

***Gain-of-function* Mutation des HCN4-Kanals
schützt vor dilatativer Kardiomyopathie**

von Julia Rilling

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

***Gain-of-function* Mutation des HCN4-Kanals
schützt vor dilatativer Kardiomyopathie**

von Julia Rilling
aus Konotop/Ukraine
München 2023

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

Angefertigt am Department für Pharmazie - Zentrum für Pharmaforschung
der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Mentorin: PD Dr. Stefanie Fenske

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Elisabeth G. Kemter

Tag der Promotion: 11. Februar 2023

Meinem Ehemann

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Hyperpolarisations-aktivierte und Zyklonukleotid-regulierte (HCN-)Kationenkanäle....	1
1.2 Rolle und physiologische Funktionen der HCN-Kanäle	3
1.3 Der Schrittmacherprozess im Sinusknoten	3
1.4 Inadäquate Sinustachykardie (IST)	6
1.5 Kardiomyopathien	7
1.6 HCN4F-Mausmodell	9
2. Zielsetzung der Arbeit	13
3. Material und Methoden	14
3.1 Versuchstiere	14
3.2 Versuchsablauf	14
3.3 Genotypisierung von Versuchstieren.....	15
3.4 Vorbereitungsmaßnahmen für die Durchführung einer TAC-OP	16
3.5 Intubation.....	17
3.6 Ermittlung des Verhältnisses zwischen Herzgewicht und Tibialänge.....	19
3.7 Histologie.....	19
3.7.1 Anfertigung histologischer Schnitte	19
3.7.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	20
3.7.3 <i>Sirius Red-Fast Green</i> Färbung	21
3.8 Arbeiten mit Ribonukleinsäure (RNA, <i>ribonucleic acid</i>)	22
3.8.1 Isolierung von RNA aus Gewebe.....	22
3.8.2 Komplementäre DNA (cDNA)-Synthese aus <i>messenger</i> RNA (mRNA)	23
3.8.3 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR, <i>real-time quantitative PCR</i>)	24
3.8.4 RNA-Sequenzierung (RNA-Seq, <i>Next Generation Sequencing</i>).....	26
3.9 Druck-Volumen-Messung	26

3.9.1 Durchführung der Hämodynamik-Messungen.....	27
3.9.2 Datenauswertung.....	28
3.10 Verwendete Materialien	30
3.11 Datenanalyse.....	32
4. Ergebnisse	33
4.1 Transverse Aortenkonstriktion	33
4.2 Histologische Analyse struktureller Veränderungen auf Organebene.....	36
4.3 Expression kardialer Hypertrophiemarker.....	42
4.4 Genexpressionsanalyse mittels RNA-Sequenzierung (RNA-Seq).....	44
4.5 Hämodynamik-Messungen in scheinoperierten und TAC-operierten Mäusen	47
5. Diskussion	55
6. Zusammenfassung	61
7. Summary	63
8. Literaturverzeichnis.....	64
9. Anhang	76
Danksagung	94

Abkürzungsverzeichnis

ACCS	Arteria carotis communis sinister
Acta1	Skeletal Actin alpha 1
Ankrd1	Cardiac ankyrin repeat protein
ANP (Nppa)	Atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
BNP (Nppb)	Brain Natriuretisches Peptid
bpm	Beats per minute (Schläge pro Minute)
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ccl	Chemokine (C-C motif) ligand
CNBD	Zyklonukleotid-Bindedomäne
CO ₂	Kohlendioxid
Col3a1	Kollagen Typ III, alpha 1
CT	Crista terminalis
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase1l2	Desoxyribonuclease-1-like 2
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dP/dtmax	Druckanstiegsgeschwindigkeit
dP/dtmin	Druckabfallgeschwindigkeit
dV/dtmax	Schnellster Volumenanstieg
dV/dtmin	Schnellster Volumenabfall
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	Enddiastolisches Volumen
Egr1	Early Growth Response 1
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ESV	Endsystolisches Volumen
G	Gauge

