels quantitativer PCR-Analyse, Western Blot und der Anfertigung von ventrikulären Querschnitten des Herzens mit anschließenden histologischen Färbungen zu überprüfen sowie die Proteinexpression der HCN-Kanäle mit immunhistochemischen Färbungen im Sinusknoten zu lokalisieren.

Die elektrophysiologischen Eigenschaften des HCN4FEA-Kanals wurden auf Einzelzell- und Netzwerkebene untersucht, um mittels Patch-Clamp-Messungen an isolierten Sinusknotenzellen sowie Mikroelektrodenmessungen an whole-mount-Sinusknotenpräparaten erste Ergebnisse des kardialen Phänotyps der genetisch veränderten HCN4-Kanäle aufzuzeigen.

3 Material & Methoden

3.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Alle Chemikalien wurden in Analysenqualität oder in vergleichbarer Reinheit von den Firmen Sigma-Aldrich, Merck, Carl Roth oder VWR International bezogen, sofern nicht anders angegeben.

Das für die Herstellung von Lösungen benötigte Wasser wurde mittels einer Reinstwasser-anlage Milli-Q Gradient der Firma Millipore gewonnen, in 1l Schott-Glasflaschen gefüllt und anschließend autoklaviert. Das so behandelte Wasser wurde maximal 4 Wochen verwendet.

3.2 Genetisch veränderte Versuchstiere

Die in den Experimenten dieser Arbeit verwendeten Mäuse waren teilweise genetisch verändert. Die Generierung dieser Knock-In-Mäuse war Inhalt einer früheren Dissertation (Scharr, 2011) ^[40]. Ziel des Gentargetings mittels spezifischem Targeting Vektor war das HCN4-Gen, in das an drei Stellen Punktmutationen eingebracht wurden. Diese liegen im Bereich von Exon 4 bis 7 des murinen HCN4-Gens. Die Punktmutation Y527F in Exon 4 sollte die spannungsabhängige Aktivierungskurve des Kanals zu positiveren Potentialen verschieben. Die beiden Punktmutationen R669E und T670A in Exon 7 in der Bindestelle für zyklische Nukleotide (CNBD) führten zur Insensitivität des Kanals gegenüber der Modulation durch cAMP. Gemäß den eingebrachten Aminosäure-Mutationen wird diese Knock-In-Mauslinie als HCN4FEA bezeichnet.

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte gemäß den gesetzlichen Richtlinien und wurde von der Regierung von Oberbayern genehmigt. Die Tiere erhielten Wasser und Futter (Haltungsfutter R/M-H, Zuchtfutter M-Z Extrudat; Ssniff) *ad libitum* und lebten in einem 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus. Es wurden Anstrengungen unternommen die Anzahl der verwendeten Mäuse so gering wie möglich zu halten.

3.3 Genotypisierung von Versuchstieren

Alle Würfe in der Zucht von Versuchstieren wurden mit dem folgenden Protokoll genotypisiert.

3.3.1 Isolation der genomischen DNA

Aus Gewebeproben von Ohrbiopsien wurde die genomische DNA isoliert, indem die Probe in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß in 600 μl 50 mM NaOH für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert wurde. Dem wurde 50 μl 1 M TrisHCl (pH 8) zugegeben und bei 13000 1/Min für 6 Minuten zentrifugiert. Die im Überstand befindliche DNA wurde in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet.

3.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde verwendet, um die relevanten Genabschnitte zu amplifizieren, die für eine Genotypisierung der Versuchstiere nötig ist. Dafür wurde im Ansatz in Tabelle 1 die GoTaq-Polymerase und speziell designte Primer (Eurofins Scientific SE) verwendet, deren Sequenz (5'-3') wie folgt war: HCN4FEA_forward CTCAAGGTCTCAGCTGAGG HCNFEA_reverse GTAATGTAAGCACACGGTACC

Bestandteil	Volumen [µl]
DNA	2
Primer 1 (10 μM)	2
Primer 2 (10 μM)	2
dNTP´s	0,5
5x Buffer	5
Taq Polymerase (GoTaq)	0,125
H2O	11,375

Tabelle 1 - PCR Reaktionsansatz für die Genotypisierung.

Die PCR wurde mit diesem Ansatz mit dem in Tabelle 2 abgebildeten Protokoll durchgeführt.

Tabelle 2 - PCR Protokoll.

Initial Denaturatierung	95°C	2 min	
Denaturierungsschritt	95°C	30 s	
Primer Hybridisierung	59°C	30 s	40 cycles
Elongation	72°C	40 s	
Finale Elongation	72°C	5 min	

Die Proben wurden bis zur Verwendung in der Agarose Elektrophorese bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde verwendet, um die vervielfältigten DNA-Abschnitte mit verschiedenen Längen im Agarose-Gel elektrophoretisch aufzutrennen. Dafür wurde ein Gel mit 2 % Agarose (peqGOLD, VWR International GmbH) in TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer hergestellt, dem auch PeqGreen (VWR International GmbH) mit einer finalen Konzentration von 0,025 µl/ml zugegeben wurde, was die DNA unter UV-Licht sichtbar macht. Das feste Gel wurde in einer Elektrophoresekammer platziert und mit TBE-Puffer als Laufpuffer überschichtet. Die mit 6x loading dye im Verhältnis 1:6 gemischten Proben wurden in die Taschen des Gels pipettiert und mindestens ein Größenmarker (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific) pro Gel zusätzlich aufgetragen. Die Auftrennung der DNA erfolgt bei einer Spannung zwischen 130 und 180 mV und die DNA-Banden wurden mit einem GelDoc 2000 (Bio-Rad) aufgenommen. Die Größe der DNA-Abschnitte betrug für den WT 345 bp und für HCN4FEA 471 bp basierend auf der zusätzlichen loxP-Stelle im Genom der HCN4FEA-Mäuse ^[40].

3.4 Herz- und Sinusknotenpräparation

Die Präparation der Mausherzen und des Sinusknotens wurde mit Hilfe von Gelatine- und Epoxidharz-Präparaten hinsichtlich der anatomischen Anschaulichkeit sowie der Qualität und Reproduzierbarkeit der elektrophysiologischen Experimente optimiert. Ablauf und Verwendung werden deshalb im Ergebnisteil in Kapitel 4.1 ausführlich beschrieben und wurden in einer Publikation veröffentlicht ^[18].

Die für die Präparationen verwendeten Materialien sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3 – Materialien für die Herz und Sinusknotenpräparation.

Bezeichnung	Hersteller
Präparationsbesteck	
Mayo Schere	FST (Fine Science Tools), Art Nr. 91401-14
Standardpinzette, gerade	FST, Art Nr. 11000-13
Feine Iris Schere, gerade (Wolframkarbid)	FST, Art Nr. 14568-12
Federschere, 8 mm Klingen	FST, Art Nr. 15024-10
Feine Pinzetten (Dumont Nr. 5)	FST, Art Nr. 11251-20
Feine Iris Schere, gebogen	FST, Art Nr. 14061-09
Vannas-Federschere, 2,5 mm Klingen	FST, Art Nr.15000-08
Halsey Nadelhalter	FST, Art Nr. 12501-13
Laborausstattung und Verbrauchsmaterialien	
Eppendorf Research Plus Pipette (1000 μl)	Eppendorf, Art Nr. 3120000062
Eppendorf Research Plus Pipette (200 μl)	Eppendorf, Art Nr. 3120000054
Eppendorf Research Plus Pipette (20 μl)	Eppendorf, Art Nr. 3120000038
Peristaltische Perfusionspumpe MINIPULS 3	Gilson
Stereomikroskope Stemi 2000	Carl Zeiss
Thermomixer Compact 5350	Eppendorf
Wasserbad Lauda A 100	Lauda-Brinkmann
Zentrifuge 5415D	Eppendorf
Deckgläser (12 mm)	VWR International, Art Nr. 631-1577
Minutiennadeln (0,1 mm Durchmesser)	Fiebig Lehrmittel, Art Nr. 20357
Petrischale (100 x 15 mm)	VWR International, Art Nr. 710-4105
Petrischale (140 x 20,6 mm)	VWR International, Art Nr. 391-1503
Reaktionsgefäß 1,5 / 2 ml, Eppendorf Safe-Lock	Eppendorf, Art Nr. 00301200-86/-94

Fortsetzung Tabelle 3			
Safety-Multifly [®] Kanüle (21G x ¾" Durchmesser x	Sarstedt, Art Nr. 851638235		
Länge)			
Spritze (50 ml, Luer-Lock Verschluss)	Terumo, Art Nr. 1086524		
Spitze (5 ml)	Terumo, Art Nr. 6SS05S		
Sterican [®] Kanüle (26G)	B. Braun, Art Nr. 4657683		
Reagenzien			
EGTA	Sigma-Aldrich, Art Nr. T4378		
HEPES	Carl Roth, Art Nr. 6763		
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Art Nr. P5405		
Kaliumhydroxid (KOH)	Sigma-Aldrich, Art Nr. P5958		
Kaliumphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Art Nr. P5655		
L-Glutaminsäure	Sigma-Aldrich, Art Nr. G1251		
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Art Nr. S7653		
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Art Nr. S8045		
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	VWR Chemicals, Art Nr. 28029.260		
(Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)			
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Art Nr. P6148		
Taurin	Sigma-Aldrich, Art Nr. T0625		
α-D-(+)-Glukose Monohydrat	Carl Roth, Art Nr. 6887		
Poly-L-lysin Hydrobromid (PLL)	Sigma-Aldrich, Art Nr. P1399		
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma-Aldrich, Art Nr. 05470		
Collagenase B aus Clostridium histolyticum (199 U/mg)	Roche Diagnostics, Art Nr. 11088807001		
Elastase aus Schweinepankreas (≥15 U/mg)	Sigma-Aldrich, Art Nr. 45124		
Protease aus Streptomyces griseus (type XIV, ≥3.5	Sigma-Aldrich, Art Nr. P5147		
U/mg)			
Carbogen (5% vol/vol CO_2 in O_2)	Air Liquide, Art Nr. P3750L50R5A001		
IsoFlo [®] (100% Isofluran)	Abbott Animal Health, Art Nr. 05260-05		
Gelatinepulver	Dr. August Oetker Nahrungsmittel		
PU4II Epoxidharz und Härter Kit (Farbe Blau)	VasQtec		
Sylgard [®] 184 Silikonelastomer Kit	Dow Corning		

23

Eine Petrischale (100 mm) wurde zur Hälfte mit Sylgard[®] befüllt, was nach Herstellerangaben zubereitet wurde. Nach dem Aushärten diente diese als Präparationsschale, in der die Herzen oder Gewebestücke mit einer Kanüle oder den Minutiennadeln am Boden festgepinnt werden konnten. Die Schale wurde wiederverwendet und zwischenzeitlich gereinigt und desinfiziert.

Die für die Präparationen verwendeten Lösungen sind in Tabelle 4 aufgelistet.

PBS		Tyrode II	I	Tyrode lo	w	Kraftbrühe (KB)	
NaCl	137,0 mM	NaCl	140,0 mM	NaCl	140,0 mM	L-Glutaminsäure	80,0 mM
KCI	2,7 mM	KCI	5 <i>,</i> 4 mM	KCI	5 <i>,</i> 4 mM	KCI	25,0 mM
Na_2HPO_4	8,1 mM	$MgCl_2$	1,0 mM	$MgCl_2$	0,5 mM	MgCl ₂	3,0 mM
KH_2PO_4	1,8 mM	$CaCl_2$	1,8 mM	$CaCl_2$	0,2 mM	KH ₂ PO ₄	10,0 mM
		HEPES	5,0 mM	KH_2PO_4	1,2 mM	Taurin	20,0 mM
		Glukose	5,5 mM	Taurin	50,0 mM	HEPES	10,0 mM
				HEPES	5,0 mM	EGTA	0,5 mM
				Glukose	5,5 mM	Glukose	10,0 mM
pH 7,4 mit NaOH		pH 7,4 m	it NaOH	pH 6,9 m	it NaOH	pH 7,4 mit KOH	

Tabelle 4 - Lösungen für die Herz- und Sinusknotenpräparation.

Für die Isolation von Sinusknoten (SAN)-Einzelzellen wurden aliquotierte Enzymlösungen verwendet, deren Zusammensetzung in Tabelle 5 aufgelistet sind.

Tabelle 5 - Zusammensetzung der Aliquots der Verdauungsenzyme.

Enzym	Enzymeinheit/Aliquot	Volumen/ Aliquot	Haltbarkeit
Collagenase B (Roche)	0,54 U	150 μl Tyrode low pH 6,9	1 Woche bei -20 °C
Protease (Sigma-Aldrich)	5,6 U	125 μl Tyrode low pH 6,9	6 Monate bei -20 °C
Elastase (Sigma-Aldrich)	18,87 U	40 μl Tyrode low pH 6,0	1 Woche bei -20 °C

3.5 Quantitative Echtzeit-PCR

Für die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) wurde zunächst RNA aus den präparierten Sinusknoten extrahiert, die direkt anschließend in cDNA umgeschrieben wurde. Damit wurde dann in der qPCR das relative Vorkommen der verschiedenen HCN-Kanal-Isoformen für WT- und HCN4FEA-Mäuse mit der ΔΔCt-Methode bestimmt.

3.5.1 Sinusknotenpräparation

Für die qPCR wurden die Sinusknoten von drei WT- und drei HCN4FEA-Mäusen wie in Kapitel 4.1.1 und 4.1.4 beschrieben präpariert und jeweils in ein leeres, RNase-freies 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde sofort bis zum Abschluss der weiteren Präparationen und Weiterverwendung für die RNA-Extraktion in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.5.2 RNA-Extraktion

Für die RNA-Extraktion jedes einzelnen Sinusknotenpräparats wurde das RNeasy Plus Mini Kit von Qiagen verwendet.

Der Arbeitsplatz und die Nitrilhandschuhe wurden vorab mit RNaseZAP gereinigt. Für die Lyse und Homogenisierung wurden jedem Sinusknoten im 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß 600 μ l RLT Plus-Puffer (mit 10 μ l β -Mercaptoethanol auf 1 ml RLT Plus-Puffer) sowie eine gereinigte Edelstahlkugel (3 mm Durchmesser) zugegeben und anschließend für eine Minute bei 30 Hertz in die Kugelmühle (Schwingmühle, VWR) gestellt. Danach wurde die Kugel mit einem Magnet kontaktfrei entfernt.

Das Lysat wurde 3 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit der Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und auf die gDNA Eliminator spin-Säule, die auf einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß steckt, gegeben. Nach einer Zentrifugation von 30 Sekunden bei 10000 U/min wurde die Säule verworfen.

Zum Überstand wurde das gleiche Volumen (also knapp 600 μl) 70%iges Ethanol (unvergällt) gegeben und durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt.

Das ganze Volumen wurde dann auf die RNeasy spin-Säule gegeben, 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen.

Die auf der Säule gebundene RNA wurde zunächst mit 700 µl RW1-Puffer gewaschen und 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Dann folgte dieselbe Waschprozedur zweimal mit je 500 µl RPE-Puffer. Der Abschluss des Waschens erfolgte mittels Zentrifugation für 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit auf einem neuen 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß. Um die RNA zu eluieren wurde diese Säule auf ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt, 33 µl RNase freies Wasser auf die Mitte der Säule gegeben und 1 Minute bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut auf die Säule gegeben und nochmal gleich zentrifugiert.

Die so erhaltene RNA wurde bis zur direkt anschließenden Weiterverwendung auf Eis gelagert. Die RNA-Konzentration wurde mit dem Mikrovolumen-Spektralfotometer NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific) und 1 µl RNA-Lösung gemäß den Anforderungen bestimmt.

3.5.3 cDNA-Synthese / Reverse Transkription

Für die cDNA-Synthese wurde das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit von Thermo Scientific genutzt. Gemäß dem Protokoll zur "First Strand cDNA Synthesis" wurde im ersten Schritt in drei geeignete Reaktionsgefäße von jedem RNA-Extrakt eines Sinusknotens 10 µl sowie 1 µl Oligo (dT)₁₈ Primer und 1 µl Random Hexamer Primer gegeben.

Dann wurde jede Probe kurz abzentrifugiert, und bei 65 °C für 5 Minuten inkubiert. Nach der Abkühlung auf Eis wurde erneut kurz abzentrifugiert und das Reaktionsgefäß wieder zurück auf Eis gelegt.

Aus dem in der Reihenfolge der Aufzählung zusammengestellten Mastermix wurde jeder Probe 8 μ l zugefügt, bestehend aus 4 μ l 5x Reaktionspuffer, 1 μ l RiboLock RNase Inhibitor (20U/ μ l), 2 μ l 10 mM dNTP Mix und 1 μ l ReverAid MuLV Reverse Transkriptase (200 U/ μ l).

Alle Proben wurden dann für 60 Minuten bei 42 °C inkubiert und, um die Reaktion zu stoppen, für 5 Minuten auf 70 °C erhitzt.

Die je drei Ansätze pro Sinusknoten à 20 μ l wurden in einem Reaktionsgefäß vereinigt und auf Eis gestellt für die direkt anschließende qPCR. Der nicht verwendete Rest wurde bei -20 °C für eine potenzielle Wiederholung eingefroren.

3.5.4 Quantitative Echtzeit-PCR

Die qPCR wurde mit einem StepOnePlus[™] Real-Time PCR-System von Applied Biosystems in Kombination mit dem PowerUp SYBR Green Master Mix von ThermoFisher Scientific durchgeführt.

Zur Charakterisierung wurden spezifische Primer zur Adressierung der vier verschiedenen HCN-Kanal-Isoformen (HCN1-4) verwendet, die RNA-Bereiche von verschiedenen Exons abdecken, um die Amplifikation genomischer DNA in jedem Fall auszuschließen. Das Primerdesign und die Primeroptimierung wurden vorab im Labor von verschiedenen Personen durchgeführt und auch schon für andere Gewebe verwendet. Als Housekeeping-Gene wurden die murine Delta-Aminolävulinatsynthase Synthase 1 (mALAS) und die murine Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Die Primersequenzen sind in Tabelle 6 angegeben.

Primer	Sequenz forward (5'->3')	Sequenz reverse (5'->3')
HCN1	CTGCTGCAGGACTTCCCACCA	ATGCTGACAGGGGCTTGGGC
HCN2	CAGGAACGCGTGAAGTCGGCG	TCCAGGGCGCGGTGGTCTCG
HCN3	TGGCCATGGACCGGCTTCGG	GAGCCAGGCCCCGAACACCAC
HCN4	AGGGCCTTCGAGACGGTTGCGC	GGCCATCTCACGGTCATGCCG
mALAS1	TCGCCGATGCCCATTCTTATC	GGCCCCAACTTCCATCATCT
mGAPDH	GGCAAATTCAACGGCACAGTCA	GTTTCTCCAGGCGGCACGTCA

Tabelle 6 - qPCR Primersequenzen.

Die Messung und Analyse der Daten erfolgte mit der StepOne[™] Software v2.3, wobei für alle Experimente inklusive der Wiederholungen ein Ct-Threshold von 1,5 angewendet wurde.

3.6 Western Blot Analyse

Die benötigten Sinusknotenpräparationen wurden von drei Monate alten, weiblichen WT und HCN4FEA-Mäusen erstellt, wie unter Kapitel 4.1.1 und 4.1.4 beschrieben und vereinigt (WT und HCN4FEA jeweils n = 9 Sinusknoten), sowie vergleichbar große Stücke von zwei rechten Atrien und einem linken Ventrikel entnommen. Die Gewebeproben wurden in 2 ml Eppendorf Protein LoBind Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff für die nächsten Schritte aufbewahrt.

Die Membranpräparation, die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese sowie das Western Blotting und die Immundetektion wurden von Frau Dr. Ong Nam Phuong Nguyen durchgeführt und dokumentiert ^[47].

3.6.1 Membranpräparation

Die Membranpräparation diente der Anreicherung von Membranproteinen aus den Gewebeproben für die weitere Analyse. Diesen wurde 1 ml Membranpräparationspuffer (1x) (siehe Tabelle 7) mit komplett EDTA-freiem Proteinase Inhibitor Cocktail (Roche) hinzugefügt bevor sie mit dem Potter S Homogenisator (B. Braun) aufgebrochen wurden. Die homogenisierten Zellen wurden dann bei 5000*g* und 4 °C für 10 Min zentrifugiert und der Überstand wurde in einem sauberen 6,5 ml Dickwand-Polykarbonat Röhrchen (16 x 64 mm, Beckman Coulter) überführt. Membranpräparationspuffer (1x) wurde *ad* 4 ml hinzugefügt und bei 30000 1/min bei 4 °C für 45 Minuten in einer Sorvall Discovery90 Ultrazentrifuge mit einem Beckman Coulter 45Ti Rotor zentrifugiert. Das Pellet wurde abhängig von dessen Größe in 50-100 µl Membranpräparationspuffer (1x) re-suspendiert und 5 µl für die Proteinquantifizierung verwendet. Die Proteinkonzentration wurde per Bradford-Test^[48] bestimmt, wofür 5 µl Proteinlösung in eine 1 ml Küvette transferiert wurde und 95 µl 0,15 M NaCl Lösung hinzugefügt wurden. Dazu kamen 1 ml Coomassie Lösung (siehe Tabelle 7), die für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Mit Hilfe eines BioPhotometer (Eppendorf) wurde die Proteinkonzentration bei 595 nm gemessen und gegen eine Standardreihe mit dem Protein BSA (Bovines Serum Albumin) quantifiziert.