Abkürzungsverzeichnis

GYG	Aminosäuresequenz Glycin – Tyrosin – Glycin
HCl	Wasserstoffchlorid
HCN-Kanal	Hyperpolarisations-aktivierter und Zyklonukleotid-regulierter Kationenkanal
HCN4F	Mauslinie HCN4 ^(Y527F)
H&E	Hämatoxylin/Eosin
HF	Herzfrequenz
HG	Herzgewicht
hHCN4	Humaner HCN4 Kanal
HZV	Herzzeitvolumen
I _f	" <i>Funny</i> " Strom der HCN-Kanäle
I _h	Hyperpolarisations-aktivierter Strom der HCN-Kanäle
IST	Inadäquate Sinustachykardie
IVS	Intraventrikuläres Septum
KG	Körpergewicht
KI	Knock-in
KS	Koronarvenensinus
LA	Linkes Atrium
LKS	Linker Kammerschenkel
LV	Linker Ventrikel
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVESP	Linksventrikulärer endsystolischer Druck
LVH	Linksventrikuläre Hypertrophie
LVP min/max	Minimaler/maximaler gemessener Druck
mALAS	Murine Delta-Aminolävulinatsynthase
mHCN4	Muriner HCN4 Kanal
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mRNA	Messenger RNA
Myh7	Myosin heavy chain 7
n	Anzahl der Tiere
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
NS	Nervensystem

Abkürzungsverzeichnis

n.s.	Nicht signifikant
O ₂	Sauerstoff
OP	Operation
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pdev	Linksventrikulär entwickelter Druck
PF	Purkinje-Fasernetz
PFA	Paraformaldehyd
PV	Druck-Volumen
PV	Pulmonalvenen
qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RA	Rechtes Atrium
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
RV	Rechter Ventrikel
S1–S6	alpha-helikale Transmembransegmente
SAN	Sinusknoten
SDD	Langsame diastolische Depolarisation
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
Sham	Scheinoperiert
SPF	Spezifisch bzw. spezifiziert Pathogen-frei
SV	Schlagvolumen
TAC	Transverse Aortenkonstriktion
TAC KI	Hypertrophes Knock-in-Tier
TAC WT	Hypertrophes Wildtyp-Tier
Tau	Zeitkonstante der aktiven Relaxation
TB	Truncus brachiocephalicus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TIC	Tachykardie-induzierten Kardiomyopathie
Timp1	Metallopeptidase inhibitor 1
TL	Tibiallänge
TP	Schwellenpotential
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid
VCS	Vena cava superior
VE	Vollentsalzt

Abkürzungsverzeichnis

vs.	Versus
VSD	Spannungsempfindliche Domäne
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Hyperpolarisations-aktivierte und Zyklonukleotid-regulierte (HCN-)Kationenkanäle

HCN-Kanäle gehören zur Superfamilie der spannungsgesteuerten Kationenkanäle und werden durch Hyperpolarisation aktiviert. HCN-Kanäle werden vor allem in Neuronen und in Herzzellen exprimiert. Der von den HCN-Kanälen erzeugte Strom ist als I_h (*hyperpolarisation*), I_f (*funny*) oder auch als „Schrittmacherstrom“ bekannt, da er eine zentrale Rolle bei der Steuerung der Erregbarkeit sowohl in Neuronen als auch in Herzzellen spielt und seine Aktivierung durch Hyperpolarisation unter allen anderen bekannten spannungsabhängigen Strömen einzigartig ist (Biel et al. 2009, Wahl-Schott et al. 2014).

Bisher sind vier HCN-Isoformen bekannt (HCN1-HCN4), die alle einen tetrameren Kanalkomplex bilden. Der Komplex kann dabei als Homotetramer oder auch als Heterotetramer vorliegen. Jede Untereinheit enthält sechs alpha-helikale Transmembransegmente (S1-S6) und einen intrazellulären N- und C-Terminus (Abbildung 1) (Biel et al. 2002, Lee and MacKinnon 2017, Much et al. 2003, Wang et al. 2020, Zagotta et al. 2003). Die Segmente S1-S4 bilden eine spannungsempfindliche Domäne (VSD, *voltage sensing domain*). S4 zeichnet sich durch positiv geladene Arginin- und Lysinreste aus, die in einem regelmäßigen Abstand von drei Aminosäuren angeordnet sind und zur positiven Ladung der VSD beitragen (Chen et al. 2000). Somit bildet S4 den Spannungssensor in HCN-Kanälen. Als Reaktion auf eine Hyperpolarisation bewegt sich das S4-Segment nach innen und öffnet die HCN-Kanäle, wohingegen eine Depolarisation S4 nach außen bewegt und die Kanäle schließt (Aggarwal and MacKinnon 1996, Lee and MacKinnon 2019, Mannikko et al. 2002). Zwischen den Segmenten S5 und S6 befindet sich eine ionenleitende Porenschleife (Wahl-Schott and Biel 2009), die einen für Kaliumkanäle typischen Selektivitätsfilter mit der Aminosäuresequenz Glycin – Tyrosin – Glycin (GYG) beinhaltet. Sowohl Na^+ - als auch K^+ - Ionen sind in der Lage, die HCN-Kanalpore zu passieren. Auffällig ist, dass die Permeabilität für K^+ -Ionen lediglich viermal höher ist als die für Na^+ -Ionen. Im intrazellulären C-Terminus enthalten HCN-Kanäle eine Zyklonukleotid-Bindedomäne (CNBD, *cyclic nucleotide binding domain*), die über den C-Linker mit dem S6-Segment verbunden ist (Lee and MacKinnon 2017, Wang et al. 2020, Zagotta et al. 2003).

Die Aktivität der HCN-Kanäle wird durch zyklische Nukleotide, vor allem durch zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), moduliert (DiFrancesco and Tortora 1991). Bindung von cAMP an die CNBD erleichtert die Öffnung des HCN-Kanals. Diese Eigenschaft von cAMP

wird durch die Aufhebung der hemmenden Wirkung (tonische Inhibition) der CNBD auf den Kanal erklärt (Wainger et al. 2001, Wang et al. 2020, Zagotta et al. 2003). In Folge einer direkten cAMP-Bindung an die CNBD verschiebt sich die Aktivierungskurve parallel zu positiveren Potentialen, wodurch bei gleichem Potential mehr HCN-Kanäle offen sind und somit mehr depolarisierender Strom geleitet wird. Auf diese Weise wird die Erregbarkeit der Membran als Reaktion auf Veränderungen des intrazellulären zyklischen Nukleotidspiegels reguliert (DiFrancesco and Tortora 1991).