Tabelle 7 - Lösungen	für die	Membranpräparation.
----------------------	---------	---------------------

Membranpräparationspuf	fer (3x)	Coomassie Lösung		
MOPS	3,15 g	Coomassie-Brilliantblau G250	50 mg	
Saccharose	77 g	95% (V/V) Ethanol	25 ml	
0,5 M EDTA (pH 7,4)	6 ml	85% (V/V) Phosphorsäure H_3PO_4	50 ml	
dd H ₂ O	<i>ad</i> 250 ml	dd H ₂ O	<i>ad</i> 500 ml	

3.6.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde verwendet, um die Proteine nach ihrem Molekulargewicht und über die Wirkung von SDS unabhängig von ihrer eigenen Ladung aufzutrennen. Dafür wurden die Proteine in Lämmli-Puffer (siehe Tabelle 8) für 5 Minuten bei 97 °C denaturiert und in ein 7% SDS-PAGE Gel zusammen mit dem Größenstandard PageRuler[™] Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Elektrophoresepuffer (siehe Tabelle 8) bei 100 V in einer Mini Protean 3 Apparatur (Biorad) bis der Größenstandard klar aufgetrennt war.

Lämmli Probenpuffer (6x) mit DTT		Elektrophoresepuffer (1x)	
TrisHCl	7 ml	Tris	3 g
Tris-HCl	0,5 M	Glycerin	14,4 g
SDS	0,4 %	SDS	1 g
	auf pH 6,8	dd H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml
Glycerin	3 ml		
SDS	1 g		
DTT	0,93 g		
Bromphenolblau	1,2 mg		
dd H ₂ O	<i>ad</i> 10 ml		

Tabelle 8 - Lösungen für die SDS-PAGE.

3.6.3 Western Blot Analyse

Der eigentliche Western Blot wurde mit dem Kammer Blotting System (Mini Trans-Blot[®] cell, Biorad) vom Gel auf eine zuvor mit Methanol äquilibrierte Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran (Whatman GmbH) in Transferpuffer (Tris 3 g, Glycin 14,4 g, dd H₂O *ad* 1l) bei 100 V für 90 Minuten durchgeführt. Danach wurde die Membran zunächst in einer Blockierlösung (5 % Milchpulver in TBST (siehe Tabelle 9)) für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert und danach in TBST mit 1 % Milchpulver und den Primärantikörpern in der entsprechenden Verdünnung wie in Tabelle 10 angegeben über Nacht bei 4 °C inkubiert.

TBST		Coomassie Lösung	
Tris	1,21 g	Coomassie-Brilliantblau G250	50 mg
NaCl	8,02 g	95% (V/V) Ethanol	25 ml
Tween 20	1 ml	85% (V/V) Phosphorsäure H₃PO₄	50 ml
dd H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml	dd H ₂ O	<i>ad</i> 500 ml

Tabelle 9 - Western Blot Lösungen.

Danach wurde zunächst dreimal mit TBST für je 5 Minuten gewaschen und dann mit den Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierten Sekundärantikörpern mit 1% Milchpulver in TBST für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde erneut dreimal für 5 Minuten mit TBST gewaschen und einmal mit ddH₂O. Für die Messung der HRP-vermittelten Chemilumineszenz wurde die Membran in nach Herstellerangaben frisch vorbereitetem Western Blotting Luminol Reagenz (sc-2048; Santa Cruz Biotechnology, USA) inkubiert und die Signale der Proteinbanden mit einem Chemidoc MP Imaging System (BioRad, USA) und der dazugehörigen ImageLab Software aufgenommen.

Tabelle 10 - Western Blot Analyse Primär- und Sekundärantikörper.

Antikörper	Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
Mouse anti-HCN1	N30/28	Abcam, UK	1:1000
Rabbit anti-HCN2	APC-030	Alomone Labs, Israel	1:250
Rabbit anti-HCN4	APC-052	Alomone Labs, Israel	1:250
Mouse anti-α-Tubulin	AA4.3	Developmental Studies Hybridoma Bank, USA	1:1000
Goat anti-mouse HRP	sc-2030	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:2000
Goat anti-rabbit HRP	sc-2031	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:1000

3.7 Hämatoxylin und Eosin sowie Fibrosierung (Sirius red / Fast green) Färbungen von ventrikulären Querschnitten

3.7.1 Herstellung von ventrikulären Querschnitten

Die Herzen von drei Monate alten, männlichen WT- und HCN4FEA-Mäusen wurden wie in Kapitel 4.1.1 präpariert und in eine kleine Petrischale überführt. Darin wurden sie zunächst für zwei Stunden in 4 % Paraformaldehyd fixiert und dann über Nacht in einer 25 % Saccharoselösung inkubiert. Mit einem 3x3 cm großen Stück Alufolie wurde ein oben offener Zylinder geformt und dessen Boden mit einem Tropfen OTC-Einbettmedium (optimum cutting temperature, Tissue Tek, Sakura Finetek) bedeckt und eingefroren. Darauf wurde dann das Herz platziert und der Zylinder vollständig mit OTC-Einbettmedium gefüllt, die Position des rechten Vorhofs markiert und eingefroren. Nach dem vollständigen Einfrieren wurde die Alufolie entfernt und das eingebettete Herz im Kryostaten (CM3050 S, Leica) auf einem dafür vorgesehenen Metallträger eingefroren und in drei Gefrierschritten mit weiterem OTC-Medium umhüllt. Nach der groben Annäherung an das eingebettete Gewebe wurden ventrikuläre Querschnitte in 8 µm Dicke hergestellt und auf Glas-Objektträger (SuperFrost^{*} Plus, Menzel-Gläser, Thermo Scientific) aufgezogen. Nach der Trocknung von mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Schnitte bis zur Weiterverwendung bei -20 °C aufbewahrt.

3.7.2 Hämatoxylin und Eosin Färbung

Die Schnitte wurden vor der Färbung 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Dann folgten Waschschritte in einer aufsteigenden und absteigenden Alkoholreihe für jeweils 2 Min mit 50, 70, 90, 100, 100, 90, 70, 50 % (v/v) unvergälltem Ethanol in Millipore Reinstwasser. Im Anschluss wurde dreimal für je 2 Minuten in Millipore Wasser gewaschen. Dann wurden die Schnitte für 20 Sekunden in Hämatoxylin Lösung (Hämatoxylinlösung nach Harris) getaucht und unmittelbar danach zweimal für je 2 Minuten in Leitungswasser gewaschen. Die Objektträger mit den Schnitten wurden danach für 20 Sekunden in 0,1 % Ammoniak getaucht und anschließend für 5 Minuten in Leitungswasser gewaschen. Darauf folgte die Eosin-Färbung für 30 Minuten in 0,1 % Eosinlösung (0.1% Eosin G in Millipore Wasser; pH 4,5 mit einigen Tropfen Essigsäure eingestellt) lichtgeschützt abgedeckt unter eine Schicht Alufolie gefolgt von fünf Waschschritten für je 2 Minuten in Leitungswasser. Die Schnitte wurden anschließend dehydriert in 80 % Ethanol für 2 Minuten, 100 % Ethanol für 3 Minuten und 100 % Toluol für 5 Minuten. Nach einigen Minuten Trocknungszeit wurde auf die Schnitte pro Objektträger 400 µl Eindeckmittel Entellan[®] gegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Nach der Trocknung über Nacht wurden mit einem Stereomikroskop (SZX7, Olympus) und der cellSens 2.3 Software mit einem 10x Objektiv und mit einer 1,0x Linse Fotos von den Schnitten gemacht.

3.7.3 Fibrosierungsfärbung mit Sirius red / Fast green

Die Schnitte wurden vor der Färbung 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Dann wurden die Objektträger für 24 Stunden bei Raumtemperatur in Bouin Fixierlösung inkubiert und anschließend die gelbe Farbe unter fließendem Leitungswasser in einem Färbeglaskasten für 10 Minuten ausgewaschen. Die erste Färbung erfolgte mit 0,1 % Fast green (F7252, Sigma-Aldrich) gelöst in Millipore Wasser für 30 Minuten unter einer Abdeckung aus Alufolie zum Schutz vor Licht. Es folgten Spülschritte in 1 % Essigsäure für 1 Minute bei Raumtemperatur und unter fließendem Leitungswasser für 5 Minuten. Die zweite Färbung erfolgte in 0,1 % Sirius red (365548, Sigma-Aldrich) gelöst in Millipore Wasser für 30 Minuten ebenfalls unter einer Abdeckung aus Alufolie zum Schutz vor Licht. Die Schnitte wurden anschließend dehydriert in 70 % Ethanol für 10 Sekunden, 100 % Ethanol für 1 Minute und 100 % Toluol für 3 Minuten. Nach einigen Minuten Trocknungszeit wurde auf die Schnitte pro Objektträger 400 µl Eindeckmittel Entellan^{*} gegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Nach der Trocknung über Nacht wurden mit einem Stereomikroskop (SZX7, Olympus) und der cellSens 2.3 Software mit einem 10x Objektiv und einer 1,0x Linse für die Querschnitte bzw. einer 1,6x Linse für die Vergrößerungen Fotos von den Schnitten gemacht.

3.8 Immunhistochemische Untersuchung von Sinusknoten-präparaten

Diese Methode wurde mit Hilfe eines Kooperationspartners und dem Besuch des Gastwissenschaftlers Audrys G. Pauža optimiert und wurde ein wesentlicher Bestandteil der Masterarbeit von René D. Rötzer.

3.8.1 Sinusknotenpräparation

Die Herzen von drei Monate alten WT- und HCN4FEA-Mäusen wurden wie in Kapitel 4.1.1 präpariert und wie in Kapitel 4.1.2 für die Herstellung von gelatinegefüllten Herzpräparationen mit PBS gespült und entnommen, ohne jedoch eine Perfusion mit Gelatinelösung durchzuführen. Für die immunhistochemischen Färbungen ganzer Sinusknoten wurde das Herz analog zur Methode in Kapitel 4.1.3 für die Erstellung von whole-mount-Präparationen seziert mit dem Unterschied, dass eine biatriale Präparation vorgenommen wurde. Dafür wurde lediglich der dritte Schnitt anstatt entlang des interatrialen Septums in Richtung der Vena cardiaca magna gesetzt und bis zum Stamm der Vena cava superior unter dem nach oben geklappten linken Vorhof verlängert. Die biatriale Sinusknotenpräparation wurde dann möglichst planar mit der epikardialen Seite nach oben mit Minutiennadeln in eine kleine Sylgard[®]-beschichtete Petrischale gepinnt, die mit PBS gefüllt war. Für die Herstellung von Sinusknotenquerschnitten wurde das gespülte Herz entnommen und wie in Kapitel 4.1.4 Sektion des Sinusknotens mit ungefähr 1 mm umgebendem Gewebe präpariert. Das Präparat wurde dann in eine mit PBS gefüllte Sylgard[®]-beschichtete Petrischale flach gepinnt, ohne den Sinusknoten selbst zu verletzen oder zu dehnen.

3.8.2 Herstellung von Sinusknotenquerschnitten

Das PBS in der kleinen Petrischale mit dem Präparat wurde verworfen und der Sinusknoten stattdessen in 4% PFA für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler fixiert. Dann folgte ein Waschschritt für 10 Minuten in PBS, was mit einer 25 % Saccharoselösung getauscht und anschließend für zwei Stunden auf dem Schüttler inkubiert wurde. Nun sollte der Sinusknoten nach dem Entfernen der Minutiennadeln von selbst in der Lösung absinken. Auf einem 3x3 cm großen Stück Alufolie wurde der Sinusknoten in einen vorgelegten Tropfen mit OTC-Einbettmedium (Tissue Tek, Sakura Finetek) gelegt und die Orientierung von *Head-* und *Tail-*Region markiert. Das Präparat wurde dann im Kryostaten (CM3050 S, Leica) auf einem dafür vorgesehenen Metallträger eingefroren und in drei Gefrierschritten mit weiterem OTC-Medium umhüllt. Nach der groben Annäherung an das eingebettete Gewebe wurden Sinusknotenquerschnitte in 12 µm Dicke hergestellt und auf Glas-Objektträger (SuperFrost^{*} Plus, Menzel-Gläser, Thermo Scientific) mit Zuordnung zu *Head-, Body-* und *Tail-*Region aufgezogen. Nach der Trocknung von mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Schnitte bis zur Weiterverwendung bei -20 °C aufbewahrt.

3.8.3 Immunhistochemische Färbungen

Das PBS in den Schälchen mit dem biatrialen Sinusknotenpräparat wurde verworfen und anschließend mit 10 ml 4% PFA für 15 Minuten unter dem Abzug bei Raumtemperatur fixiert. Es folgte ein Waschschritt mit PBS für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur.

Sowohl die Objektträger mit den Querschnitten wie auch die ganzen Sinusknoten wurden für 1 bis 1,5 Stunden auf dem Wippschüttler mit Permeabilisierungslösung (20 % DMSO, 0,5 % Triton X-100 in PBS) inkubiert und anschließend dreimal mit PBS für jeweils 10 Minuten gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Bindestellen wurde anschließend mit 5 % normalem Eselserum (NDS) mit 300 µl pro Sinusknoten und 400 µl pro Deckglas für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler durchgeführt, gefolgt von drei Waschschritten mit PBS. Die Primärantikörper gegen HCN1 und HCN4 (siehe Tabelle 11) wurden 1:200 in PBS angesetzt. Das PBS wurde verworfen und 150 µl Primärantikörpergemisch pro Sinusknoten bzw. 400 µl je Objektträger mit Sinusknotenquerschnitten auf das Gewebe pipettiert. Die Färbung erfolgte über Nacht in einem befeuchteten, geschlossenen Gefäß auf dem Kippschüttler im Kühlraum bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde dreimal mit PBS für je 10 Min bei Raumtemperatur gewaschen und die Sekundärantikörperlösung in PBS (FITC und Cy3, siehe Tabelle 11) vorbereitet. Nach dem Verwerfen des PBS wurde je nach Präparat wieder dasselbe Volumen Sekundärantikörperlösung für 4 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler

inkubiert. Es folgten drei Waschschritte mit PBS für je 10 Minuten. Unter neuem PBS wurden bei minimaler Lichtintensität des Mikroskops Staubpartikel und überschüssiges Gewebe entfernt. Im Fall der ganzen Sinusknotenpräparate wurde der Sinusknoten auf einen Objektträger überführt und vorsichtig mit der Pinzette Unebenheiten ausgeglichen, sodass der Sinusknoten möglichst flach auflag, ohne ihn jedoch zu dehnen. Die Schnitte und die Sinusknotenpräparate wurden dann mit mounting-Medium bedeckt (Vectashield, Vector Laboratories) und ein Deckglas daraufgelegt. Die Lücken wurden mit mounting-Medium gefüllt und die Ränder ringsum mit durchsichtigem Nagellack versiegelt.

Tabelle 11 - Primär- und Sekundärantikörper der immunhistochemischen Färbungen.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Guinea pig anti-HCN4	1:200	Alamone Labs	AGP-004
Rabbit anti-HCN1	1:200	Alamone Labs	APC-056
Cy3 donkey anti-rabbit IgG	1:400	Merck Millipore	AP182C
FITC donkey anti-guinea pig IgG	1:100	Merck Millipore	AP193F

3.8.4 Konfokalmikroskopie

Die ganzen Sinusknotenpräparate und die Sinusknotenquerschnitte wurden an einem inversen Konfokalmikroskop (TCS-SP8, Leica) mit einer 10x Vergrößerung (Detailaufnahmen Sinusknoten 40x mit Ölimmersion) aufgenommen für HCN4 mit FITC (grün) bei der Wellenlänge λ = 488 nm und HCN1 mit Cy3 (rot) bei der Wellenlänge λ = 561 nm. Für alle Aufnahmen wurden dieselben Parametereinstellungen verwendet.

3.9 Elektrophysiologische Untersuchungen von whole-mount-Präparationen und isolierten Sinusknotenzellen

Die beiden Methoden wurden am selben Messstand durchgeführt, jedoch unter Verwendung unterschiedlicher Verstärker. Die dafür notwendigen Materialien sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Bezeichnung	Hersteller		
Laborausstattung und Verbrauchsmaterial			
Mikroskop Axiovert 135 TV	Carl Zeiss		
Kamera AxioCam color MR	Carl Zeiss		
AxioVision Software	Carl Zeiss		
Mess- und Perfusionskammer RC-26GLP	Warner Instruments, Art Nr. 64-0236		
Glas Deckgläser CS-22/40 (22 x 40 mm)	Warner Instruments, Art Nr. 64-0707		
Zeiss Mikroskoptisch Adapter SA20-LZ (16.5 x 10 cm)	Warner Instruments, Art Nr. 64-2413		
PH-1 Plattform für Serie 20 Kammern + Heizelement	Warner Instruments, Art Nr. 64-0284		
Temperatur Controller TC344B	Warner Instruments		
SHM-6 Sechsfach in-line Lösungsheizelement	Harvard Apparatus; Art Nr. 640104		
Polyethylen Schlauch PE-160/10	Warner Instruments, Art Nr. 64-0755		
MPII Mini-Peristaltikpumpe	Harvard Apparatus, Art Nr. 702027		
HEKA Patch Camp Verstärker, EPC10 USB single	HEKA Elektronik, Art Nr. EPC 10 USB		
IX2-700 Dual Intracellular Mikroelektrodenverstärker	Dagan Corporation		
mit Standard-Headstage			
Axon Instruments Digidata 1440A	Molecular Devices		
Mikromanipulator LN Mini-25XR	Luigs & Neumann		
DMZ Universalpuller	Zeitz Instruments		
Borosilikat Glaskapillaren GC150TF-8 für Pipetten mit	Harvard Apparatus		
2-3 $M\Omega$ Widerstand für Patch Clamp Experimente			
Borosilikat Glaskapillaren BM150F-10P für	BioMedical Instruments, Art Nr. 10718		
Mikroelektroden mit 20-30 M Ω Widerstand			
Microfil [®] Kanüle (28G/67 mm lang)	World Precision Instruments, Art Nr.		
	MF28G67-5		
Spritze (1 ml)	Terumo, Art Nr. 6SS01T		
Spritzenfilter, steril (Korngröße 0,2 μm)	VWR, Art Nr. 10708S1G43BD		

Tabelle 12 – Materialien für die elektrophysiologischen Untersuchungen.

3.9.1 Patch-Clamp-Messungen mit isolierten Sinusknotenzellen

Für die Patch-Clamp-Messungen wurde ein EPC10 USB single Verstärker (HEKA Elektronik) mit der PatchMaster Software Version 2x73.5 verwendet. Die Analyse wurde offline mit Origin 2015 (Origin Lab) durchgeführt. Die Temperatur in der Messkammer betrug 31-33 °C während den Messungen und wurde über das integrierte Heizelement mit angeschlossenem Temperatursensor in der Badlösung automatisch reguliert. Die verwendeten Glaspipetten wurden kurz vor den Experimenten hergestellt und wiesen für die voltage-clamp-Messungen einen Widerstand von 2-3 M Ω auf. Die Zusammensetzung der verwendeten intrazellulären und extrazellulären Lösungen ist in Tabelle 13 notiert. Für Messungen mit exogenem cAMP wurde der intrazellulären Lösung 100 µM cAMP hinzugegeben und der pH-Wert mit KOH wieder eingestellt. Die Füllung der Glaspipetten erfolgte mit einer 1 ml Spritze mit Spritzenfilter und einer flexiblen Microfil[®] Kanüle. Zum Schutz vor Licht wurde die Spritze mit Filter in Alufolie verpackt.

Intrazelluläre Lösung		Extrazelluläre Lösung	
Kalium Aspartat	90 mM	NaCl	140 mM
NaCl	10 mM	КСІ	5,4 mM
MgCl ₂	2 mM	MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	2 mM	CaCl ₂	1 mM
EGTA	5 mM	CdCl ₂	0,3 mM
Mg ₂ -ATP	2 mM	BaCl ₂	2 mM
Na-GTP	0,1 mM	HEPES	5 mM
Kreatinphosphat	5 mM	Glukose	5 mM
	pH 7,2 mit KOH		pH 7,4 mit NaOH

Tabelle 13 -	l ösungen i	für die Pa	tch Clamp	Fxnerimente	mit Sinusknoten	Finzelzellen.
rubene 15 i	Losungen	jui uic i u	cen erannp	Experimente	init SindSkiloten	LINZCIZCIICII.

Im Patch-Experiment wurde kurz nach Erreichen des cell-attached-Modus ein Foto der Zelle aufgenommen. Nach dem Sealing (alle ausgewerteten Zellen >1 G Ω) in whole-cell-Konfiguration wurden mit voltage-clamp-Messungen stabile I_h-Stromantworten hervorgerufen und damit Gleichgewichtsaktivierungskurven aufgenommen. Dafür wurde ausgehend vom Haltepotential (V_m = -40 mV) für 4,5 Sekunden zu hyperpolarisierenden Spannungen gesprungen. Das Pulsprotokoll umfasste zwölf Durchgänge von -150 mV bis -40 mV in 10 mV-Schritten (Pulsintervall 20 Sekunden), jeweils gefolgte von einem 500 ms-Schritt bei -150 mV und zurück zum Haltepotential. Bei den Messungen wurde eine Korrektur des linearen Leckstroms vorgenommen. Für die Bestimmung der maximalen Stromamplitude wurde jeweils die erste Stromspur mit dem Sprung zu -150 mV ausgewertet. Für die Stromdichte wurden die Fotos der Zellen verwendet und mit der Image J Software die Oberfläche der gemessenen Zellen bestimmt und darauf die maximale Stromantwort normiert als Werte mit der Einheit $pA/\mu m^2$.