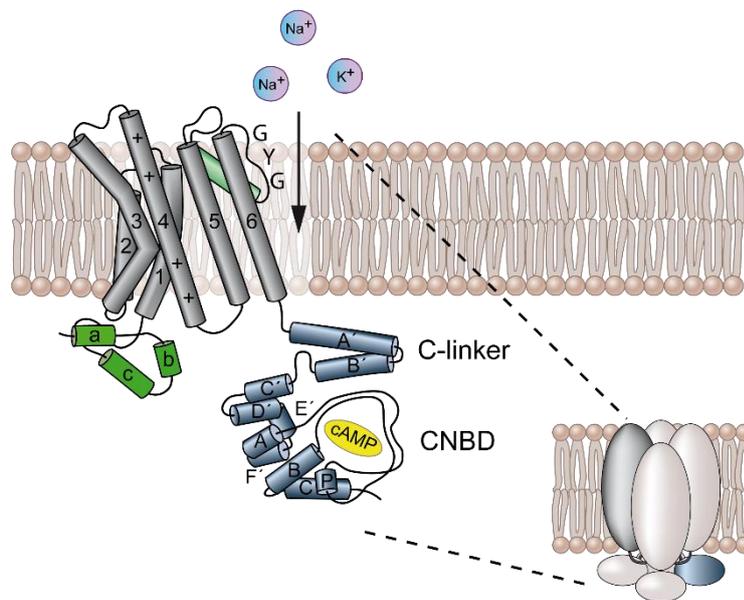


Abbildung 1. Schematisches Modell einer HCN-Kanal Untereinheit und eines HCN-Kanal-Tetramers. Eine Untereinheit besteht aus sechs α -helikalen Transmembransegmenten (grau), die mit 1-6 nummeriert sind und den intrazellulär gelegenen N- und C-Termini (grün und dunkelblau). Die Helices S5, S6 und die Porenhelix (hellgrün) bilden die Kanalpore. Diese Poreneinheit enthält den Selektivitätsfilter (GYG). Die Helices S1-S4 bilden die spannungsempfindliche Domäne, die den Spannungssensor (S4) enthält, der positiv geladene Arginin- oder Lysinreste (+) in regelmäßigen Abständen an jeder dritten Position trägt. Der C-Terminus enthält den C-Linker, bestehend aus sechs α -Helices (A'-F') und einer Zyklonukleotid-Bindungsdomäne (CNBD), bestehend aus drei α -Helices (A-C) und einer β -Rolle zwischen Helix A und B. Abbildung modifiziert nach (Hennis et al. 2021a).

Sowohl die Aktivierungskinetik als auch die Spannungsabhängigkeit der HCN-Kanäle wird durch die Bindung von cAMP moduliert, wobei diese Effekte bei den vier verschiedenen Isoformen unterschiedlich stark ausgeprägt sind (Viscomi et al. 2001, Zong et al. 2012). Der HCN1-Subtyp besitzt die schnellste Aktivierungskinetik. Die Subtypen HCN2 und HCN3 zeigen eine mittlere Aktivierungszeit, während HCN4 die langsamste Aktivierungskinetik aufweist. Diese Unterschiede resultieren weitgehend aus einer unterschiedlich stark hemmenden Wirkung der CNBD. So ist die hemmende Wirkung der CNBD bei HCN1 schwächer als bei HCN2 oder HCN4 (Biel et al. 2009, Santoro et al. 2000).

1.2 Rolle und physiologische Funktionen der HCN-Kanäle

HCN-Kanäle sind für die rhythmische Aktivität sowohl im Herz als auch im Gehirn von wesentlicher Bedeutung. Zudem werden Mutationen in HCN-Kanälen mit verschiedensten Erkrankungen in Verbindung gebracht (Ramentol et al. 2020), was sie zu attraktiven Zielen in der Erforschung neuer Therapieansätze macht (Sartiani et al. 2017).

Im menschlichen und murinen Herzen konnten alle vier HCN-Kanal-Isoformen in verschiedenen Regionen nachgewiesen werden. Drei der vier Mitglieder der HCN-Kanalfamilie (HCN1, HCN2 und HCN4) sind in SAN-Schrittmacherzellen identifiziert worden (Fenske et al. 2013, Herrmann et al. 2011, Li et al. 2015, Marionneau et al. 2005, Stieber et al. 2003). Der HCN3-Kanal wird hingegen nicht im SAN exprimiert, sondern in einer Subpopulation ventrikulärer Kardiomyozyten (Fenske et al. 2011). Für die vorliegende Arbeit war der HCN4-Subtyp der HCN-Kanalfamilie von besonderem Interesse. Im HCN4-Gen gibt es mehrere *loss-of-function*-Mutationen, die mit einer Funktionsstörung des Sinusknotens und einer vererbten Sinusbradykardie in Verbindung gebracht wurden (Laish-Farkash et al. 2010, Milanesi et al. 2006, Milano et al. 2014, Nof et al. 2007, Schulze-Bahr et al. 2003, Ueda et al. 2004). Es wurden aber auch komplexere HCN4-assoziierte Arrhythmien beschrieben, darunter verlängerte QT-Zeiten (Ueda et al. 2004), atrioventrikuläre Blocks (Zhou et al. 2014), Brugada-Syndrom (Ueda et al. 2009), früh einsetzendes Vorhofflimmern (Macri et al. 2014) und Bradykardie-Tachykardie-Syndrom (Duhme et al. 2013). Darüber hinaus wurden strukturelle Erkrankungen wie die linksventrikuläre *Non-Compaction*-Kardiomyopathie mit Dysfunktionen von HCN-Kanälen in Verbindung gebracht (Milano et al. 2014, Yokoyama et al. 2018). Bislang wurde nur eine *gain-of-function*-Mutation im HCN4-Kanal beschrieben (Baruscotti et al. 2017), die mit den Symptomen der inadäquaten Sinustachykardie (IST) einhergeht.