3.9.2 Mikroelektrodenmessungen an whole-mount-Präparationen des Sinusknotens

Die in Kapitel 4.1.3 beschriebenen whole-mount-Präparationen wurden für die Messungen direkt auf eine Sylgard^{*}-beschichtete Messkammer mit Minutiennadeln und der endokardialen Seite nach oben gepinnt und kontinuierlich mit Tyrode III Lösung perfundiert. Für die Mikroelektrodenmessungen wurde ein IX2-700 Mikroelektrodenvorverstärker (Dagan Corporation) verwendet, die Signale mit einem Digidata 1440A (Axon Instruments) digitalisiert und mit der pClamp Software (Axon Instruments) Clampex 10.2 aufgenommen. Die Analyse erfolgte offline mit pClamp Clampfit 10.2 und Origin 2015 (Origin Lab). Die Temperatur in der Messkammer betrug 31-33 °C und auch die Perfusionslösung wurde mit dem in-line Heizelement vor der Messkammer temperiert. Als intrazelluläre Lösung wurde 3M KCI in autoklaviertem Millipore Wasser verwendet.

Das Isoprenalin (Merck, Art Nr. 5627) wurde in Tyrode III gelöst und in ansteigenden Konzentrationen (0,1 nM und 1 μ M) über das Mehrkanalperfusionssystem in die Messkammer auf den Sinusknoten appliziert und währenddessen kontinuierlich aufgenommen. Die Schlagfrequenz der Sinusknotenpräparate wurde jeweils für einen stabilen Abschnitt unter basalen Bedingungen oder nach dem Einwaschen des Isoprenalins in einem 30 Sekunden-Intervall bestimmt und auf die Frequenz pro Minute umgerechnet.
4 Ergebnisse

Im Rahmen von anatomischen, molekularbiologischen und elektrophysiologischen Untersuchungen sollten die Eigenschaften Sinusknotens sowie des Schrittmacherkanals HCN4 des HCN4FEA-Mausmodells charakterisiert werden.

Im Rahmen der hier formulierten Promotionsarbeit habe ich in-vitro-Präparationsmethoden *de novo* etabliert und optimiert, die sowohl eine präzise Lokalisation und anatomische Darstellung des Sinusknotens wie auch die reproduzierbare Präparation von kardialem Gewebe und Zellen ermöglichen. Diese Etablierungsarbeiten sind daher die Ergebnisse meiner Arbeit und werden dementsprechend im Ergebnis- und nicht im Methodenteil dargestellt.

Die neuen Methoden wurden verwendet, um potenzielle Unterschiede zwischen WT-Mäusen und dem HCN4FEA-Mausmodell zu untersuchen.

4.1 In-vitro-Präparationen für anatomische Studien, Experimente mit wholemount Sektionen des Sinusknotens und Isolation von Sinusknoten-Einzelzellen

In den folgenden Abschnitten werden die Einzelschritte der Präparationen dargestellt, die notwendig waren, um optimale Ergebnisse sowohl bei der Auffindung der Zielregion des Sinusknotens als auch der Sektion der entsprechenden Herzgewebeabschnitte zu erhalten (Fenske et al.^[18]).

Die durchgeführten Experimente erfolgten gemäß den gesetzlichen Richtlinien zu Organentnahmen von Versuchstieren und wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt. Es wurden Anstrengungen unternommen die Anzahl der verwendeten Mäuse so gering wie möglich zu halten.

4.1.1 Sektion der Maus und Präparation des Herzens

Das Versuchstier wurde mit einer Inhalationsnarkose mit 5% Isofluran in Carbogen (95% O₂ / 5% CO₂) anästhesiert und mittels zervikaler Dislokation getötet. Direkt im Anschluss wurde die Maus mit einer Mayoschere dekapitiert, um Blut aus dem Kreislauf zu entfernen und möglichen Einblutungen im Thorax während der Präparation vorzubeugen. Die Maus wurde wie in Abbildung 6 zu sehen ist in Rückenlage mit medizinischem Klebeband an Armen und Beinen fixiert und der Brustkorb mit 70%(v/v) Ethanol desinfiziert. Mit einer stumpfen Pipette wurde die Haut auf der Höhe des Sternums gegriffen und ein 1 cm langer kaudaler, transversaler Schnitt mit einer Irisschere gesetzt und die Haut kranial und kaudal auseinandergezogen (Abbildung 6 a). Am Sternum haltend wurde 2 mm kaudal das Peritoneum lateral mit einem jeweils 2-3 cm langen Schnitt eröffnet (Abbildung 6b). Die Leber und die anderen abdominalen Organe wurden möglichst weit kaudal weggeschoben, um freien Zugang zum Zwerchfell zu erhalten (Abbildung 6 c). Das Zwerchfell wurde entlang des Thorax durchschnitten und

der Brustkorb beidseitig an der lateralen Wand der Rippenbögen bis zum Schlüsselbein vorsichtig aufgetrennt, ohne das Herz und die Blutgefäße zu verletzen (Abbildung 6 c-e). Dafür wurden die Lungenflügel jeweils beiseitegeschoben. Um ein frei zugängliches Präparationsfeld zu haben, wurde das Sternum mit einem Halsey-Nadelhalter gefasst, welcher kranial abgelegt wurde (Abbildung 6 f oben).

Abhängig vom Ziel der Präparation folgten verschiedene weitere Schritte, die entweder die Entnahme des Herzens oder eine in-situ-Perfusion des Herzens folgen ließ. Für eine whole-mount-Präparation oder die Isolation des Sinusknotens wurde das Herz mit einer stumpfen Pinzette am Apex gegriffen und angehoben, ohne Herz und Gefäße zu dehnen (Abbildung 6 f). Mit einer gebogenen Irisschere wurden dann die kardialen Blutgefäße und das Gewebe des hinteren Mediastinums durchtrennt, sodass das Herz als Ganzes mit möglichst langen Gefäßabschnitten entnommen werden konnte.



Abbildung 6 - Sektion der Maus und Präparation des Herzens. (a) Transversaler Schnitt vom linken zum rechten Rippenbogen; (b) transversaler Schnitt durch das Peritoneum; (c) und (d) Eröffnung des Zwerchfells entlang der Rippen für den Zugang zum Thorax; (e) Öffnung des Brustkorbs beidseitig an der lateralen Wand der Rippenbögen bis zum Schlüsselbein; (f) Entnahme des Herzens; (g) Beginn der Perfusion der Maus mit PBS gefolgt von Gelatinelösung mit einer Flügelkanüle im linken Ventrikel, um das Herz mit leichtem Druck zu füllen; (h) Erfolgreiche Gelatine Perfusion mit bleichen Organen, speziell die Farbe der Leber von zuvor dunkelrot zu hell. Sichtbare Einschnitte in den Leberlappen dienen der besseren Spülung.^[18]

4.1.2 Anatomische Studien zur Lokalisation des Sinusknotens

Die größte Hürde bei der Präparation eines Herzens ist die Tatsache, dass es sich um ein Hohlorgan handelt, dessen strukturelle Integrität auf der Füllung mit Blut und dem vorherrschenden Perfusionsdruck beruht, der die in-vivo-Anatomie aufrechterhält. *In vitro* sinkt der Blutdruck auf null, im Speziellen die Vorhöfe verlieren *ex vivo* aufgrund der dünnen Wandstärken ihre Struktur, sodass insbesondere die dünnen Pulmonal- und Hohlvenen kollabieren und nicht gut erkennbar sind. Dies erschwert das Auffinden des Sinusknotens im Bereich zwischen der unteren und oberen Hohlvene und generell von charakteristischen anatomischen Orientierungspunkten. Ein Ziel war es deshalb, mit einer anatomischen Studie optimale Demonstrationsmodelle zu generieren, die es ermöglichten, den Sinusknoten und andere typische anatomische Orientierungspunkte sichtbar zu machen. Dafür wurden die Herzen entweder mit Gelatine oder einem speziellen Epoxidharz gefüllt, wobei die genauen Schritte im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

Für diese Präparation wurden 50 ml PBS bei Raumtemperatur sowie eine Spritze mit 5 ml eiskaltem PBS vorbereitet sowie entweder 50 ml Gelatinelösung (auf 37 °C temperiert) oder 30 ml des vasQtec PU4II Kits (Ansatz Epoxidharz und Härter nach Herstellervorgaben).

Die Sektion der Maus und die Freilegung des Herzens erfolgte wie im vorigen Kapitel beschrieben. Anstatt das Herz zu entnehmen, wurde jedoch eine Flügelkanüle in den linken Ventrikel eingeführt (Abbildung 6 g) und die Leberlappen für eine gründlichere Auswaschung des Blutes mehrfach eingeschnitten (Abbildung 6 h). Dann wurde das Herz mit einer an die Kanüle angeschlossenen Perfusionspumpe mit konstantem Fluss von 4 ml/min zunächst mit PBS (auf Raumtemperatur) gespült, bis das Blut ausgewaschen war. Dies dauerte circa 3 bis 4 Minuten, wobei der beste Indikator für eine erfolgreiche Perfusion die verblassenden Organe - vor allem die Leber – waren, wie im Vergleich von Abbildung 6 g und h deutlich zu sehen ist. Daraufhin erfolgte der Wechsel der Lösung in der Perfusionspumpe entweder zur warmen Gelatinelösung oder zum vorbereiteten vasQtec kit. Mit dem Druck der Perfusionspumpe wurden dann jeweils beide Atrien und beide Ventrikel mit der entsprechenden Lösung in situ befüllt, bis die kollabierten Gefäße und Atrien wieder ihre ursprüngliche Form erreichten. Die Atrien und der rechte Ventrikel wurden dafür nicht einzeln kanüliert, sondern der Zugang zu diesen Kompartimenten erfolgte intrakardial, sodass keine weitere Einstichstelle und somit kein Volumenverlust bis zur Verfestigung stattfinden konnte. Dies dauerte circa 3 Minuten, wobei insbesondere gegen Ende eine Überfüllung und somit unphysiologische Aufdehnung der Atrien vermieden werden musste. Bei der Epoxidharz-Methode konnte die Flügelkanüle direkt entfernt werden und das befüllte Präparat kam zur Aushärtung bei 4 °C in den Kühlraum. Bei der Gelatinelösung wurde nach erreichter Befüllung nur die Pumpe abgestellt, aber die Flügelkanüle im linken Ventrikel belassen. Das Herz sowie insbesondere der Bereich um die Einstichstelle wurden mit 5 ml eiskaltem PBS begossen. Erst dann wurde die Kanüle entfernt und die ganze Maus für mindestens 1,5 Stunden bei 4 °C gekühlt, bis die Gelatine fest war. Nach der vollständigen Verfestigung wurde das Herz mit einer feinen, gebogenen Irisschere entfernt, wobei darauf zu achten war, dass möglichst lange Arterien und Venen am Herz verblieben.

Die Feinpräparation erfolgte unter einem Auflicht-Stereo-Mikroskop in einer mit Sylgard[®] beschichteten Petrischale, die mit PBS bei Raumtemperatur gefüllt war. Das Herz wurde darin mit Minutiennadeln, feinsten Edelstahlnadeln mit 0,1 mm Durchmesser und 1 cm Länge, durch den Apex

am Boden festgepinnt. Schritt für Schritt wurde dann mit feinen Pinzetten und einer Vannas-Federschere das Perikard entfernt, die noch verbundenen Lungenflügelstücke abgeschnitten, die Pulmonalarterien gekürzt und anhaftendes mediastinales Fett vorsichtig abgenommen.

Beispielhafte Ergebnisse der beiden Präparationsmethoden für anatomische Studien sind im Vergleich mit einer regulären Präparation in Abbildung 7 zu sehen. Die Bilder der oberen Reihe (a, b, c) stammen von einer Gelatinepräparation, die Bilder der mittleren Reihe (d, e, f) wurden mit einem Epoxidharz-Präparat erstellt, die untere Reihe (g, h, i) zeigt Fotos einer regulären Präparation, wie sie für reguläre elektrophysiologische Experimente verwendet wird.

Die erste Spalte (Abbildung 7 a, d, g) beinhaltet jeweils eine posteriore Ansicht der Herzbasis. Verglichen mit dem ungefüllten Herz wurde sowohl bei der Gelatinelösung als auch beim Epoxidharz-Kit das Ziel erreicht, die instabilen Strukturen von Atrien und Gefäßen dreidimensional zu erhalten. Das Erscheinungsbild des Gelatinepräparats spiegelte jedoch noch deutlicher den nativen, physiologischen Zustand wider und war damit als anatomisches Demonstrationsmodell geeigneter als das Präparat, das mit dem Epoxidharz-Kit hergestellt wurde.

Die mittlere Spalte (b, e, h) von Abbildung 7 zeigt jeweils eine Vergrößerung der Sinusknotenregion. Die Lage zwischen der oberen Hohlvene (Vena cava superior) und dem Sulcus terminalis wurde mit der Sinusknotenarterie als typischer Orientierungspunkt in beiden Präparationen der anatomischen Studie klar erkennbar, wobei sich das blau gefärbte Epoxidharz gegenüber der farblosen Gelatinelösung deutlicher abzeichnete. Das gilt auch für die Sichtbarkeit der Sinusknotenarterie in den Darstellungen der rechten Spalte (c, f, i) von Abbildung 7, die jeweils eine whole-mount-Präparation zeigt, wie sie für Mikroelektroden- Messungen verwendet werden. Obwohl sich die Sinusknotenarterie in blau deutlicher abzeichnet, sind die Strukturen des umgebenden Gewebes - im speziellen des rechten Herzohres - in der Epoxidharz-Präparation fast vollständig zerfallen. Beim Gelatinepräparat sind hingegen die Feinstrukturen des rechten Atriums und Herzohrs mit den Musculi pectinati, die als Muskelstränge mit ausgeprägtem Relief der Crista terminalis entspringen, weitgehend erhalten.



Abbildung 7 – Anatomische Lokalisation des Sinusknotens und whole-mount-Sinusknoten-Präparationen mit Gelatinelösung (a-c), vasQtec Epoxidharz kit (d-f) und reguläre Präparationen wie sie für Experimente verwendet werden. Herzansicht posterior (a, d, g), Vergrößerung des Sinusknotens (b, e, h) und whole-mount-Sinusknoten-Präparate (c, f, i). SNA, Sinusknotenarterie; SVC, Vena cava superior; LSVC, linke Vena cava superior; IVC, Vena cava inferior; RAA, rechtes Herzohr; AO, Aorta; PA, Pulmonalarterie; PV, Pulmonalvene; ST, Sulcus terminalis; CT, Crista terminalis; RV, rechter Ventrikel; LV, linker Ventrikel. Weiße und schwarze Pfeile kennzeichnen den Verlauf der SNA. Maßstabsbalken (weiß) 0,5 mm.

Ergebnisse

Diese Strukturen sind bei der Präparationsmethode aufgrund der dünnen Wandstärke und der transparenten Füllung mit Gelatine auch von außen sichtbar, wie bei beiden Atrien in Abbildung 8 eindrücklich erkennbar ist. Zudem werden Arterien und Venen gut unterscheidbar, da die Aorta und alle davon abzweigenden Arterien vollständig mit Gelatine gefüllt wurden. Auch ein Abschnitt der rechten Koronararterie zeichnet sich deutlich durch die Herzwand des rechten Ventrikels ab, welche in zwei Drittel der Herzen die Sinusknotenarterie speist ^[13]. Die Hohlvenen, die das Blut aus dem Körper in den rechten Vorhof transportieren, wurden jedoch nicht vollständig gespült und weisen rote Reste von Blut auf (auch in Abbildung 7 a).



Abbildung 8 – Ventrale Ansicht der Herzbasis eines mit Gelatine gefüllten Herzens. Ao, Aorta; LCA, linke Arteria carotis; RCA, rechte Arteria carotis; PT, Truncus pulmonalis; RSA, Rechte Arteria subclavia; LAA, Linkes Herzohr; RAA, rechtes Herzohr; LV, linker Ventrikel; RV, rechter Ventrikel. Maßstabsbalken (weiß) 1 mm.^[18]

Aufgrund der Vorteile der Präparationsmethode mit Gelatinefüllung wurden alle weiteren anatomischen Demonstrationsmodelle damit erstellt und auf die parallele Verwendung des Epoxidharz-Kits verzichtet.

4.1.3 Erstellung von whole-mount-Präparaten

Die whole-mount-Präparation des Sinusknotens wurde verwendet, um damit Mikroelektrodenmessungen durchzuführen, deren Ergebnisse in Kapitel 4.3.2 zu sehen sind. Die Anforderungen dafür an die Präparation waren nicht nur, einen intakten Sinusknoten mit umgebendem Gewebe (rechter Vorhof, Vena cava superior und Vena cava inferior) zu erhalten, sondern dies auch in kurzer Zeit zu tun. Der effektivste Weg wird im folgenden Abschnitt beschrieben, was mit einem gelatinegefüllten Präparat in Abbildung 9 visualisiert wurde.



Abbildung 9 - Sektion eines mit Gelatine perfundierten Herzens für eine whole-mount-Sinusknoten (SAN)-Präparation. (a) Dorsale Herzansicht nach der Feinpräparation. Die weiß gestrichelte Linie zeigt den Verlauf des ersten Schnitts entlang des Sulcus coronarius. Für den zweiten Schnitt (gelb gestrichelte Linie) wurde nach dem Wegklappen des rechten Atriums weiter entlang des Sulcus coronarius bis zum Stamm der SVC geschnitten. Der dritte Schnitt (schwarze gestrichelte Linie) wurde leicht links von der IVC entlang des interatrialen Septums bis zum Stamm der SVC gesetzt. Die whole-mount-Präparation wurde durch einen Verbindungsschnitt (rote gestrichelte Linie) zwischen dem Stamm der Aorta und dem Stamm der SVC freigestellt. SVC, Vena cava superior; IVC, Vena cava inferior, PV, Pulmonalvene; RAA, Rechtes Herzohr; LV, linker Ventrikel; RV, rechter Ventrikel; Ao, Aorta; (b) Der erste Schnitt wurde mit weißen Pfeilen markiert; (c) Der letzte Verbindungsschnitt trennt das whole-mount-SAN-Präparat vom Herz; (d) Herz und whole-mount-Präparation. Maßstabsbalken (weiß) 1 mm.^[18]

Wie im vorigen Kapitel beschrieben wurde das Herz entnommen und in einer mit Tyrode III gefüllten, Sylgard[®]-beschichteten Petrischale am Apex fixiert. Die Feinpräparation unter dem Stereomikroskop legte die Sinusknotenregion frei, wie in Abbildung 9 (a) gezeigt.

Der erste Schnitt für die whole-mount-Präparation ging entlang des Sulcus coronarius beginnend unterhalb der Vena cava inferior bis zum rechten Vorhof, was in Abbildung 9 (a) mit der weiß gestrichelten Linie mit der Bezeichnung 1 abgebildet wurde. Der Schnitt selbst wurde in Abbildung 9 (b) mit weißen Pfeilen markiert. Für den zweiten Schnitt wurde der rechte Vorhof nach oben weggeklappt und weiter entlang des Sulcus coronarius bis zum Stamm der Vena cava superior geschnitten (Abbildung 9 (a), gelbe gestrichelte Linie bezeichnet mit 2). Der dritte große Schnitt erfolgte ausgehend vom Startpunkt leicht links der Vena cava inferior entlang des interatrialen Septums bis zum Stamm der Vena cava superior (Abbildung 9 (a), schwarze gestrichelte Linie bezeichnet mit 3). Diese beiden Schnitte lagen unter dem rechten Atrium bzw. hinter der Vana cava inferior, weshalb diese so nicht sichtbar sind. Das whole-mount-Präparat konnte mit einem letzten Verbindungsschnitt freigelegt werden, der zwischen dem Stamm der Vena cava superior und dem Stamm der Aorta verlief, wie in Abbildung 9 (a) eingezeichnet ist, mit der roten gestrichelten Linie bezeichnet mit 4. Abbildung 9 (c) und (d) zeigen die zurückbleibende Herzbasis und das Herz mit der isolierten whole-mount-Präparation.

Der Sinusknoten wurde dann mit einer feinen Pinzette in eine Sylgard[®]-beschichtete Kammer überführt, die mit Tyrode III Lösung bei Raumtemperatur gefüllt war. Dort wurde das whole-mount-Präparat mit der endokardialen Seite nach oben mit 4-7 Minutiennadeln festgepinnt, wie in Abbildung 10 mit einer gelatinegefüllten whole-mount-Präparation exemplarisch gezeigt wird. Die Orientierung wurde so gewählt, dass der Sinusknoten mit den Mikroelektroden gut zugänglich war und keine der Minutiennadeln in den relevanten Bereich hineinragten. Um das Präparat möglichst wenig zu beschädigen und Spielraum für eine stabile Messung mit den Mikroelektroden trotz regelmäßigen Kontraktionen zu erhalten, sollte der Sinusknoten nicht gedehnt und ohne Spannung fixiert werden.

Qualitätskriterien für eine gute Präparation waren eine unbeschädigte Crista terminalis und intakte Musculi pectinati sowie das Vorhandensein des Stammes der Vena cava superior von mindestens 0,2 mm. Zeitlich sollten zwischen dem Tod der Maus und dem Festpinnen des fertigen whole-mount-Präparats weniger als 10 Minuten vergehen. Daraus resultierten Experimente mit Sinusknoten, die bis zu einer Stunde regelmäßig schlugen und kontrahierten.

45



Abbildung 10 - Whole-mount-Präparation eines Sinusknotens in endokardialer Ansicht nach oben mit rechtem Atrium (links) und Sinusknotenarterie (Verlauf zwischen den weißen Pfeilen). Der erhaltene Abschnitt der Vena cava inferior ist noch mit Gelatine gefüllt; Maßstabsbalken (weiß) 0,5 mm.

4.1.4 Sektion des Sinusknotens

Die Sinusknotenpräparation war die Grundlage für eine Vielzahl von Untersuchungen, zum Beispiel für den Vergleich der Proteinexpression von HCN-Schrittmacherkanälen von WT- und HCN4FEA-Mäusen oder für die elektrophysiologische Charakterisierung von SAN-Einzelzellen nach enzymatischem Verdau des Sinusknotens. Im Folgenden werden die Einzelschritte anhand von Abbildungen eines regulär präparierten und eines gelatinegefüllten Herzens erläutert.

Wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben wurde das Herz entnommen und in einer mit Tyrode III (37 °C) gefüllten, Sylgard^{*}-beschichteten Petrischale am Apex mit einer 26G Nadel fixiert. So schnell wie möglich wurden unter dem Stereomikroskop Fettanlagerungen, das Perikard sowie alle Lungenreste, Thymus und Gefäße entfernt, wie in Abbildung 11 a und b an einem regulären Präparat zu sehen ist. Die damit freigelegte Sinusknotenregion ist im regulären Präparat in Abbildung 11 c zu sehen und im gelatinegefüllten Herz in Abbildung 12 a. Der Sinusknoten wird lateral zur rechten Seite vom Sulcus terminalis begrenzt und kranial von der Vena cava superior. Die Sinusknotenarterie, die mittig entlang der Längsachse in Richtung der Vena cava inferior verläuft, war in der regulären Präparation nicht immer oder nur teilweise als anatomischer Orientierungspunkt sichtbar.

Der erste Schnitt zur Sektion des Sinusknotens erfolgte mit einer Vannas-Federschere entlang des Sulcus coronarius beginnend an der Basis des Sulcus terminalis in Richtung der Vena Cava inferior (Abbildung 12 b). Der zweite Schnitt reichte von der Vena cava inferior an den Stamm der Vena cava superior mit lateraler Orientierung, um den medial endenden Sinusknoten-*Tail* nicht zu beschädigen (Abbildung 12 c). Für den dritten Schnitt wurde der teilweise isolierte Sinusknoten mit einer feinen Pinzette an dem mit einem weißen Punkt in Abbildung 11 und Abbildung 12 markierten Bereich festgehalten, aber nicht gedehnt, um einer Beschädigung des Gewebes vorzubeugen. Der Schnitt führte leicht lateral des Sulcus terminalis zur Vena cava superior und am Stamm weiter ventral Richtung Aorta, wie in Abbildung 12 d und e zu sehen ist. Um die Isolation zu vervollständigen, wurde das Sinusknotenpräparat nach oben weggeklappt und ein sichelförmiger Verbindungsschnitt gesetzt, der durch die Vena cava superior verlief und somit deren Stamm am Präparat verblieb (Abbildung 12 e und f, Abbildung 11 d).



Abbildung 11 – SAN-Präparation eines regulären Herzens. (a) Rückansicht des isolierten Herzens mit Umgebungsgewebe, das für die SAN-Präparation entfernt werden muss. (b) Lungenteile, Thymus, Teile der Speisröhre und anhaftendes Fett wurden entfernt, um die Sinusknotenregion freizulegen, der in diesem Zustand isoliert werden könnte. Schwarze Pfeile markieren den Nervus vagus, weiße den Sulcus terminalis. (c) Dasselbe Herz nach dem Entfernen des verbliebenen überschüssigen Gewebes. Die weiß gestrichelte Linie umkreist den minimalen Bereich, der für die SAN-Präparation isoliert werden sollte. Ausschließlich im Bereich des weißen Punktes sollte der SAN für die Isolation vorsichtig mit einer feinen Pinzette festgehalten werden. (d) Der Sinusknoten wurde isoliert und zur Veranschaulichung auf die Ventrikel gelegt. Der weiße Punkt zeigt den Bereich zum Festhalten, die Biegung am anderen Ende des SAN zeigt die physiologische Konformation des Stamms der SVC. Th, Thymus; Lu, Teile der Lunge; Es, Speiseröhre; RAA, rechtes Herzohr; LV: Linker Ventrikel; RV, rechter Ventrikel; SAN, Sinusknoten; ST, Sulcus terminalis; SVC, Vena cava superior; IVC, Vena cava inferior; VN, Nervus vagus; Ao, Aorta; Maßstabsbalken (weiß) 1 mm.^[18]

Der auf diese Weise isolierte Sinusknoten wurde dann für die Proteincharakterisierung oder die Isolation der Einzelzellen weiterverwendet. Auch hier wurden die besten Ergebnisse mit schnellen Präparationen erzielt bei denen zwischen dem Tod der Maus und dem fertigen Sinusknotenpräparat weniger als 10 Minuten vergingen.



Abbildung 12 - Sektion eines mit Gelatine perfundierten Herzens mit einer Schritt-für-Schritt SAN-Präparation. (a) Rückansicht des isolierten Herzens nach Entfernung des Umgebungsgewebes und den Organen. Die weiß gestrichelte Linie zeigt den Schnittverlauf der SAN-Isolation. Ausschließlich im Bereich des weißen Punktes sollte der SAN für die Isolation vorsichtig mit einer feinen Pinzette festgehalten werden. (b) Der erste Schnitt markiert mit weißen Pfeilen verläuft vom Sulcus terminalis in Richtung der IVC entlang des Sulcus coronarius. (c) Der zweite Schnitt verläuft von der Vena cava inferior an den Stamm der Vena cava superior mit lateraler Orientierung. (d) Der dritte Schnitt entlang des Sulcus terminalis in Richtung SVC bis zum Stamm der Aorta. (e) Der nachoben geklappte SAN wird mit einem Verbindungsschnitt entlang des Stamms der SVC vollständig abgetrennt. (f) Das Herz nach der vollständigen SAN-Isolation. SVC, Vena cava superior; IVC, Vena cava inferior; PV, Pulmonalvene; RAA, rechtes Herzohr; LV, linker Ventrikel; RV, rechter Ventrikel. Maßstabsbalken (weiß) 1 mm.^[18]

4.1.5 Isolation von SAN Einzelzellen

Für die elektrophysiologische Untersuchung der Einzelzellen wurde ein stabiles Isolationsprotokoll entwickelt, was sich vor allem durch eine hohe Anzahl überlebender Zellen für die Patch-Clamp-Messungen zeigte.

Der isolierte Sinusknoten wurde, wie im vorigen Kapitel beschrieben, mehrfach eingeschnitten bzw. sogar in Stücke zerteilt, um auch die Zugänglichkeit für die Enzyme in der zentralen Geweberegion zu ermöglichen. Dabei überwog der Vorteil einer gleichmäßigen Verdauung bei weitem die Beschädigungen durch die Einschnitte, weil dadurch auch die Zellen des Sinusknoten-Head und -Body für Messungen verfügbar gemacht wurden. Das Sinusknotengewebe wurde dann schnell in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, das mit 37 °C warmer Tyrode low pH 6,9 (675 µl) gefüllt war, und im Wasserbad für 5 Minuten inkubiert. Dann folgte die eigentliche Verdauung des Gewebes mit der Zugabe von 10 µl BSA-Stocklösung in das Gefäß, gefolgt von den zuvor auf Eis aufgetauten Enyzmen mit Elastase (40 µl, 18,87 U), Protease (125 µl, 1,79 U) und Kollagenase B (150 µl, 0,54 U). Der Sinusknoten wurde dann für 30 Minuten im Thermoschüttler bei 36 °C und 600 1/Min inkubiert, alle 7 Minuten kurz entnommen und die Gewebeteile vorsichtig aufgeschüttelt, ohne das Gefäß jemals zu invertieren. Dies bot auch die Möglichkeit, den Grad der Verdauung zu kontrollieren, da sich die Schnittkanten durch die Enzyme abrundeten und das Gewebe weicher wurde. Der enzymatische Verdau wurde mit der Zentrifugation des SAN-Gewebes bei 200g für 2 Minuten bei 4 °C gestoppt. Der Überstand (ca. 990 µl) wurde verworfen und der Sinusknoten durch Zugabe von 990 µl frischer Tyrode low pH 6,9 bei Raumtemperatur gewaschen, wodurch auch die verbleibende Enzymkonzentration minimiert wurde. Das Sinusknotengewebe wurde erneut vorsichtig aufgeschüttelt. Es folgten drei weitere Waschschritte mit Zentrifugation und Lösungsaustausch, wobei zunächst noch einmal Tyrode low pH 6,9 bei Raumtemperatur verwendet wurde, danach zweimal eiskalte KB-Lösung. Für die anschließende Regenerationsphase wurde ein letztes Mal mit 200g für 2 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach der Zugabe von 350 µl eiskalter KB wurde das Sinusknotengewebe nochmal vorsichtig aufgeschüttelt und dann für 2,5 bis 3 Stunden bei 4 °C in den Kühlschrank gestellt.

Dieser Regenerationsschritt nach der enzymatischen Einwirkung zeigte klare Qualitätsvorteile bei den nachfolgenden Einzelzellmessungen gegenüber einer direkten Verwendung nach den Waschschritten. Die Reduktion der Wartezeit auf 30 bis 60 Minuten im Kühlschrank lieferte uneindeutige Ergebnisse, weshalb die Empfehlung bei der langen Regenerationszeit blieb. Der Einfluss auf die Anzahl und Qualität der isolierten Einzelzellen durch die Verdauungsenzyme war ebenfalls erheblich. Daher war es notwendig, nicht nur die eingesetzte Menge entsprechend der Enzymaktivität eines neuen Batchs anzupassen, sondern auch die Ergebnisse kritisch zu überprüfen.

49

Der letzte Schritt beinhaltete die Vereinzelung der Zellen und die Kalzium-Readaptation, bis die Zellen auf einem Deckglas für die Patch-Clamp-Messungen bereitstanden.

Dafür wurde das Reaktionsgefäß mit dem Sinusknoten direkt vom Kühlschrank in ein auf 37 °C vorgewärmtes Wasserbad transferiert und für 10 Min aufgewärmt. Dann wurden die Zellen mechanisch separiert, indem die SAN-Gewebestücke vier- bis achtmal mit einer 1000 µl Pipettenspitze (Eppendorf) aus Plastik, deren Spitze abgeschnitten und über einer Flamme bis auf eine 1 mm Öffnung abgeflammt wurde, auf- und abpipettiert wurden. Um die Vereinzelung zu verbessern, wurde diese Prozedur mit drei- bis fünfmaligem Auf- und Abpipettieren mit einer 200 μl Pipettenspitze (Eppendorf) wiederholt, die gleich nachbearbeitet wurde. Der optimale Verdauungsgrad war erreicht, wenn das Gewebe schon beim ersten Pipettieren von selbst zerfiel und sich während den weiteren Schritten der Gewebezusammenhalt sichtbar auflöste. Nachdem sich die größeren Gewebestücke nach ein paar Sekunden abgesetzt hatten, wurden jeweils 25 µl des Suspensionsmediums auf sieben vorbereitete Poly-L-Lysin (PLL)-beschichtete Deckgläser pipettiert, die in einer Inkubationskammer bis zur Verwendung im Experiment aufbewahrt wurden. In der Kammer, bestehend aus einer großen Petrischale (140 mm Durchmesser) mit Deckel, befand sich ein feuchtes Papiertuch, um das Austrocknen der Zellen auf den PLL beschichteten Deckgläsern bis zur Verwendung im Experiment zu verhindern. Nach weiterem drei- bis fünfmaligem Auf- und Abpipettieren wurden nach dem Absetzen der Gewebereste nochmal jeweils 25 µl Zellsuspension auf die Deckgläser pipettiert. Danach wurde die Inkubationskammer mit einem Deckel verschlossen und für 10-15 Minuten nicht bewegt, damit sich die Zellen durch Schwerkraft absetzen und auf den Deckgläsern adhärieren konnten.

Für die elektrophysiologischen Experimente wurde ein Deckglas in die Messkammer transferiert und Schritt für Schritt von der kalziumfreien KB auf eine physiologische Kalziumkonzentration erhöht. Dafür wurden in fünf Schritten extrazelluläre Lösung (Tabelle 13) zugegeben und nach jeder Zugabe zwei Minuten gewartet. Basierend auf 50 µl Zellsuspension waren das 5, 11, 25 und 86 µl extrazelluläre Lösung. Im letzten Schritt wurde dann die gesamte Messkammer mit extrazellulärer Lösung befüllt, womit die finale Kalziumkonzentration von 1 mM erreicht wurde. Während der Kalzium-Readaptation zeigte sich die Qualität der Zellpräparation und der Vereinzelung, da das hinzukommende Kalzium in allen beschädigten Zellen zu wellenförmigen Kontraktionen führte, welche nicht ins Gleichgewicht reguliert werden konnten. Der Anteil absterbender Zellen betrug bei guten Präparationen weniger als 20 %, wohingegen im schlechtesten Fall keine isolierten Einzelzellen übrigblieben. Zellen in optimaler Qualität hatten eine leicht geriffelte Oberfläche und zeigten keine Granulierung. Die Einzelzellen bestanden aus einer heterogenen Mischung von Sinusknotenzellen-Subtypen wie Atrial-like, *Elongated-, Spindle-* und *Spider-*Zellen, aber auch atriale Zellen, was in Abbildung 13 sowohl in der Übersicht als auch mit typischen Beispielen zu sehen ist.



Abbildung 13 - Isolierte Sinusknotenzellen und einzelne Subtypen. (a) Zellmix mit Einzelzellen, Zellclustern, toten Zellen und Zellüberresten. Maßstabsbalken (weiß) 200 μm. (b) Atrial-like Zelle. (c) Elongated-Zelle. (d) Spider-Zelle. (e) Spindle-Zelle. Maßstabsbalken (weiß) 50 μm (für b-e).^[18]

4.2 Molekularbiologische und histologische Untersuchungen

Die Veränderung des HCN4-Kanals mit drei Punktmutationen im HCN4FEA-Mausmodell und der damit einhergehenden Blockade der CNBD für die Bindung von cAMP kann potenziell zu Veränderungen des Expressionslevels dieses Kanals bzw. zu Aufwärts- oder Abwärtsregulation des Expressionsprofils der anderen HCN-Isoformen führen. Auch eine schnellere Internalisierung und Proteindegradation sowie Auswirkungen auf die Morphologie des Herzens als Folge von Remodeling wurden mit den Untersuchungen in diesem Kapitel erforscht.

Zunächst wurden WT- und HCN4FEA-Sinusknotenpräparate verwendet, um auf mRNA-Ebene mittels quantitativer PCR-Analyse die Expressionslevels der HCN-Isoformen zu bestimmen. Auf Proteinebene wurde das Vorkommen von HCN-Kanälen in einer Western Blot Analyse für den Sinusknoten sowie atriales und linksventrikuläres Gewebe untersucht. Ein Vergleich der Herzen mittels histologischer Analysen von ventrikulären Querschnitten und immunhistochemischer Analysen von Sinusknotenpräparaten komplettierte die basale Charakterisierung des HCN4FEA-Mausmodells und bot eine räumliche Lokalisation der Ionenkanäle im Sinusknoten.

4.2.1 Quantitative PCR-Analyse der HCN-Kanal Transkripte in Sinusknoten von WT- und HCN4FEA-Mäusen

Für die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) wurden zunächst Sinusknotenpräparationen von WT und HCN4FEA erstellt, wie unter 4.1.4 beschrieben, die in einem Reaktionsgefäß bis zur Weiterverwendung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden. Die RNA wurde aus den präparierten Sinusknoten extrahiert und direkt im Anschluss in cDNA umgeschrieben. Damit wurden dann in der qPCR das relative Vorkommen der verschiedenen HCN-Kanal-Isoformen für WT- und HCN4FEA-Mäuse mit der bestimmt^[49]. Als $\Delta\Delta$ Ct-Methode Housekeeping-Gene wurden die murine Delta-Aminolävulinatsynthase 1 (ALAS) und die murine Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet, welche beide unreguliert in allen Zellen des Körpers vorkommen. Unter Ermangelung eines spezifischen, evaluierten Housekeeping-Gens für murines Herz- und Sinusknotengewebe sollten mit der Verwendung von zwei verschiedenen gebräuchlichen internen Kontrollgenen mit ALAS als mitochondrialem Enzym und GAPDH als Enzym des Glykolysestoffwechsels verlässliche Bezugsgrößen für die RNA- Menge der HCN-Isoformen im Sinusknoten verwendet werden. Für GAPDH ist bekannt, dass auch beeinträchtigte murine Herzen mit Herzinsuffizienz nach Infarkt das Gen stabil exprimieren^[50].

Die Analyse basierte auf drei unabhängigen Experimenten, wofür jeweils drei biologisch unabhängige Proben aus Sinusknoten von drei Monate alten WT- und HCN4FEA-Mäusen verwendet wurden. Die relativen Transkriptionslevels der vier HCN-Isoformen normalisiert auf HCN4 bezogen auf die beiden Housekeeping-Gene ist in Abbildung 14 zu sehen. Es konnte für die Expression von HCN4 kein signifikanter Unterschied zwischen WT und HCN4FEA bei beiden Housekeeping-Genen festgestellt werden. Die Expressionslevel von HCN1 und HCN2 waren in beiden Analysen vergleichbar. Die Ergebnisse für HCN3 lagen in allen Proben unter der Nachweisgrenze. Die Verteilung zeigte, dass HCN4 die vorherrschende Isoform in den Sinusknotenpräparaten war und von HCN1 knapp halb so viele mRNA-Transkripte detektiert werden konnten. HCN2 spielte mit nur einem Zehntel der HCN4-Expression eine untergeordnete Rolle.



Abbildung 14 - Quantitative PCR-Analyse der HCN-Kanal Transkripte in Sinusknoten von WT- und HCN4FEA-Mäusen für alle vier Isoformen. Die Expression von HCN3 lag unter der Nachweisgrenze. Daten normiert auf HCN4- Expression von drei Replikaten mit n = 6 WT und n = 6 HCN4FEA biologisch unabhängigen Stichproben bezogen auf die Housekeeping-Gene ALAS und GAPDH. Boxplots zeigen Mittelwerte als offenen Kreis, Medianlinie, 25/75 % Grenze und Min/Max Wert.

4.2.2 Western Blot Analyse von verschiedenen Gewebeproben des Herzens

Um auch auf der Proteinebene zu überprüfen, ob durch die Mutationen am HCN4-Kanal potenzielle Veränderungen der Expression im Herzen auftraten, wurden für die Western Blot Analyse Sinusknotenpräparationen von drei Monate alten, weiblichen WT- und HCN4FEA-Mäusen erstellt wie unter Kapitel 4.1.1 und 4.1.4 beschrieben. Sie wurden dann vereinigt (WT und HCN4FEA jeweils n = 9 Sinusknoten) sowie vergleichbar große Stücke von zwei rechten Atrien und einem linken Ventrikel entnommen.

In Abbildung 15 ist die HCN-Kanal-Proteinexpression der Western Blot Analyse zu sehen. Dabei wurden für HCN4 vergleichbare Banden im Sinusknotengewebe mit 150 kDa detektiert, was dem vollständigen glykosylierten HCN4- bzw. HCN4FEA-Protein entspricht. HCN1 konnte mit einer 110 kDa Bande im Sinusknoten und in den Atrien nachgewiesen werden ohne offensichtliche Unterschiede zwischen WT und HCN4FEA, wohingegen bei HCN2 keine starke Expression nachgewiesen werden konnte. Nur im linksventrikulären Gewebe waren leichte Banden bei 120 kDa erkennbar. Alle Gewebeproben zeigten eine deutliche Expression des Ladekontrollproteins α -Tubulin mit vergleichbaren Banden bei 55 kDa.



Abbildung 15 – HCN-Kanal-Proteinexpression aus Membranpräparationen von Sinusknoten (SAN), Atrium und linkem Ventrikel (LV) aus WT und HCN4FEA (KI) Herzen. Für den Blot wurde das vereinigte Gewebe von WT und HCN4FEA Sinusknoten (jeweils n=9) sowie zwei Atrien und einem linken Ventrikel eingesetzt. Ladekontrolle α-Tubulin.

Die Ergebnisse der Western Blot Analyse in Kombination mit den Resultaten der qPCR ließen auf eine unveränderte Kanalexpression im HCN4FEA-Mausmodell, verglichen mit dem WT HCN4, schließen. Auch die anderen HCN-Isoformen wiesen keine veränderten Expressionsmuster auf, was für die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen der Veränderungen durch die Mutationen eine verlässliche Grundlage bildete.