1.3 Der Schrittmacherprozess im Sinusknoten

Der autonome Herzschlag wird durch sogenannte Schrittmacherzellen im Sinusknoten (SAN, *sinoatrial node*) erzeugt. Der Sinusknoten ist ein Teil des Erregungsleitungssystems des Herzens und stellt das primäre Schrittmacherzentrum (Abbildung 2A), in dem spontane Aktionspotenziale (Abbildung 2B) generiert werden, dar. Er befindet sich im rechten Vorhof und verläuft von der *Vena cava superior* entlang des *Sulcus terminalis* zur *Vena cava inferior* (Hennis et al. 2021a, Keith and Flack 1907, Liu et al. 2007). Die autonome Erregungsbildung des Herzens beruht auf der Eigenschaft der Sinusknoten-Zellen, die Membran nach der

Repolarisation langsam bis zu einem Schwellenpotential zu depolarisieren (SDD, *slow diastolic depolarisation*; langsame diastolische Depolarisation), bei dem das nächste Aktionspotential ausgelöst wird (Mangoni and Nargeot 2008). Die Steigung der diastolischen Depolarisation steuert die Feuerfrequenz der Schrittmacherzellen und bestimmt die intrinsische Herzfrequenz (Hennis et al. 2021b).

Die im Sinusknoten erzeugten Aktionspotenziale breiten sich zunächst schnell über die Herzvorhöfe aus und werden dann in Richtung des Atrioventrikular-Knotens (AV-Knoten) weitergeleitet, der die einzige elektrisch leitende Verbindung zwischen den Herzvorhöfen und den Herzkammern darstellt. Der AV-Knoten verlangsamt die Überleitung der elektrischen Erregung, damit die Beendigung der Vorhofkontraktion vor der Kammerkontraktion gewährleistet ist. Nach dieser Leitungsverzögerung durch den AV-Knoten erreicht der elektrische Impuls schließlich das His-Purkinje-System, von welchem aus die ventrikulären Kardiomyozyten erregt werden (Boyett 2009, Hennis et al. 2021a, Park and Fishman 2017). Für eine normale Erregung und Kontraktion des Herzens ist genau diese spezifische Reihenfolge von elektrischen Ereignissen notwendig und Funktionsstörungen des kardialen Reizleitungssystems werden für viele verschiedene Arrhythmien verantwortlich gemacht (Boyett 2009).