4.2.3 Hämatoxylin und Eosin sowie Fibrosierung (Sirius red / Fast green) Färbungen von ventrikulären Querschnitten

Das morphologische Erscheinungsbild der präparierten Herzen von WT- und HCN4FEA-Mäusen wies keine Unterschiede auf. Um dies genauer zu betrachten, wurden ventrikuläre Querschnitte von WT (n = 7) und HCN4FEA (n = 7)-Herzen von drei Monate alten männlichen Mäusen angefertigt, die wie in Kapitel 4.1.1 präpariert und dann fixiert wurden. Am Kryostaten wurden 8 µm dicke Querschnitte der Ventrikel angefertigt und für eine bessere Vergleichbarkeit der histologischen Färbungen Objektträger mit Schnitten aus der Ebene der Papillarmuskeln ausgewählt. In Abbildung 16 sind Beispiele dargestellt mit Übersichtsfärbungen rechts mit Hämatoxilin und Eosin (HE), die wie schon bei den präparierten Herzen keine morphologischen Besonderheiten zeigten und keinen Hinweis auf pathologische Veränderungen zwischen WT und HCN4FEA lieferte. Die Analyse der ventrikulären Durchmesser war auch unauffällig. Die im Rahmen des kardialen Remodelings auftretende Fibrosierung des Muskelgewebes wurde mit Hilfe der Sirius red/Fast green Färbung überprüft, welche sich zur präzisen Visualisierung von Kollagenfasern empfiehlt ^[51]. Auch hier konnte kein Unterschied zwischen WT- und HCN4FEA-Herzen festgestellt werden. Wie in den Vergrößerungen in der Mitte von Abbildung 16 zu sehen ist, war die detektierte Rotfärbung vor allem um die Gefäße lokalisiert, was dem physiologischen



Abbildung 16 – Histologische Färbungen von ventrikulären Cryo-Querschnitten von WT (oben) und HCN4FEA (unten) mit Hämatoxilin und Eosin (rechts) und Fibrosierung (Sirius red/Fast green) links mit Vergrößerungen davon in der Mitte.

4.2.4 Immunhistochemische Analysen von Sinusknotenpräparaten

Um weitere Erkenntnisse über die Lokalisation der HCN-Kanäle im Sinusknoten zu erhalten und deren Verteilung in WT- und HCN4FEA-Mausmodell zu überprüfen, wurden immunhistochemische Färbungen mit ganzen Sinusknotenpräparaten wie auch mit Sinusknoten-Querschnitten von jeweils sechs WT- und HCN4FEA-Herzen von drei Monate alten männlichen Mäusen angefertigt, die entsprechend Kapitel 4.1.1 präpariert und mit PBS gespült wurden. Abhängig von der Verwendung wurden die Präparate nach der immunhistochemischen Färbung im Ganzen auf Objektträger transferiert oder mit dem Kryostaten als 12 µm dicke Querschnitte der Sinusknoten aufgezogen, immunhistochemisch gefärbt und beide Varianten am Konfokalmikroskop vermessen.

In Abbildung 17 sind WT- und HCN4FEA-Sinusknotenpräparate abgebildet, die mit Antikörpern gegen HCN1 und HCN4 immunhistochemisch gefärbt wurden. Sowohl in Präparaten von WT- wie auch HCN4FEA-Mäusen konnte HCN4 im gesamten Sinusknoten mit einer hohen Expression nachgewiesen werden, die eine klare laterale Abgrenzung zum rechten Atrium an der Crista terminalis hatte. Dies ist nicht nur in den Darstellungen der ganzen Sinusknoten (WT und HCN4FEA jeweils A), sondern auch in den Vergrößerungen der Regionen von *Head, Body* und *Tail* des Sinusknotens (jeweils d-f) deutlich. Darin sind auch die morphologischen Unterschiede zwischen den Zellen in den drei Sinusknotenbereichen ersichtlich: Im Sinusknoten-*Head* sind die Zellen rundlich, im Körper länglich und im *Tail* eher sternförmig. Die Färbung gegen HCN1 zeigte eine klare Expression im *Head* des Sinusknotens von WT und HCN4FEA (Abbildung 17 jeweils B), was auch mit den Vergrößerungen dieser Region (jeweils d) anhand der gelben Co-Lokalisation nachgewiesen werden konnte und sich mit anderen Untersuchungen deckt ^[17]. Dennoch blieben ein paar Unsicherheiten für die Regionen von *Body* und *Tail*, da beim Sinusknoten des WT die untere Hälfte fast gar kein Signal zeigte, aber bei der HCN4FEA-Präparation HCN1 schwach im *Body* detektiert wurde und auch allgemein ein hohes unspezifisches Hintergrundsignal außerhalb des Sinusknotens vorhanden war.



Abbildung 17- Sinusknotenpräparate von WT und HCN4FEA mit immunhistochemischen Färbungen gegen HCN1 und HCN4. Links WT und rechts HCN4FEA mit jeweils vollständigem Sinusknoten mit (A) HCN4 per FITC in grün, (B) HCN1 per Cy3 in rot und (C) die Überlagerung von (A) und (B), wobei gelb eine Co-Lokalisation anzeigt. Gestrichelte Rechtecke entsprechen den Vergrößerungen in (d-f) der Head-, Body- und Tailregion des Sinusknotens. RA, rechtes Atrium; SVC, Vena cava superior.^[52]

Dies konnte in den Sinusknoten-Querschnitten mit Färbungen gegen HCN1 und HCN4 aufgeklärt werden, die exemplarisch für die *Head-*, *Body-* und *Tail*region des WT in Abbildung 18 dargestellt sind. Hier wurden beim WT ausgeprägte Signale für HCN1 im *Head* detektiert, aber auch eine geringe Expression im *Body* des Sinusknotens. HCN4 kommt wie in den vollständigen Präparaten als vorherrschende Isoform in allen Abschnitten des Sinusknotens mit einem abfallenden Intensitätsgradienten von *Head* zu *Tail* vor. Dieses Muster konnte in den HCN4FEA-Querschnitten ebenfalls detektiert werden (Daten hier nicht gezeigt).



Abbildung 18 – Sinusknoten-Querschnitte einer WT-Präparation mit immunhistochemischen Färbungen gegen HCN1 und HCN4 für Head, Body und Tail. Links HCN4 per FITC in grün, Mitte HCN1 per Cy3 in rot und Rechts die Überlagerung von beiden, wobei gelb eine Co-Lokalisation anzeigt. CT, Crista terminalis; IAS, Interatriales Septum.^[52]

Daher konnte mittels immunhistochemischer Analysen gezeigt werden, dass weder eine Veränderung des Expressionsprofils von HCN4 zwischen WT und HCN4FEA stattfand noch eine Hochregulierung von HCN1 zu beobachten war. Das Lokalisationsmuster über den gesamten Sinusknoten blieb ebenfalls erhalten.

4.3 Elektrophysiologische Untersuchungen von whole-mount-Präparationen und isolierten Sinusknotenzellen

Nachdem die molekularbiologischen und histologischen Ergebnisse gezeigt hatten, dass der HCN4-Kanal im HCN4FEA-Mausmodell im selben Maß wie der WT exprimiert wurde, sollte mit den elektrophysiologischen Untersuchungen gezeigt werden, wie sich die Eigenschaften des HCN4-Kanals durch den Verlust der cAMP-abhängigen Modulation veränderten.

Die elektrophysiologischen Untersuchungen reichten von in-vitro-Experimenten, die sowohl die Einzelzellebene als auch die Netzwerkebene mit verschiedenen Herzpräparationen umfassten, bis hin zum Verhalten *in vivo* mit telemetrischen EKG-Aufnahmen. Dies diente dazu, den vollständigen Phänotyp des HCN4FEA-Mausmodells zu charakterisieren und dessen Einfluss auf die Herzratenvariabilität zu analysieren.

In dieser Arbeit wurden erste Ergebnisse sowohl auf der Einzelzellebene mit isolierten Sinusknotenzellen als auch auf der Netzwerkebene mit Mikroelektrodenmessungen an whole-mount-Präparationen gewonnen, die im folgenden Kapitel dargestellt werden.

4.3.1 Patch-Clamp-Messungen mit isolierten Sinusknotenzellen

Der Vorteil des HCN4FEA-Mausmodells, dass nur die cAMP-abhängige Modulation ausgeschaltet wurde, aber ein funktionaler, spannungsabhängiger HCN4-Kanal in den Zellen verbleibt, bot die Möglichkeit, diesen Einfluss mit Experimenten in Abhängigkeit vom Vorhandensein von cAMP und im Vergleich mit WT-Sinusknotenzellen direkt zu messen. Die isolierten Sinusknotenzellen stammten von acht bis zehn Wochen alten männlichen WT- und HCN4FEA-Mäusen, die gemäß den in Kapitel 4.1.1, 4.1.4 und 4.1.5 beschriebenen Methoden präpariert wurden. Mit voltage-clamp-Messungen in der whole-cell-Konfiguration konnten stabile I_h-Stromantworten hervorgerufen werden mit Potentialänderungen ausgehend vom Haltepotential ($V_m = -40 \text{ mV}$) zu hyperpolarisierenden Spannungen von zunächst -150 mV mit elf Wiederholungen, die jeweils 10 mV positiver waren. Repräsentative Beispielstromspuren der Sinusknotenzellen sind in Abbildung 19 von WT (a) und HCN4FEA (b) jeweils ohne und mit cAMP in der intrazellulären Lösung zu sehen. Aus diesen Messungen konnten die in Abbildung 19 (c) gemittelten In-Aktivierungskurven berechnet werden, wobei die Stromamplituden bei den verschiedenen Potentialen auf ihren Maximalstrom bei -150 mV normiert wurde. Eine Kurvenanpassung mit der Boltzmann-Funktion jeder normierten Zelle resultierte im Steigungswert k (siehe Datentabelle) und in den in Abbildung 19 d dargestellten halbmaximalen Aktivierungsspannungen V_{0.5}. Die Steigungswerte zeigten keinen Unterschied zwischen den vier Bedingungen. Der V_{0,5} Wert war für die Zellen ohne cAMP im WT signifikant negativer als in den HCN4FEA-Zellen. Die Zugabe von cAMP in die interne Pipettenlösung führte zu einer charakteristischen

Rechts-Verschiebung des $V_{0,5}$ Werts (WT cAMP) zu einer positiveren halbmaximalen Aktivierungsspannung um mehr als 15 mV. In den HCN4FEA- Zellen führte cAMP zu keiner relevanten Veränderung der $V_{0,5}$ -Werte und diese lagen zwischen den Werten des WT mit und ohne cAMP.

Dieses Muster der V_{0,5}-Werte der isolierten Sinusknotenzellen entspricht damit den Ergebnissen des HCN4FEA-Kanals, wie sie schon von Messungen in heterologer Überexpression in HEK293-Zellen bekannt war ^[45], und bestätigt auch im Mausmodell die Effekte der drei Punktmutationen.

Um die spannungsabhängige Steuerung der HCN-Kanäle in den isolierten Sinusknotenzellen zu überprüfen, wurde mit Messungen der Stromamplitude des stabilen I_h-Stroms bei -150 mV der maximale I_h-Strom für alle gemessenen Zellen bestimmt. Dieser lag für alle Zellen in der



Abbildung 19 – Voltage-clamp-Einzelzellmessungen von isolierten Sinusknotenzellen. Repräsentative I_h-Messungen in wholecell-Konfiguration von (a) WT und (b) HCN4FEA ohne/mit 100 μM cAMP in der internen Pipettenlösung; (c) gemittelte Aktivierungskurven berechnet aus den IV-Kurven der Einzelzellen normiert auf den Maximalstrom bei -150 mV (Mittelwert ±SEM); (d) halbmaximale Aktivierungsspannungen berechnet aus den Aktivierungskurven, Signifikanz: WT vs. HCN4FEA p=0,0075, WT vs. WT cAMP p=0.00003, WT cAMP vs. HCN4FEA cAMP p=0.0127; two-way ANOVA, Boxplots zeigen Mittelwerte als offenen Kreis, Medianlinie, 25/75 % Grenze und Min/Max Wert; (e) Verschiebung der Aktivierungsspannungen in Bezug auf den basalen WT-Wert. Datensatz^[45] enthält Messungen von Frau Vanessa Marks.

Größenordnung von -2 nA und zeigte weder für WT- noch für HCN4FEA-Zellen in Abwesenheit oder mit 100 µM cAMP signifikante Unterschiede, wie in Abbildung 20 zu sehen ist. Auch eine separate Betrachtung der beiden Zelltypen, die einen Anteil von 90-95 % der nicht-atrialen Zellen der zentralen Sinusknotenregion haben ^[17], ist in Abbildung 20 mit den *Elongated*- und *Spindle*-Zellen aufgeführt. Die Zelltypen sind beide länglich gestreckt, aber die *Spindle*-Zellen (Beispiel in Abbildung 13 e) sind deutlich kompakter als die *Elongated* Zellen, wie in Abbildung 13 c gezeigt. Die Stromamplitude der beiden Zelltypen wies jeweils innerhalb des Subtyps zwischen WT und HCN4FEA sowie mit und ohne cAMP keine Unterschiede auf, aber die gemessenen I_h-Ströme der *Spindle*-Zellen war tendenziell größer als die der *Elongated* Zellen. Dies schlug sich auch in der Berechnung der Stromdichte nieder, die den gemessenen I_h-Strom mit der analysierten Zelloberfläche ins Verhältnis setzt. Die Stromdichte der *Elongated* Zellen war tendenziell niedriger als die der *Spindle*-Zellen, was den Ergebnissen für WT-Sinusknotenzellen einer früheren Untersuchung entspricht ^[17]. Wichtiger war jedoch die Erkenntnis, dass in keiner der drei Stichproben ein signifikanter Unterschied der Stromdichte zwischen WT und HCN4FEA festzustellen war und die Messungen mit cAMP weder die Stromdichte noch die maximale Stromamplitude beeinflusste.



Abbildung 20 - Stromamplituden (oben) und Stromdichte (unten) für alle Zellen und für die Subtypen Elongated- und Spindle-Zellen. Qualitätskriterium: Zellen mit Strom >0,75 nA bei -150 mV. Für WT / HCN4FEA / WTcAMP / HCN4FEAcAMP betrug die Anzahl bei allen Zellen 25/17/11/7, für Elongated 12/7/4/3 und für Spindle 16/11/11/5. Keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte (p=0,05) innerhalb einer Gruppe (alle, Elongated oder Spindle) mittels ANOVA und Mittelwertvergleich (Bonferroni, Bonholm).

4.3.2 Mikroelektrodenmessungen an whole-mount-Präparationen des Sinusknotens

Um den Sinusknoten auch auf Netzwerkebene untersuchen zu können, wurden whole-mount-Präparationen mit weiblichen zwölf bis sechzehn Wochen alten WT- und HCN4FEA-Mäusen wie in Kapitel 4.1.1 und 4.1.3 beschrieben erstellt. Die gepinnte Präparation, wie in Abbildung 10 exemplarisch dargestellt ist, wurde dann in die Messkammer auf dem inversen Mikroskop überführt und kontinuierlich mit 30 °C warmer Tyrode III perfundiert. Die mit 3M KCI gefüllte Glas-Mikroelektrode wurde mit einem Mikromanipulator an die Zielregion des Sinusknotens angenähert, die zuvor mit dem Mikroskop anhand der bekannten anatomischen Orientierungspunkte wie dem Sulcus terminalis oder der Sinusknotenarterie (siehe Abbildung 21) identifiziert wurde. Die Mikroelektrode selbst war aufgrund der endokardialen Annäherung bei epikardialer Blickrichtung durch das Mikroskop wie in Abbildung 21 nur als Schatten sichtbar und der Kontakt zum Gewebe wurde anhand von Spannungsablenkungen in der Messung sichtbar. Durch kurze Bewegungspulse der Z-Achse des Mikromanipulators wurden Zellen zufällig perforiert und die Spitze der Mikroelektrode drang ins Lumen der Zelle ein. Dies führte zu einem schnellen Spannungsabfall und stellte den Beginn der current-clamp-Messungen dar, sofern sich die Peak-Ströme und das maximale diastolische Potential stabilisiert hatten. Minimale Positionsveränderungen konnten dabei helfen, allerdings mit



Abbildung 21 – Epikardiale Ansicht einer whole-mount-SAN-Präparation während einer Mikroelektroden-Messung (Mikroelektrode horizontaler Schatten) mit Lokalisation nahe der noch blutgefüllten Sinusknotenarterie (Verlauf markiert mit weißen Pfeilen).

der Gefahr, die Zelle wieder zu verlieren. Nach spätestens 30 s ohne Stabilisierung wurde eine andere Stelle ausgewählt und gegebenenfalls dafür die Mikroelektrode gewechselt.

Das intrinsische Entrainment der Sinusknotenzellen entspricht der Synchronisation von individuellen Schrittmacherzellen zu einem gemeinsamen Netzwerkrhythmus über gegenseitige elektrische Interaktionen via gap junctions. Für seine Charakterisierung wurde die spontane Schlagfrequenz der Sinusknoten mit diesen current-clamp-Messungen bestimmt, wovon zwei Beispiele eines WT- und eines HCN4FEA-Sinusknotens in Abbildung 22 (a) und (b) mit regelmäßigen Schrittmacherpotentialen abgebildet sind. Der erste Analyseschritt der Herzratenvariabilität war die Betrachtung der Abstände zwischen zwei Peaks, die hier zur Vereinfachung trotz anderer Messmethode als NN-Intervalle bezeichnet wurden und aus dem Kontext der EKG-Analyse mit zwei aufeinander folgenden normalen RR-Abständen stammt. Diese wurden zur besseren Visualisierung als Histogramme und Poincaré Plot dargestellt und stammen von der Auswertung einer einmütigen Aufzeichnung eines WT- und HCN4FEA-Sinusknotens. Die NN-Intervalle des WT zeigten im Histogramm eine symmetrische schmale



Abbildung 22 - Mikroelektrodenmessungen an whole-mount-Präparationen des Sinusknotens. (a) Beispielhafte Schrittmacherpotentiale (10 s-Abschnitte) von WT und HCN4FEA, (b) Histogramm und (c) Poincaré Diagramm der NN-Intervalle der Kontrollmessungen in Tyrode III Lösung eines einminütigen Abschnitts. Binning des Histogramms 0,5 ms.

Verteilung innerhalb eines nur 5 ms breiten Bereichs. Im Gegensatz dazu waren die HCN4FEA-NN-Intervalle hauptsächlich auf einen mehr als doppelt so breiten Bereich verteilt mit einer rechtsschiefen Verteilung des Histogramms mit geringem Vorkommen weiterer längerer NN- Intervalle. Dies zeigt auch der Poincaré-Plot in Abbildung 22 c, der ein etabliertes Mittel zur Darstellung von kurzfristigen dynamischen Änderungen des Herzschlags ist. Dafür wird auf der y-Achse jedes NN-Intervalls des analysierten Bereichs gegen das jeweils vorangegangene auf der x-Achse aufgetragen (NN+1 gegen NN). Dadurch wird nicht nur mit der Verteilung eines Punktes auf der y-Achse zu einem Wert x das Maß der Schlag-zu-Schlag Variabilität sichtbar, sondern mit allen Punkten auch die Gesamtvariabilität des betrachteten Abschnitts. Für den WT wurde deutlich, dass dieser sehr stabil ohne jegliche Ausreißer ein Cluster im Bereich der Winkelhalbierenden bildet, wohingegen die NN-Intervalle des HCN4FEA- Sinusknotens auf einen deutlich breiteren Bereich mit einigen größeren Abweichungen streuen^[53].

Eine zeitliche Auflösung dieser Ergebnisse zeigen die Tachogramme dieser Messungen, wie sie in Abbildung 23 zu sehen sind. Die jeweilige Kontrollmessung zu Beginn des Experiments in Tyrode III zeigt beim WT eine fast horizontale Linie, die damit kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Schlägen aufwies. Die NN-Intervalle der HCN4FEA-Messung zeigen die identifizierten Schwankungen inklusive einzelner Peaks, die für längere Intervalle stehen. Die Tachogramme zeigen auch die Auswirkung des mit der Perfusionslösung applizierten Isoprenalin.

Der Wirkstoff Isoprenalin ist ein selektiver β-Adrenozeptor-Agonist, der als Sympathomimetikum die Herzfrequenz beschleunigen kann. In hoher Konzentration diente dieser pharmakologische Ansatz



Abbildung 23 - Tachogramme von WT und HCN4FEA Mikroelektrodenmessungen mit 30 s Abschnitten aus der Kontrollphase in Tyrode III und unter Perfusion mit zunächst 0,1 nM Isoprenalin gefolgt von 1 µM Isoprenalin.

auch der Bestimmung der maximalen sympathischen Stimulation der Schlagfrequenz.

Die geringe Dosis als Kontrolle (dunkelgraue Linie) zeigte wenig bis keine Wirkung und in beiden Fällen waren die Tachogramme vergleichbar mit den Messungen in Tyrode III. Die Applikation der hohen Dosis Isoprenalin (1 μ M; schwarze Linie) führte in beiden Fällen zu einer deutlichen Erhöhung der Frequenz und somit zu kleineren NN-Intervallen. Speziell bei der HCN4FEA-Messung wurde mit 1 μ M Isoprenalin aber auch die Schlag-zu-Schlag-Variabilität fast auf das Niveau des WT reduziert und die Messung war sehr stabil.

In Abbildung 24 wurden die Schlagfrequenzen aller whole-mount-Mikroelektrodenmessungen von WT- und HCN4FEA-Sinusknoten zusammengefasst. Die Experimente zeigten, dass unter Kontrollbedingungen die durchschnittliche Schlagfrequenz der WT-Sinusknoten (232,8 ±2,6 1/Min) signifikant schneller war als die der HCN4FEA-Messungen (204,6 ±5,6 1/Min), was auch unter niedrig dosiertem Isoprenalin (0,1 nM) unverändert blieb (WT 226,5 ±5,5 1/Min vs. HCN4FEA 195,2 ±4,8 1/Min). Die Bestimmung der maximalen Schlagfrequenz sorgte mit 1 μ M Isoprenalin in beiden Gruppen für einen signifikanten Anstieg im Vergleich mit den beiden vorherigen Phasen, aber die Steigerung der HCN4FEA-Sinusknoten war mit 269,4 ±11,6 Schlägen/Min geringer als die maximale Schlagfrequenz der WT-Herzen (322,5 ±11,1 1/Min). Der prozentuale Anstieg der Schlagfrequenz beim Vergleich von Kontrollbedingungen mit 1 μ M Isoprenalin war für beide Gruppen vergleichbar (WT 38,5 ±4,6 % vs. HCN4FEA 31,9 ±5,9 %).



Abbildung 24 – Gemittelte Schlagfrequenz von Mikroelektrodenmessungen an whole-mount-Präparationen des Sinusknotens unter basalen Bedingungen mit Tyrode III Lösung und unter Einwirkung von 0,1 nM bzw. 1 μ M Isoprenalin (Iso). WT n=7, HCN4FEA n=5, ANOVA1Way mit einem Signifikanzlevel von ** p<0,01, *** p<0,001.

Die Analyse der Herzfrequenzvariabilität für die zeitbasierten Parameter sollte eine quantifizierbare Aussage über die in den Histogrammen und Poincaré-Plots in Abbildung 22 für HCN4FEA detektierte erhöhte Schlag-zu-Schlag-Variabilität ermöglichen. Dafür wurden in Abbildung 25 die gemittelten NN-Werte sowie die berechneten SDNN- und RMSSD-Werte der whole-mount-Sinusknotenmessungen unter Kontrollbedingungen und mit 1 µM Isoprenalin dargestellt. Die NN-Intervalle entsprechen in ihrer Aussage den Daten von Abbildung 24 mit dem Unterschied, dass die niedrigere Schlagfrequenz der HCN4FEA-Sinusknoten hier mit einem signifikant höheren NN-Intervall abgebildet wurde (WT 257,4 ±3,3 ms vs. HCN4FEA 302,7 ±11,7 ms). Die maximale sympathische Stimulation führte zu signifikant kürzeren NN-Intervallen, die sich zwischen den beiden Gruppen signifikant unterschieden, aber einen vergleichbaren prozentualen Anstieg aufwiesen. Die SDNN-Werte (standard deviation of the NN Intervall) veranschaulichen, wie weit die Intervalle im Mittel vom Durchschnitt aller Intervalle abweichen. Bei den Kontrollmessungen in Tyrode III zeigte der WT stabile und regelmäßige Signale, die zu einem sehr geringen SDNN-Wert von im Schnitt 2,04 ±0,31 ms führte. Die HCN4FEA-Messungen wiesen teilweise sehr hohe Fluktuationen auf, die sich in einem signifikant erhöhten SDNN-Wert von 15,47 ±4,17 ms niederschlugen. Unter maximaler sympathischer Aktivierung verschwinden diese Variationen und die Werte liegen auf dem Niveau der WT-Messungen (WT (1 µM Iso) 3,96 ±1,34 ms vs. HCN4FEA (1µM Iso) 2,80 ±1,00 ms). Der RMSSD-Wert (Root Mean Square of Successive Differences) stellt einen numerischen Ausdruck des Poincaré-Plots dar in Form der Abweichung orthogonal zur Winkelhalbierenden und zeigt so die kurzzeitige Fluktuation von aufeinanderfolgenden Schlägen. In Ruhe unter Kontrollbedingungen war der RMSSD- der WT-Sinusknoten mit



Abbildung 25 – Gemittelte NN-Werte von Mikroelektrodenmessungen an whole-mount-Präparationen des Sinusknotens, Standard-Abweichung der NN-Intervalle (SDNN) und Root Mean Square of Successive Differences (RMSSD) unter basalen Bedingungen mit Tyrode III Lösung und unter Einwirkung von 1 μ M Isoprenalin. WT n=5, HCN4FEA n=3, ANOVA1Way mit einem Signifikanzlevel von * p<0,05, ** p<0,01.

2,74 ±0,79 ms signifikant kleiner als die HCN4FEA Werte mit 19,34 ±6,89 ms. Diese Werte wurden mit 1 μ M Isoprenalin signifikant reduziert (4,11 ±1,91 ms) auf das niedrige Niveau des WT (1,90 ±0,78 ms).

Die Mikroelektrodenmessungen mit whole-mount-Präparationen des Sinusknotens konnten auf Netzwerkebene erste Auswirkungen des HCN4FEA-Mausmodells auf das intrinsische Entrainment der Sinusknotenzellen zeigen. Dabei konnte die signifikante Reduktion der Schlagfrequenz in Ruhe gegenüber den WT-Messungen festgestellt werden, die zudem mit einer deutlich erhöhten Herzfrequenzvariabilität einherging. Die maximale sympathisch stimulierte Schlagfrequenz war im Vergleich zum WT reduziert, aber die relative Beschleunigung in beiden Fällen auf ähnlichem Niveau. Da im whole-mount-Präparat der Einfluss des vegetativen Nervensystems fehlt, muss davon ausgegangen werden, dass der beobachtete Phänotyp wirklich auf die Sinusknotenzellen selbst und den Verlust der cAMP abhängigen Regulation zurückzuführen ist.

5 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Dissertation lassen sich in drei Abschnitte aufteilen. Der erste war die Durchführung von in-vitro-Präparationen, die zunächst mit anatomischen Studien die Lage des Sinusknotens verdeutlichte. Die gelatinegefüllten Herzen dienten als anatomische Demonstrationsmodelle für alle weiteren Präparationen, was deren Dokumentation der bestmöglichen Durchführung erheblich verbesserte. Darauf bauten wesentlich die Untersuchungen zur Grundcharakterisierung des HCN4FEA-Mausmodells auf, deren Methoden und Ergebnisse den zweiten Abschnitt dieser Arbeit darstellen. Dafür wurde die Kanalexpression von HCN4 und der anderen HCN-Isoformen mit dem Vorkommen im WT verglichen. Das Ergebnis auf mRNA-Ebene mit der qPCR und auf Proteinebene mit der Western Blot Analyse bestätigte eine unveränderte Kanalexpression für HCN4 und die anderen Isoformen. Die histologischen Färbungen der ventrikulären Querschnitte waren morphologisch unauffällig und es konnte keine pathologische myokardiale Fibrosierung nachgewiesen werden. Mit whole-mount-Präparationen und Sinusknoten-Querschnitten durchgeführte immunhistochemische Färbungen von HCN4 und HCN1 bestätigten auch im HCN4FEA-Mausmodell die Expression von HCN4 im gesamten Sinusknoten mit einer starken Konzentration im Head, wo auch die Co-Lokalisation mit HCN1 am deutlichsten war. Das Verteilungsmuster entsprach dem des WT. Der letzte Abschnitt beinhaltete elektrophysiologische Untersuchungen von isolierten Einzelzellen und deren Charakterisierung mit voltage-clamp-Messungen. Die halbmaximalen Aktivierungsspannungen der HCN4FEA-Zellen waren positiver als die V_{0,5}-Werte des WT ohne exogenes cAMP. Eine signifikante Verschiebung des $V_{0.5}$ -Werts mit cAMP im WT konnte bei den HCN4FEA-Zellen nicht beobachtet werden und bestätigte damit die Blockade der CNBD gegenüber cAMP. Die Untersuchung der Stromamplitude und der Stromdichte auch mit separater Betrachtung von Spindle- und Elongated Zellen zeigte keinen signifikanten Unterschied. Die Experimente mit wholemount-Präparationen des Sinusknotens identifizierte eine niedrigere Schlagfrequenz der HCN4FEA-Sinusknoten in Kontrolllösung und unter maximaler sympathischer Stimulation mit Isoprenalin. Zudem war bei den Knock-In-Mäusen unter basalen Bedingungen eine erhöhte Herzfrequenzvariabilität in Poincaré-Plots und den zeitbasierten Parametern SDNN und RMSSD zu beobachten.

5.1 In-vitro-Präparationen für anatomische Studien, Experimente mit wholemount-Sektionen des Sinusknotens und Isolation von Sinusknoten-Einzelzellen

Die Notwendigkeit der anatomischen Studien mit der Herstellung und Dokumentation von anatomischen Demonstrationsmodellen lag darin begründet, dass sehr viel Erfahrung und operatives Geschick benötigt wird, um verlässlich gute Präparationen mit kleinen Mausherzen von circa einem Zentimeter Größe zu generieren, die nach der Entnahme auch noch einen Strukturverlust mit kollabierenden Gefäßen und Atrien aufweisen. Erschwerend kommt hinzu, dass die Qualität der anschließenden elektrophysiologischen Untersuchung von Gewebepräparationen des Herzens oder des Sinusknotens von der Zeit abhängt, die zwischen dem Tod des Versuchstiers und der Wiederversorgung des Organs nach der Präparation vergeht. Die Organfunktion wird im Experiment selbst mit einer Perfusion mit 37 °C warmer und mit Carbogen begaster physiologischer Lösung für 30 Minuten und länger aufrechterhalten, was beispielsweise bei Experimenten mit whole-mount oder biatrialen Sinusknoten-Präparationen oder Langendorff-Herz-Experimenten der Fall ist.

Die Aneignung dieser Fertigkeiten erfordert viel Übung. Um die berechtigterweise strengen gesetzlichen Regelungen im Bereich des Tierschutzes zu erfüllen, werden vermehrt Anstrengungen unternommen, die die Verwendung von Labortieren ersetzen oder reduzieren, wozu dieser Ansatz in Form der Veröffentlichung als Methodenpaper zur Schulung anderer Experimentatoren beiträgt.

Die Grundidee, Organe und Gefäße mit einer aushärtenden Lösung zu perfundieren, damit diese bei einer Präparation erhalten bleiben, ist schon sehr lange bekannt. Im 19. Jahrhundert gehörte die sogenannte "Corrosion" zu den anatomischen Standardmethoden unter Verwendung von Bienenwachs zur Füllung der Gefäße und anschließender chemischer Entfernung des biologischen Materials mit Kaliumhydroxid ^[54]. Heute werden verschiedene synthetische Materialen wie Silikon, Polyester, Acryl oder Epoxidharz für die Perfusion verwendet ^[55]. Ein Problem von vielen dieser Medien wie auch des verwendeten Epoxidharz Kits von vasQtec ist die hohe Viskosität. Das Risiko, die Herzen mit zu hohem Druck zu überfüllen, zeigte sich in einigen Fällen mit deutlich aufgeblähten Atrien. Zudem war der Endzustand nach dem Aushärten so fest, dass die Herzpräparationen nicht mit den üblichen Präparationswerkzeugen für feines Gewebe durchgeführt werden konnten. Das Erscheinungsbild im Endzustand mit durchscheinender blauer Farbe (siehe Abbildung 8 d,e,f) war nicht optimal. Nur die Identifikation der Sinusknotenarterie war deutlicher als in den gelatinegefüllten Präparationen. Da in der Summe jedoch die Nachteile überwogen, wurde die Epoxidharz-Methode als nicht geeignet für den vorgesehenen Zweck eingestuft und deshalb nicht weiterverfolgt.

Die Verwendung von Gelatine zur Füllung der Herzen hatte hingegen zahlreiche Vorteile. Die Perfusion der Herzen mit der Gelatinelösung war aufgrund der nur leicht erhöhten Viskosität im Vergleich zu PBS gut dosierbar und leicht in der Handhabung. Nicht nur die Gelatine, sondern auch die Gefäße blieben nach dem Aushärten elastisch und leicht beweglich, sodass sowohl die Präparation der Herzen als auch die der whole-mount- und Sinusknoten-Präparationen mit dem Besteck der Standardpräparation durchgeführt werden konnten. Entscheidend war aber das Aussehen der Präparate, da die Gelatine nahezu farblos ist und so authentische Gewebedarstellungen möglich waren. Die Methode war daher

die kostengünstigste und beste Wahl, um die native dreidimensionale Anatomie des Herzens mit der Lage der verschiedenen Gefäße des Herzens zu visualisieren. Sie ist zudem flexibel erweiterbar, um immunhistochemische Färbungen von Organen *in situ* durchzuführen oder dies auch mit einer Acetylcholinesterase-Färbung zu kombinieren, was ermöglicht, die neuronalen Strukturen auf dem Herz von autonomen Ganglien über Nervenfasern bis hin zu einzelnen Neuronen sichtbar zu machen ^[52, 56].

5.2 Grundcharakterisierung des HCN4FEA-Mausmodells mit molekularbiologischen und histologischen Untersuchungen

Zusammenfassend kann mit den Ergebnissen der Grundcharakterisierung des HCN4FEA-Mausmodells bestätigt werden, dass die Punktmutationen im HCN4-Gen zu keiner Aufwärts- oder Abwärtsregulation der Proteinexpression von HCN4 im Vergleich zum WT geführt haben und die anderen Isoformen wie auch das ganze Herz keine kompensatorischen Expressions-veränderungen oder kardiales Remodeling aufweisen.

Die dafür durchgeführte Färbung mit Sirius red/Fast green von ventrikulären Querschnitten zeigte keine Anzeichen pathologischer Fibrosierung und die Durchmesser der Ventrikel waren ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich. Im Rahmen der weiteren Untersuchungen des HCN4FEA-Mausmodells wurden auch Querschnitte von Sinusknotenpräparationen auf diese Weise gefärbt, also dem Gewebe mit der höchsten HCN-Expression im Herz und nach Head-, Body- und Tailregion quantifiziert. Auch dort konnte kein signifikanter Anstieg von Fibrosierung als Zeichen von Remodeling bzw. myozytärer Unordnung in den HCN4FEA-Sinusknoten nachgewiesen werden [45]. Mit den Ergebnissen der qPCR konnte HCN4 als die vorherrschend exprimierte Isoform im Sinusknoten identifiziert werden. Darauf normiert lag die HCN1-Expression bei ungefähr der Hälfte und HCN2 bei zehn Prozent. HCN3 lag in allen Proben unter der Nachweisgrenze. Für keine Isoform gab es signifikante Unterschiede zwischen WT und HCN4FEA. Diese Verteilung entspricht den Resultaten einer anderen Studie^[32], die ebenfalls mit dem Housekeeping-Gen GAPDH das Expressionsprofil für HCN-Kanäle im Sinusknoten wie folgt bestimmt hat: HCN4 59 %, HCN1 34 % und HCN2 7 % sowie 0 % für HCN3. In der Studie wurden aber auch die Expressionslevel der HCN-Isoformen in Atrien und Ventrikeln bestimmt und quantifiziert mit dem Ergebnis, dass die Gesamtmenge an detektierter HCN-RNA im Sinusknoten circa 7,5-mal höher war als in den Ventrikeln und 19- beziehungsweise 16-mal höher als im linken und rechten Atrium. Dies liefert unabhängig von der Wirksamkeit der Antikörper einen Hinweis auf die Western Blot Ergebnisse. Da die verwendete Menge an atrialem und ventrikulärem Gewebe ungefähr der Menge der vereinigten Sinusknoten entsprach und eine definierte Menge an isoliertem Protein anhand der Kalibrierung bei der Gelelektrophorese eingesetzt wurde, sollten die Verhältnisse aus der Quantifizierung der qPCR auch grob auf die Western Blot Analyse anwendbar sein. Dann ist der fehlende Nachweis von HCN4 in Atrien und Ventrikeln aufgrund des deutlich geringeren Gesamtexpressionslevels erwartbar. Die schwächeren Banden von HCN1 in den Atrien waren im Verhältnis zur absoluten Expression sehr deutlich, da HCN1 bei einem Expressionsanteil in den Atrien von circa 65 % umgerechnet nur ein Achtel der Proteinmenge von HCN1 im Sinusknoten aufweisen kann. Die schwach erkennbare Bande für HCN2 in den Ventrikeln entspricht der Gewebeprobe mit der höchsten Kanalexpression, wenn auch auf niedrigem Niveau. Das Vorkommen von HCN2 in den Ventrikeln ist umgerechnet (76 % / 7,5 = 10,1%) etwas mehr als die 7% HCN2 im Sinusknoten. Die schwache Detektion von HCN2 könnte aber auch mit der Wiederverwendung des Western Blots zusammenhängen, da mit der ersten Antikörperinkubation zunächst HCN4 und HCN1 beprobt wurde und durch die Stripping-Prozedur der Verlust von Proteinmaterial in der PVDF-Membran nicht ausgeschlossen immunhistochemischen werden kann. Die Färbungen von ganzen Sinusknotenpräparationen konnten HCN4 in allen Bereichen des Sinusknotens nachweisen. Die HCN1-Detektion war vor allem im Head ausgeprägt, aber mit den Färbungen von Sinusknotenquerschnitten war auch ein geringer Nachweis im Body möglich. Die Problematik mit dem fehlenden Fluoreszenzsignal im Sinusknoten des WT in Body und Tail im Vergleich zur HCN4FEA-Präparation, die jedoch ein hohes Hintergrundsignal aufwies, wurde mit einer Kontrollmessung gelöst. In der Färbung eines Sinusknotens einer HCN1^{-/-}-Knockout-Maus gegen HCN4 und HCN1 wurde für den HCN1-Antikörper ein hohes Hintergrundsignal beziehungsweise unspezifische Bindung im peripheren Fettgewebe sowie intensive rote Cluster in der Sinusknotenregion detektiert, die als Antikörperpräzipitate gedeutet wurden^[52]. Die HCN4-Detektion wies keine Auffälligkeiten auf. Daher muss angenommen werden, dass Bereiche des Sinusknotenpräparats, die in der HCN1-Färbung kein Signal oder eine plötzliche Intensitätsveränderung zeigten, auf Unzulänglichkeiten der Methode zurückzuführen sind. Eine Ursache könnte sein, dass der vollständige Sinusknoten mit den unbeschädigten umgebenden Strukturen wie der Crista terminalis nie vollständig planar auf dem Objektträger liegen konnte, was sowohl bei der Antikörperinkubation als auch bei der Aufnahme im Konfokalmikroskop eine Rolle spielen kann. Auch die Permeabilisierung des Gewebes und damit die Eindringtiefe der Antikörper zu den HCN-positiven Zellen stellt eine Einflussmöglichkeit dar. Dies scheint bei der Färbung und Detektion des weniger stark exprimierten HCN1-Kanals einen Einfluss zu haben. Später wurden diese Experimente durch eine Analyse der flächenmäßigen Proteinverteilung in den Sinusknotenguerschnitten für HCN1 im Verhältnis zu HCN4 in den drei Bereichen des Sinusknotens ergänzt. Die Belichtungswerte wurden dafür so gewählt, dass die unspezifische Bindung der Antikörper ausgeschlossen werden konnte. Die Ergebnisse bestätigten die Aussage, dass keine signifikanten Proteinexpressionsunterschiede von HCN1 und HCN4 im Vergleich der Sinusknoten von WT- und HCN4FEA-Mäusen zu beobachten war. HCN2 spielte eine untergeordnete Rolle, da er nicht im

zentralen Sinusknoten detektiert wurde. Ein schmaler Bereich entlang des Sulcus coronarius und des interatrialen Septums zeigte HCN2-positive Signale (Daten hier nicht gezeigt), was den Ergebnissen anderer Studien entspricht ^[32].

5.3 Elektrophysiologische Untersuchungen von whole-mount-Präparationen und isolierten Sinusknotenzellen

Die elektrophysiologischen Patch-Clamp-Messungen an isolierten Sinusknotenzellen konnten mit den in voltage-clamp-Messungen bestimmten halbmaximalen Aktivierungsspannungen V_{0.5} zeigen, dass die HCN4FEA-Zellen mit 100 μM cAMP keine Verschiebung des V_{0.5} ins Positive aufwiesen im Vergleich zu basalen Messungen ohne cAMP. Im Vergleich dazu wurde der V_{0,5}-Wert bei WT-Zellen mit cAMP um 15,9 mV nach rechts verschoben. Zudem waren die V_{0,5}-Werte mit und ohne cAMP mit HCN4FEA-Sinusknotenzellen positiver als die Messungen von Zellen des WT ohne cAMP. Dies bestätigt die Wirkung der Punktmutationen im HCN4FEA-Mausmodell, die zum einen mit den R669E- und T670A-Mutationen die cAMP-abhängige Modulation der HCN4-Kanäle durch die Bindung in der CNBD blockiert und mit der Y527F-Mutation im C-Linker die Aktivierungskurve parallel zu positiveren Spannungen verschiebt und die Aktivierungskinetik beschleunigt, wie es schon mit überexprimierten HCN4FEA-Kanälen in HEK293-Zellen nachgewiesen wurde ^[45]. Diese Anpassung war notwendig, weil bekannt ist, dass der Verlust der cAMP-abhängigen Modulation von HCN4 allein zum Tod der homozygoten R669^{-/-}-Embryonen nach Tag 11 führt^[41]. Die Messung der WT-HCN4-Kanäle ohne cAMP spiegelt nicht die physiologischen Bedingungen in der Zelle wider, da speziell in den Sinusknotenzellen hohe basale cAMP-Level vorhanden sind und den HCN4-Kanal modulieren, vor allem da in Mäusen ein hoher sympathischer Grundtonus vorhanden ist ^[1, 42-43, 57]. Daher haben weitere Messungen von WTund HCN4FEA-Zellen in perforated-patch unter nativen intrazellulären Bedingungen die in Abbildung 26 dargestellten V_{0,5}-Werte ergeben. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und HCN4FEA-Zellen, wenn basales cAMP die Aktivierungskurve des WT zu positiveren Werten verschiebt, was ursprünglich in damals sogenannten I_h-Einzelkanalmessungen mit zellfreien Membranpatches nachgewiesen wurde ^[58]. Darin wurde auch gezeigt, dass die Verschiebung der Aktivierungskurve keine Auswirkung auf die maximale I_h-Stromantwort hatte, was auch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, da in WT- und HCN4FEA-Zellen mit und ohne cAMP unveränderte maximale Stromamplituden gemessen wurden. Auch die Stromdichte bezogen auf die gemessene Zelloberfläche zeigte keinen Unterschied - weder in der Gesamtheit der Zellen noch in der Aufteilung nach Spindle- und Elongated Zellen.


Abbildung 26 - Halbmaximale Aktivierungsspannungen erweitert um Messungen in perforated-patch. Boxplots zeigen Mittelwerte als offenen Kreis, Medianlinie, 25/75 % Grenze und Min/Max Wert. Adaptiert von ^[45].

Die auf der Netzwerkebene mit den whole-mount-Präparationen durchgeführten Mikroelektrodenmessungen zeigten für die HCN4FEA-Sinusknoten signifikant niedrigere Schlagfrequenzen unter basalen Bedingungen wie auch eine erniedrigte maximale sympathische Stimulation der Schlagfrequenz im Vergleich zum WT. Der prozentuale Anstieg war für beide Gruppen unverändert. Die basalen HCN4FEA-Sinusknoten wiesen eine ausgeprägte Erhöhung der Herzratenvariabilität auf. Dies bestätigte sich mit weiteren elektrophysiologischen Untersuchungen des HCN4FEA-Mausmodells auf allen Ebenen, sodass sich inzwischen ein komplizierter kardialer Phänotyp basierend auf dem Verlust der cAMP-abhängigen Modulation identifizieren ließ^[45]. Die erniedrigten Schlagfrequenzen wurden in den Messungen der in-vitro-Präparationen mit vollständigem Sinusknoten (Langendorff-Herzen^[59]; biatriale Sinusknotenpräparation für opticalimaging-Experimente^[60]) ebenfalls beobachtet. In-vivo-Studien mit telemetrischen EKG-Aufnahmen in einem 72 Stunden-Intervall von sich frei bewegenden Mäusen zeigten auch signifikant erniedrigte durchschnittliche und minimale Herzfrequenzen, was Symptome einer ausgeprägten Bradykardie sind, in Kombination mit einer chronotropen Inkompetenz, da auch im EGK die maximale Herzfrequenz erniedrigt war (siehe Abbildung 27 a und b). Analog zu den Ergebnissen der Experimente in dieser Arbeit war die Regulation der Herzfrequenz dynamisch unverändert, da die Verhältnisse von maximaler und minimaler Herzfrequenz sowie die Variationsbreite erhalten war. Zudem zeigte sich auch eine starke Sinusarrhythmie mit einer hohen Schlag-zu-Schlag-Variabilität wie sie im Poincaré-Diagramm der RR-Abstände des gesamten 72 Stunden-Intervalls mit der kometengleichen Wolke der HCN4FEA-Maus in Abbildung 27 c zu sehen ist. An der Form des Poincaré-Diagramms wird auch deutlich, dass die Fluktuationen vor allem bei einer niedrigen Herzfrequenz, also großen RR-Werten,



Abbildung 27 – Telemetrische EKG Aufnahmen eines 72 Stunden Intervalls von sich frei bewegenden Mäusen mit einem 12h/12h Tag- Nacht-Rhythmus. (a) Gemittelte, minimale und maximale Herzfrequenz (WT n = 9, HCN4FEA n = 11); (b) Histogramme der Herzfrequenz einer WT (hellgrau) und HCN4FEA Maus (orange); (c) Poincaré Diagramm der RR-Intervalle einer WT (schwarz) und HCN4FEA Maus (orange). Adaptiert nach [45].

ausgeprägt war und bei einer Frequenzsteigerung abnahmen. Die Fluktuationen spiegelten sich auch in einer signifikanten Erhöhung der zeitbasierten und frequenzbasierten Parameter in der Herzratenvariabilitätsanalyse wider.

Um einzugrenzen, ob die Fluktuationen durch die Einflüsse des vegetativen Nervensystems oder vom Sinusknotennetzwerk selbst kamen, wurde eine Blockade der autonomen Regulation mit einem pharmakologischen Ansatz getestet. Das Ausschalten der sympathischen Einflüsse mit dem Betablocker Propranolol reduzierte die Fluktuationen der Herzfrequenz in einer telemetrischen EKG-Aufnahme einer HCN4FEA-Maus. Diese konnten weiter reduziert werden mit der Injektion von Atropin, einem Antagonisten der M₂-Rezeptoren, welche die parasympathischen Einflüsse auf den I_h-Strom bewirken ^[61]. Zudem zeigten in-vitro-Langendorff-Präparationen mit erhaltenem Nervus vagus mit dessen Stimulation, dass die HCN4FEA-Herzen mit kurzen, ausgeprägten Bradykardien in Form von sehr langsamer Schlagfrequenz oder sogar Sinuspausen reagierten, bevor sie sich erholten. Bei WT-Herzen wurde eine deutliche, aber stabile Reduktion der Schlagfrequenz beobachtet. In Kombination mit weiteren optical-imaging-Experimenten zur Lokalisation des führenden Schrittmachers konnte daraus geschlossen werden, dass die cAMP-abhängige Modulation von HCN4 einen stark dämpfenden und antagonistischen Effekt auf die parasympathischen Einflüsse des Nervus Vagus hat und *in vivo* für einen sauberen Übergang zu niedrigeren Herzfrequenzen verantwortlich ist.

Dies deutet darauf hin, dass die Einflüsse des vegetativen Nervensystems für einen Großteil der beobachteten Fluktuationen verantwortlich sind. Da diese aber selbst nach der Blockade ausgeprägter als in WT-Mäusen waren und auch in den in-vitro-Sinusknotenpräparationen wie in dieser Arbeit in geringerem Maß ohne aktives vegetatives Nervensystem nachzuweisen waren, verblieb eine von äußeren Einflüssen unabhängige, intrinsische Sinusknotendysfunktion. Eine Erklärung dafür konnte mit langen perforated-patch-Messungen von isolierten Sinusknotenzellen erhalten werden ^[59, 62]. In kontinuierlichen Aktionspotentialmessungen nahmen die HCN4FEA-Zellen einen bislang unbekannten "nonfiring" Zustand ein, der bis zu einer Minute anhielt, bevor diese wieder anfingen zu schlagen. Zudem war in den meisten Zellen, während sie schlugen, eine zunehmende Hyperpolarisierung des maximalen diastolischen Potentials zu beobachten. Dies verschob sich während der "nonfiring" Phase wieder zu positiveren Werten. Der "nonfiring" Zustand war deutlich seltener auch in WT-Zellen zu beobachten, aber pharmakologisch mit der Blockade der CNBD mit TAT-TRIP8b_{nano} induzierbar. Dies resultierte in "nonfiring" Zuständen mit einer stärkeren Ausprägung als in den HCN4FEA-Zellen. Die Einflüsse des vegetativen Nervensystems konnten pharmakologisch an den Einzelzellen simuliert werden. Die Gabe von Carbachol als Parasympathomimetikum mit einer Verringerung der cAMP-Konzentration induzierte sowohl in WT- wie auch HCN4FEA-Zellen den "nonfiring" Zustand. Die sympathische Stimulation mit Isoprenalin und der Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration verringerte das Vorkommen des "nonfiring" Zustand in WT-Zellen vollständig und in HCN4FEA-Zellen reduzierte es sich deutlich.

Das bedeutet, dass der Wechsel zwischen dem aktiven und dem "nonfiring" Zustand mit der cAMPabhängigen Modulation in WT-Zellen effektiver kontrolliert werden kann. Daher erfolgt die Anpassung der Herzfrequenz unter Einbeziehung der chronotropen Regulation des "nonfiring" Zustands präziser und mit einer höheren Reserve im dynamischen Umfang. Im HCN4FEA-Sinusknoten ist die Fraktion der "nonfiring" Zellen größer und mangels cAMP-abhängiger Modulation unfähig, adäquat auf die Einflüsse des vegetativen Nervensystems und insbesondere des Nervus vagus zu reagieren, was in überschießenden Antworten der Herzfrequenz, Bradykardie und erhöhten Schlag-zu-Schlag-Fluktuationen mündet. Die intakte cAMP-abhängige Modulation von HCN4 ist deshalb entscheidend für die stabile und dämpfende Anpassung der Herzfrequenz im Sinusknotennetzwerk durch Einflüsse des vegetativen Nervensystems, ohne selbst Auswirkung auf die Herzfrequenz Regulation oder den chronotropen Effekt zu haben. Die verantwortlichen Ionenkanäle dafür sind noch Gegenstand aktueller Forschung mit Hinweisen auf die Beteiligung von Bestandteilen der sogenannten "Ca²⁺ clock" ^[12, 45, 63].

6 Zusammenfassung

Der Sinusknoten stellt den primären Schrittmacher im Herzen dar, der unter physiologischen Bedingungen der Ausgangsort für den autonomen Herzschlag ist. In Schrittmacherzellen werden spontane elektrische Erregungen generiert, die in den Zellen rhythmische und regelmäßige Aktionspotentiale auslösen. Die SDD der Schrittmacherzellen wird vom I_h-Strom ausgelöst, der vorwiegend über HCN4-Kanäle vermittelt wird. Diese werden nicht nur durch Hyperpolarisation aktiviert, sondern deren Aktivierungskurve kann auch durch die Bindung von cAMP moduliert werden. Die genaue Rolle der cAMP-abhängigen Modulation des HCN4-Kanals für den Herzschlag ist bislang jedoch ungeklärt.

Um untersuchen zu können, wie sich die Einflüsse des vegetativen Nervensystems auf die HCN4-Kanäle über die cAMP-abhängige Modulation auswirken, wurde in dieser Arbeit ein genetisch verändertes Mausmodell verwendet, dessen HCN4-Kanäle eine blockierte Bindungsstelle für cAMP und andere zyklische Nukleotide aufweist.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde das HCN4FEA-Mausmodell mit anatomischen, molekularbiologischen und elektrophysiologischen Untersuchungen die Eigenschaften des Sinusknotens sowie des Schrittmacherkanals HCN4 charakterisiert. Die dafür etablierten, optimierten und dokumentierten in-vitro-Präparationsmethoden mit gelatinegefüllten Herzen ermöglichten eine präzise Lokalisation des Sinusknotens. Zudem dienten die reproduzierbaren Präparationen von kardialem Gewebe und Zellen als Grundlage für die Untersuchungen von potenziellen Unterschieden zwischen WT-Mäusen und dem HCN4FEA-Mausmodell.

Die Grundcharakterisierung zeigte in der qPCR-Analyse, der Western Blot Analyse und in der histologischen Untersuchung von ventrikulären Querschnitten keine Veränderungen der Expression keine für kardiales des mutierten HCN4-Kanals und Anzeichen Remodeling. Die immunhistochemischen Färbungen bestätigten die unveränderte Lokalisation der HCN-Kanäle im Sinusknoten der HCN4FEA-Mäuse. Elektrophysiologische Untersuchungen an isolierten Sinusknotenzellen konnten mit Patch-Clamp-Experimenten den Verlust der Modulation durch cAMP im Mausmodell bestätigen bei ansonsten unveränderter Stromamplitude und -dichte auch in Bezug auf einzelne Zelltypen. Die auf der Netzwerkebene mit den whole-mount-Präparationen durchgeführten Mikroelektrodenmessungen zeigten für die HCN4FEA-Sinusknoten signifikant niedrigere Schlagfrequenzen unter basalen Bedingungen wie auch eine erniedrigte maximale sympathische Stimulation der Schlagfrequenz im Vergleich zum WT. Weitere umfangreiche Untersuchungen von Mitgliedern der Arbeitsgruppe konnten einen komplizierten kardialen Phänotyp des Mausmodells charakterisieren und einen bislang unbekannten "nonfiring" Zustand der Schrittmacherzellen identifizieren, der bis zu einer Minute anhielt, bevor die Zellen wieder anfingen zu schlagen. Die Anpassung der Herzfrequenz mit der chronotropen Regulation auch über den "nonfiring" Zustand erfolgt präziser und mit einer höheren Reserve im dynamischen Umfang. Daher ist die intakte cAMP-abhängige Modulation von HCN4 entscheidend für die stabile und dämpfende Anpassung der Herzfrequenz im Sinusknotennetzwerk durch Einflüsse des vegetativen Nervensystems.

7 Literaturverzeichnis

- [1] M. E. Mangoni, J. Nargeot, 'Genesis and regulation of the heart automaticity', *Physiol Rev* 2008, *88*, 919-982.
- [2] T. Munzel, O. Hahad, T. Gori, S. Hollmann, N. Arnold, J. H. Prochaska, A. Schulz, M. Beutel, N. Pfeiffer, I. Schmidtmann, K. J. Lackner, J. F. Keaney, Jr., P. S. Wild, 'Heart rate, mortality, and the relation with clinical and subclinical cardiovascular diseases: results from the Gutenberg Health Study', *Clin Res Cardiol* 2019, *108*, 1313-1323.
- [3] A. Keith, M. Flack, 'The Form and Nature of the Muscular Connections between the Primary Divisions of the Vertebrate Heart', *J Anat Physiol* 1907, *41*, 172-189.
- [4] J. Liu, H. Dobrzynski, J. Yanni, M. R. Boyett, M. Lei, 'Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels', *Cardiovasc Res* 2007, *73*, 729-738.
- [5] M. R. Boyett, H. Honjo, I. Kodama, 'The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure', *Cardiovasc Res* 2000, *47*, 658-687.
- V. V. Fedorov, R. B. Schuessler, M. Hemphill, C. M. Ambrosi, R. Chang, A. S. Voloshina, K. Brown,
 W. J. Hucker, I. R. Efimov, 'Structural and functional evidence for discrete exit pathways that connect the canine sinoatrial node and atria', *Circ Res* 2009, *104*, 915-923.
- [7] T. Nikolaidou, O. V. Aslanidi, H. Zhang, I. R. Efimov, 'Structure-function relationship in the sinus and atrioventricular nodes', *Pediatr Cardiol* 2012, *33*, 890-899.
- [8] E. E. Verheijck, M. J. van Kempen, M. Veereschild, J. Lurvink, H. J. Jongsma, L. N. Bouman, 'Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution', *Cardiovasc Res* 2001, *52*, 40-50.
- [9] D. Sanchez-Quintana, J. A. Cabrera, J. Farre, V. Climent, R. H. Anderson, S. Y. Ho, 'Sinus node revisited in the era of electroanatomical mapping and catheter ablation', *Heart* 2005, *91*, 189-194.
- [10] T. Opthof, 'The mammalian sinoatrial node', *Cardiovasc Drugs Ther* 1988, *1*, 573-597.
- [11] K. Hennis, M. Biel, C. Wahl-Schott, S. Fenske, 'Beyond pacemaking: HCN channels in sinoatrial node function', *Prog Biophys Mol Biol* 2021.
- [12] K. Hennis, R. D. Rotzer, C. Piantoni, M. Biel, C. Wahl-Schott, S. Fenske, 'Speeding Up the Heart? Traditional and New Perspectives on HCN4 Function', *Front Physiol* 2021, *12*, 669029.

- [13] S. Y. Ho, D. Sanchez-Quintana, 'Anatomy and pathology of the sinus node', *J Interv Card Electrophysiol* 2016, *46*, 3-8.
- [14] O. Monfredi, H. Dobrzynski, T. Mondal, M. R. Boyett, G. M. Morris, 'The anatomy and physiology of the sinoatrial node--a contemporary review', *Pacing Clin Electrophysiol* 2010, *33*, 1392-1406.
- E. E. Verheijck, A. Wessels, A. C. van Ginneken, J. Bourier, M. W. Markman, J. L. Vermeulen, J. M. de Bakker, W. H. Lamers, T. Opthof, L. N. Bouman, 'Distribution of atrial and nodal cells within the rabbit sinoatrial node: models of sinoatrial transition', *Circulation* 1998, *97*, 1623-1631.
- [16] S. D. Unudurthi, R. M. Wolf, T. J. Hund, 'Role of sinoatrial node architecture in maintaining a balanced source-sink relationship and synchronous cardiac pacemaking', *Front Physiol* 2014, 5, 446.
- [17] S. Fenske, S. C. Krause, S. I. Hassan, E. Becirovic, F. Auer, R. Bernard, C. Kupatt, P. Lange, T. Ziegler, C. T. Wotjak, H. Zhang, V. Hammelmann, C. Paparizos, M. Biel, C. A. Wahl-Schott, 'Sick sinus syndrome in HCN1-deficient mice', *Circulation* 2013, *128*, 2585-2594.
- [18] S. Fenske, R. Probstle, F. Auer, S. Hassan, V. Marks, D. H. Pauza, M. Biel, C. Wahl-Schott, 'Comprehensive multilevel in vivo and in vitro analysis of heart rate fluctuations in mice by ECG telemetry and electrophysiology', *Nat Protoc* 2016, *11*, 61-86.
- [19] A. V. Glukhov, A. Kalyanasundaram, Q. Lou, L. T. Hage, B. J. Hansen, A. E. Belevych, P. J. Mohler, B. C. Knollmann, M. Periasamy, S. Gyorke, V. V. Fedorov, 'Calsequestrin 2 deletion causes sinoatrial node dysfunction and atrial arrhythmias associated with altered sarcoplasmic reticulum calcium cycling and degenerative fibrosis within the mouse atrial pacemaker complex1', *Eur Heart J* 2015, *36*, 686-697.
- [20] M. R. Boyett, "And the beat goes on.' The cardiac conduction system: the wiring system of the heart', *Exp Physiol* 2009, *94*, 1035-1049.
- [21] A. V. Glukhov, V. V. Fedorov, M. E. Anderson, P. J. Mohler, I. R. Efimov, 'Functional anatomy of the murine sinus node: high-resolution optical mapping of ankyrin-B heterozygous mice', Am J Physiol Heart Circ Physiol 2010, 299, H482-491.
- [22] R. B. Schuessler, J. P. Boineau, B. I. Bromberg, 'Origin of the sinus impulse', *J Cardiovasc Electrophysiol* 1996, *7*, 263-274.
- [23] D. H. Pauza, K. Rysevaite, H. Inokaitis, M. Jokubauskas, A. G. Pauza, K. E. Brack, N. Pauziene, 'Innervation of sinoatrial nodal cardiomyocytes in mouse. A combined approach using immunofluorescent and electron microscopy', J Mol Cell Cardiol 2014, 75, 188-197.

- [24] J. Behar, A. Ganesan, J. Zhang, Y. Yaniv, 'The Autonomic Nervous System Regulates the Heart Rate through cAMP-PKA Dependent and Independent Coupled-Clock Pacemaker Cell Mechanisms', *Front Physiol* 2016, *7*, 419.
- [25] H. F. Brown, D. DiFrancesco, S. J. Noble, 'How does adrenaline accelerate the heart?', *Nature* 1979, *280*, 235-236.
- [26] D. DiFrancesco, 'The contribution of the 'pacemaker' current (if) to generation of spontaneous activity in rabbit sino-atrial node myocytes', *J Physiol* 1991, *434*, 23-40.
- [27] A. Ludwig, X. Zong, M. Jeglitsch, F. Hofmann, M. Biel, 'A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels', *Nature* 1998, *393*, 587-591.
- [28] C. Wahl-Schott, M. Biel, 'HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function', *Cell Mol Life Sci* 2009, *66*, 470-494.
- [29] C. Wahl-Schott, S. Fenske, M. Biel, 'HCN channels: new roles in sinoatrial node function', *Curr Opin Pharmacol* 2014, *15*, 83-90.
- [30] Z. M. James, W. N. Zagotta, 'Structural insights into the mechanisms of CNBD channel function', *J Gen Physiol* 2018, *150*, 225-244.
- [31] W. N. Zagotta, N. B. Olivier, K. D. Black, E. C. Young, R. Olson, E. Gouaux, 'Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels', *Nature* 2003, *425*, 200-205.
- [32] S. Herrmann, B. Layh, A. Ludwig, 'Novel insights into the distribution of cardiac HCN channels: an expression study in the mouse heart', *J Mol Cell Cardiol* 2011, *51*, 997-1006.
- [33] B. Much, C. Wahl-Schott, X. Zong, A. Schneider, L. Baumann, S. Moosmang, A. Ludwig, M. Biel, 'Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels', *J Biol Chem* 2003, *278*, 43781-43786.
- [34] J. Chen, J. S. Mitcheson, M. Lin, M. C. Sanguinetti, 'Functional roles of charged residues in the putative voltage sensor of the HCN2 pacemaker channel', *J Biol Chem* 2000, *275*, 36465-36471.
- [35] X. Zong, S. Krause, C. C. Chen, J. Kruger, C. Gruner, X. Cao-Ehlker, S. Fenske, C. Wahl-Schott, M. Biel, 'Regulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel activity by cCMP', *J Biol Chem* 2012, *287*, 26506-26512.
- [36] L. Zhou, S. A. Siegelbaum, 'Gating of HCN channels by cyclic nucleotides: residue contacts that underlie ligand binding, selectivity, and efficacy', *Structure* 2007, *15*, 655-670.

- [37] X. Xu, Z. V. Vysotskaya, Q. Liu, L. Zhou, 'Structural basis for the cAMP-dependent gating in the human HCN4 channel', *J Biol Chem* 2010, *285*, 37082-37091.
- [38] C. H. Lee, R. MacKinnon, 'Structures of the Human HCN1 Hyperpolarization-Activated Channel', *Cell* 2017, *168*, 111-120 e111.
- [39] D. A. Doyle, J. Morais Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, R. MacKinnon, 'The structure of the potassium channel: molecular basis of K+ conduction and selectivity', *Science* 1998, 280, 69-77.
- [40] A. Scharr, 'Ein genetischer Ansatz zur Analyse der cAMP-abhängigen Modulation des Schrittmacherkanals HCN4', Disseration, Ludwig-Maximilians-Universität (München), 2011.
- [41] D. Harzheim, K. H. Pfeiffer, L. Fabritz, E. Kremmer, T. Buch, A. Waisman, P. Kirchhof, U. B. Kaupp, R. Seifert, 'Cardiac pacemaker function of HCN4 channels in mice is confined to embryonic development and requires cyclic AMP', *The EMBO Journal* 2008, *27*, 692-703.
- T. M. Vinogradova, A. E. Lyashkov, W. Zhu, A. M. Ruknudin, S. Sirenko, D. Yang, S. Deo, M. Barlow, S. Johnson, J. L. Caffrey, Y.-Y. Zhou, R.-P. Xiao, H. Cheng, M. D. Stern, V. A. Maltsev, E. G. Lakatta, 'High Basal Protein Kinase A–Dependent Phosphorylation Drives Rhythmic Internal Ca 2+ Store Oscillations and Spontaneous Beating of Cardiac Pacemaker Cells', *Circulation Research* 2006, *98*, 505-514.
- [43] R. V. Iancu, G. Ramamurthy, S. Warrier, V. O. Nikolaev, M. J. Lohse, S. W. Jones, R. D. Harvey, 'Cytoplasmic cAMP concentrations in intact cardiac myocytes', *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2008, *295*, C414-C422.
- [44] S. Herrmann, J. Stieber, G. Stockl, F. Hofmann, A. Ludwig, 'HCN4 provides a 'depolarization reserve' and is not required for heart rate acceleration in mice', *EMBO J* 2007, *26*, 4423-4432.
- [45] S. Fenske, K. Hennis, R. D. Rotzer, V. F. Brox, E. Becirovic, A. Scharr, C. Gruner, T. Ziegler, V. Mehlfeld, J. Brennan, I. R. Efimov, A. G. Pauza, M. Moser, C. T. Wotjak, C. Kupatt, R. Gonner, R. Zhang, H. Zhang, X. Zong, M. Biel, C. Wahl-Schott, 'cAMP-dependent regulation of HCN4 controls the tonic entrainment process in sinoatrial node pacemaker cells', *Nat Commun* 2020, *11*, 5555.
- [46] M. Bunting, K. E. Bernstein, J. M. Greer, M. R. Capecchi, K. R. Thomas, 'Targeting genes for selfexcision in the germ line', *Genes Dev* 1999, *13*, 1524-1528.
- [47] O. N. P. Nguyen, 'Molecular characterization of the interaction between peripherin-2 and opsins in rod and cone photoreceptors', Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität (München), 2016.
- [48] M. M. Bradford, 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Anal Biochem* 1976, *72*, 248-254.

- [49] M. W. Pfaffl, 'A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR', *Nucleic Acids Research* 2001, *29*, 45e-45.
- [50] T. Brattelid, L. H. Winer, F. O. Levy, K. Liestøl, O. M. Sejersted, K. B. Andersson, 'Reference gene alternatives to Gapdh in rodent and human heart failure gene expression studies', *BMC Molecular Biology* 2010, *11*, 22.
- [51] C. Segnani, C. Ippolito, L. Antonioli, C. Pellegrini, C. Blandizzi, A. Dolfi, N. Bernardini, 'Histochemical Detection of Collagen Fibers by Sirius Red/Fast Green Is More Sensitive than van Gieson or Sirius Red Alone in Normal and Inflamed Rat Colon', *PLOS ONE* 2015, 10, e0144630.
- [52] R. D. Rotzer, 'Die Rolle des HCN4-Kanals für die Schrittmacherfunktion des Sinusknotens Charakterisierung eines Mausmodells', Masterarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität (München), 2017.
- [53] S. L. Raetz, C. A. Richard, A. Garfinkel, R. M. Harper, 'Dynamic Characteristics of Cardiac R-R Intervals during Sleep and Waking States', *Sleep* 1991, *14*, 526-533.
- [54] J. Hyrtl, '*Die Corrosions-Anatomie und ihre Ergebnisse: mit 18 chromolithographirten Tafeln'*, Wilhelm Braumüller, Wien, 1873.
- [55] R. J. Rueda Esteban, J. S. López Mccormick, D. R. Martínez Prieto, J. D. Hernández Restrepo, 'Corrosion Casting, a Known Technique for the Study and Teaching of Vascular and Duct Structure in Anatomy', *International Journal of Morphology* 2017, *35*, 1147-1153.
- [56] D. H. Pauza, K. Rysevaite-Kyguoliene, J. Vismantaite, K. E. Brack, H. Inokaitis, A. G. Pauza, V. Rimasauskaite-Petraitiene, J. I. Pauzaite, N. Pauziene, 'A combined acetylcholinesterase and immunohistochemical method for precise anatomical analysis of intrinsic cardiac neural structures', Annals of Anatomy Anatomischer Anzeiger 2014, 196, 430-440.
- [57] J. Gehrmann, P. E. Hammer, C. T. Maguire, H. Wakimoto, J. K. Triedman, C. I. Berul, 'Phenotypic screening for heart rate variability in the mouse', *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000, *279*, H733-740.
- [58] D. Difrancesco, M. Mangoni, 'Modulation of single hyperpolarization-activated channels (i(f)) by cAMP in the rabbit sino-atrial node', *The Journal of Physiology* 1994, 474, 473-482.
- [59] R. D. Rötzer, Dissertation (unveröffentlicht), Ludwig-Maximilans-Universität (München), 2021.
- [60] V. F. Brox, 'Optical and electrophysiological approaches to examine the role of cAMPdependent regulation of the sinoatrial pacemaker channel HCN4.', Dissertation, Ludwig-Maximilans-Universität (München), 2019.

- [61] D. Difrancesco, C. Tromba, 'Muscarinic control of the hyperpolarization-activated current (if) in rabbit sino-atrial node myocytes', *The Journal of Physiology* 1988, *405*, 493-510.
- [62] K. Hennis, Dissertation (unveröffentlicht), Ludwig-Maximilans-Universität (München), 2021.
- [63] E. G. Lakatta, V. A. Maltsev, T. M. Vinogradova, 'A coupled SYSTEM of intracellular Ca2+ clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker', *Circ Res* 2010, *106*, 659-673.

8 Abkürzungsverzeichnis

Ao	Aorta
ATP	Adenosintriphosphat
AV- Knoten	Atrioventrikular-Knoten
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cCMP	zyklisches Cytosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CNBD	cyclic nucleotide binding domain
GAPDH	murine Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GIRK1	G-Protein-gekoppelter einwärts gleichrichtender Kaliumkanal 1
GIRK4	G-Protein-gekoppelter einwärts gleichrichtender Kaliumkanal 4
HCN	Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated
HE	
l _f	funny current
I _h	hyperpolarization current
IVC	Vena cava inferior
LAA	Linkes Herzohr
LCCA	Linke Arteria carotis communis
LCV	Linke Kranialvene
LSA	Siehe, Linke Arteria subclavia
LV	Linker Ventrikel
M ₂ -Rezeptor	muskarinischer Acetylcholinrezeptor 2
mALAS	murine Delta-Aminolävulinatsynthase Synthase 1
MDP	maximales diastolisches Potential
mV	
nA	Nanoampère
OTC	optimum cutting temperature
РА	Siehe, Pulmonal Arterien
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
РКА	Proteinkinase A

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Der Sinusknoten als primärer Schrittmacher im Herz mit einem Schema der Innervation
Abbildung 2 - Schematische Zeichnung eines Herzens mit Erregungsleitungssystem (links) und der Darstellung der Aktionspotential Morphologie (rechts) für verschiedene Regionen des Herzens entsprechend des zeitlichen Ablaufs
Abbildung 3 - Schematische Darstellung einer HCN-Kanal Untereinheit bestehend aus sechs α-helikalen Transmembransegmenten (grau, 1-6) und dem intrazellulären N- und C-Terminus
Abbildung 4 - Schematische Darstellung des HCN4-Kanals und den drei Punktmutationen des HCN4FEA- Mausmodells
Abbildung 5 – Targeting Strategie zur Generierung des HCN4FEA Knock-In Mausmodells
Abbildung 6 - Sektion der Maus und Präparation des Herzens
Abbildung 7 – Anatomische Lokalisation des Sinusknotens und whole-mount-Sinusknoten-Präparationen mit Gelatinelösung (a-c), vasQtec Epoxidharz kit (d-f) und reguläre Präparationen wie sie für Experimente verwendet werden
Abbildung 8 – Ventrale Ansicht der Herzbasis eines mit Gelatine gefüllten Herzens
Abbildung 9 - Sektion eines mit Gelatine perfundierten Herzens für eine whole-mount-Sinusknoten (SAN)- Präparation
Abbildung 10 - Whole-mount-Präparation eines Sinusknotens in endokardialer Ansicht nach oben mit rechtem
Atrium (links) und Sinusknotenarterie (Verlauf zwischen den weißen Pfeilen)
Abbildung 11 – SAN-Präparation eines regulären Herzens
Abbildung 12 - Sektion eines mit Gelatine perfundierten Herzens mit einer Schritt-für-Schritt SAN-Präparation.
Abbildung 13 - Isolierte Sinusknotenzellen und einzelne Subtypen
Abbildung 14 - Quantitative PCR-Analyse der HCN-Kanal Transkripte in Sinusknoten von WT- und HCN4FEA- Mäusen für alle vier Isoformen
Abbildung 15 – HCN-Kanal-Proteinexpression aus Membranpräparationen von Sinusknoten (SAN), Atrium und
linkem ventrikei (LV) aus WT und HCN4FEA (KI) Herzen

Abbildung 16 – Histologische Färbungen von ventrikulären Cryo-Querschnitten von WT (oben) und HCN4FEA
(unten) mit Hämatoxilin und Eosin (rechts) und Fibrosierung (Sirius red/Fast green) links mit
Vergrößerungen davon in der Mitte 55
Abbildung 17- Sinusknotenpräparate von WT und HCN4FEA mit immunhistochemischen Färbungen gegen
HCN1 und HCN4
Abbildung 18 – Sinusknoten-Querschnitte einer WT-Präparation mit immunhistochemischen Färbungen gegen
HCN1 und HCN4 für Head. Body und Tail
Abbildung 19 – Voltage-clamp-Einzelzellmessungen von isolierten Sinusknotenzellen
Abbildung 20 - Stromamplituden (oben) und Stromdichte (unten) für alle Zellen und für die Subtypen
Elongated- und Spindle-Zellen
Abbildung 21 – Epikardiale Ansicht einer whole-mount-SAN-Präparation während einer Mikroelektroden-
Messung (Mikroelektrode horizontaler Schatten) mit Lokalisation nahe der noch blutgefüllten
Sinusknotenarterie (Verlauf markiert mit weißen Pfeilen)
Abbildung 22 - Mikroelektrodenmessungen an whole-mount-Präparationen des Sinusknotens
Abbildung 23 - Tachogramme von WT und HCN4FEA Mikroelektrodenmessungen mit 30 s Abschnitten aus der
Kontrollphase in Tyrode III und unter Perfusion mit zunächst 0,1 nM Isoprenalin gefolgt von 1 μ M
Isoprenalin
Abbildung 24 – Gemittelte Schlagfrequenz von Mikroelektrodenmessungen an whole-mount-Praparationen des
Sinusknotens unter basalen Bedingungen mit Tyrode III Lösung und unter Einwirkung von 0,1 nM bzw.
1 μM Isoprenalin (Iso)65
Abbildung 25 – Gemittelte NN-Werte von Mikroelektrodenmessungen an whole-mount-Präparationen des
Sinusknotens, Standard-Abweichung der NN-Intervalle (SDNN) und Root Mean Square of Successive
Differences (RMSSD) unter basalen Bedingungen mit Tyrode III Lösung und unter Einwirkung von 1 μ M
Isoprenalin.
Abbildung 26 - Halbmaximale Aktivierungsspannungen erweitert um Messungen in perforated-patch
Abbildung 27 – Telemetrische EKG Aufnahmen eines 72 Stunden Intervalls von sich frei bewegenden Mäusen
mit einem 12h/12h Tag- Nacht-Rhythmus

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - PCR Reaktionsansatz für die Genotypisierung	. 21
Tabelle 2 - PCR Protokoll	. 21
Tabelle 3 – Materialien für die Herz und Sinusknotenpräparation	. 22
Tabelle 4 - Lösungen für die Herz- und Sinusknotenpräparation	. 24
Tabelle 5 - Zusammensetzung der Aliquots der Verdauungsenzyme	. 24
Tabelle 6 - qPCR Primersequenzen	. 27
Tabelle 7 - Lösungen für die Membranpräparation.	. 28
Tabelle 8 - Lösungen für die SDS-PAGE	. 28
Tabelle 9 - Western Blot Lösungen	. 29
Tabelle 10 - Western Blot Analyse Primär- und Sekundärantikörper	. 29
Tabelle 11 - Primär- und Sekundärantikörper der immunhistochemischen Färbungen	. 33
Tabelle 12 – Materialien für die elektrophysiologischen Untersuchungen	. 34
Tabelle 13 - Lösungen für die Patch Clamp Experimente mit Sinusknoten Einzelzellen	. 35

11 Anhang

11.1 Datentabellen

Alle Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM) sofern nicht anders angegeben.

Parameter	WT			n (SANs)	HCN4FEA			n (SANs)	two-sided t- test	p-value
HCN1 (ALAS)	0,482	±	0,104	6	0,405	±	0,092	6	ns	0,5921
HCN2 (ALAS)	0,088	±	0,025	6	0,101	±	0,023	6	ns	0,7102
HCN4 (ALAS)	1,061	±	0,162	6	1,114	±	0,213	6	ns	0,8468
HCN1 (GAPDH)	0,480	±	0,101	6	0,560	±	0,168	6	ns	0,6914
HCN2 (GAPDH)	0,088	±	0,026	6	0,132	±	0,031	6	ns	0,3115
HCN4 (GAPDH)	1,036	±	0,122	6	1,40	±	0,286	6	ns	0,2697

qRT-PCR mit den Houskeeping Genen ALAS und GAPDH

Ventrikuläre Herzschnitte: HE staining mit Bestimmung der Durchmesser

Parameter	WT			n (Herzen)	нс	N4F	EA	n (Herzen)	two-sided t- test	p-value
Ventrikuläre Durchmesser [mm]	7,398	±	0,362	6	8,455	±	0,431	6	ns	0,0898

Sinusknoten Einzelzellmessungen: IV-Kurven

Parameter	WT w/o cAMP			n	W	۲ cA	MP	n	HCN4FEA w/o cAMP			n	HCN4FEA cAMP		n	
V _{0.5} [mV]	-115,16	±	2,22	8	-99,23	±	1,97	8	-107,08	±	1,89	16	-109,78	±	0,93	4
k [pA/mV]	16,19	±	1,34	8	12,95	±	4,08	8	14,61	±	2,61	16	13,72	±	0,5	4

	Anzahl	Stromamplitude (N	/ _m -150 mV)	Oberfläche		Stromdichte (te (V _m -150 mV)		
Alle Zellen	n	Mittelwert (nA)	SEM (nA)	Mittelwert (μm²)	SEM (μm²)	Mittelwert (pA/μm²)	SEM (pA/μm²)		
WT	25	-2,18143	0,13047	607,73304	38,36156	3,7487	0,23202		
HCN4FEA	17	-2,03164	0,15234	729,25218	60,90811	3,06453	0,34605		
WT cAMP	11	-2,02029	0,24138	621,92591	51,6465	3,2447	0,24435		
HCN4FEA cAMP	7	-1,91003	0,2481	525,76114	83,04447	3,8141	0,48329		
Elongated									
WT	12	-1,29322	0,1579	701,12842	59,06203	1,87472	0,18434		
HCN4FEA	7	-1,2181	0,17394	670,27843	81,26004	1,93177	0,36337		
WT cAMP	4	-1,57595	0,7916	674,40375	160,49043	2,37692	0,79592		
HCN4FEA cAMP	3	-1,50321	0,34282	551,843	120,6739	2,95783	0,88558		
Spindle									
WT	16	-2,31479	0,15808	628,35556	44,35535	3,77226	0,20449		
HCN4FEA	11	-2,22378	0,18111	664,02891	55,22972	3,58003	0,42849		
WT cAMP	11	-1,80294	0,15078	677,62791	56,20796	2,84222	0,31105		
HCN4FEA cAMP	5	-2,03903	0,28561	563,0494	114,74782	3,90272	0,60764		

Sinusknoten Einzelzellmessungen: Stromamplitude, Zelloberfläche und Stromdichte

Mikroelektrodenmessungen an whole-mount-Präparationen

Parameter	neter WT in Tyrode III n WT mit 1 µM Iso						Iso	n	
Herzrate [1/Min]	232,83	±	2,60		6	322,5	±	11,19	6
NN [ms]	257,40	±	3,34		5	177,13	±	2,63	5
SDNN [ms]	2,04	±	0,31	0,31		3,96	±	1,34	5
RMSSD [ms]	2,74	±	0,79		5	1,90	0,78	5	
Parameter	Parameter HCN4FEA in Tyrode III n HCN4FEA mit 1 μM I				ıM Iso	Iso			
Herzrate [1/Min]	204,6	±	5,60		5	269,4	±	11,63	5
NN [ms]	302,74	±	11,70		3	222,35	±	16,94	3
SDNN [ms]	15,47	±	4,17		3	3 2,80 ± 1		1,00	3
RMSSD [ms]	D [ms] 19,34 ± 6,89 3 4,11 ±		1,91	3					
Parameter	meter WT in Tyrode III mit 0,1 nM Iso n				HCN4FEA in Tyrode mit mit 0,1 nM Iso			1 nM Iso	n
Herzrate [1/Min]	226,5	±	5,58 6		195,2	2	±	4,87	5

11.2 Veröffentlichungen

S. Fenske, K. Hennis, R. D. Rotzer, V. F. Brox, E. Becirovic, A. Scharr, C. Gruner, T. Ziegler, V. Mehlfeld,
J. Brennan, I. R. Efimov, A. G. Pauza, M. Moser, C. T. Wotjak, C. Kupatt, R. Gönner, R. Zhang, H. Zhang,
X. Zong, M. Biel, C. Wahl-Schott

"cAMP-dependent regulation of HCN4 controls the tonic entrainment process in sinoatrial node pacemaker cells"

Nat Commun 2020 Vol. 11 Issue 1 Pages 5555

S. Fenske, R. Pröbstle, F. Auer, S. Hassan, V. Marks, D. H. Pauza, M. Biel, C. Wahl-Schott

"Comprehensive multilevel in vivo and in vitro analysis of heart rate fluctuations in mice by ECG telemetry and electrophysiology"

Nat Protoc 2016 Vol. 11 Issue 1 Pages 61-86

O. Pester , P. J. Barrett, D. Hornburg, P. Hornburg, **R. Pröbstle**, S. Widmaier, C. Kutzner, M. Dürrbaum, A. Kapurniotu, C. R. Sanders, C. Scharnagl, D. Langosch

"The backbone dynamics of the amyloid precursor protein transmembrane helix provides a rationale for the sequential cleavage mechanism of γ -secretase"

J Am Chem Soc. 2013 Vol. 135 Issue 4 Pages 1317-29

11.3 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Martin Biel danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die wissenschaftliche Förderung und Diskussion sowie die stets offene Tür für Fragen und Probleme.

Herrn Prof. Dr. Christian Wahl-Schott danke ich für das spannende Thema sowie die wissenschaftliche Betreuung und Förderung.

Der gesamten "Herz"-Gruppe danke ich für die großartige Zusammenarbeit und die schöne Erfahrung wie sich das Puzzle des großen Forschungsvorhabens mit den Beiträgen aller Stück für Stück zu einem erkennbaren Bild zusammensetzt.

Allen Kolleg*innen im Arbeitskreis danke ich für die unvergessliche Zeit im Labor und auch für die vielen schönen Momente darüber hinaus. Es war mir eine große Freude von und mit all den verschiedenen Persönlichkeiten sehr unterschiedliche Forschungsfelder kennenzulernen und selbst daran zu wachsen. Monika danke ich für ihren stets eigenen Blick auf die kleine und große Welt.

Mein besonderer Dank gilt dabei Henne, Jen, Mirja, Saskia, Franz und Elisabeth!

Meiner ganzen Familie danke ich von ganzem Herzen für die fortwährende Unterstützung. Insbesondere ohne den Rückhalt und die Bestärkung von meiner Frau Eva, die dafür viele andere Aufgaben zusätzlich übernommen hat, wäre es nicht möglich gewesen mit Kindern diese Arbeit zu vollenden.