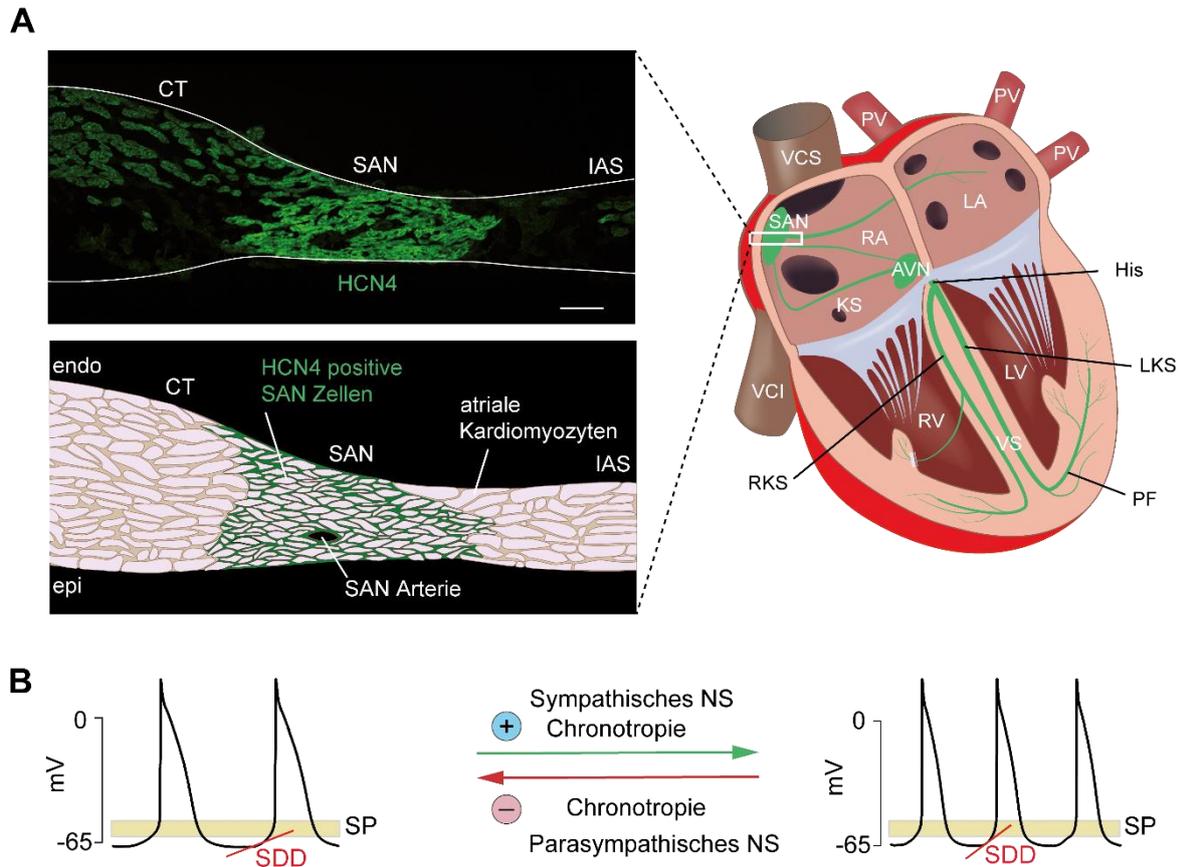


Abbildung 2. HCN4 Kanäle haben eine wichtige Rolle im Reizleitungssystem des Herzens. (A) Rechts, Schematische Darstellung des Reizleitungssystems (grün). Die erste Erregungsstelle befindet sich im Sinusknoten (SAN). Der atrioventrikuläre Knoten (AVN) befindet sich zwischen dem zentralen Faserkörper und der Trikuspidalklappe. Das His-Bündel (His) spaltet oben in einen linken und rechten Kammerschenkel (LKS; RKS), die sich zum linken und rechten Purkinje-Fasernetz (PF) verzweigen. Weitere Abkürzungen: LA, linkes Atrium; RA, rechtes Atrium; PV, Pulmonalvene; VCS, Vena cava superior; VCI, Vena cava inferior; KS, Koronarvenensinus; RV, rechter Ventrikel; LV, linker Ventrikel; VS, ventrikuläres Septum. Links, oberes Feld: Immunhistochemischer Nachweis von HCN4 (grün) in einem Querschnitt durch den murinen SAN. Weitere Abkürzungen: CT, Crista terminalis; IAS, interatriales Septum; endo, endokardial; epi, epikardial. Maßstabsbalken: 100 μm . Links, unteres Feld: Schematische Darstellung der Verteilung von HCN4. (B) Schrittmacherpotentiale isolierter SAN-Zellen, die den chronotropen Effekt auf Einzelzellebene zeigen. Das sympathische Nervensystem beschleunigt die SDD und erhöht die Feuerungsrate der Schrittmacherzellen, während das parasympathische Nervensystem die SDD verlangsamt und die Feuerungsrate verringert. Weitere Abkürzungen: SDD, *slow diastolic depolarisation*, langsame diastolische Depolarisation; SP, Schwellenpotential; NS, Nervensystem. Abbildung modifiziert nach (Hennis et al. 2022a).

Die molekularen Grundlagen der an der SDD beteiligten Ionenströme wurden bei verschiedenen Spezies, einschließlich Menschen und Mäusen, untersucht. Die Fähigkeit von SAN-Schrittmacherzellen, die SDD und spontane Aktionspotenziale zu erzeugen, wird auf das Zusammenspiel von zwei wichtigen zellulären Mechanismen zurückgeführt, die als *Ca²⁺-clock* und *membrane clock* bezeichnet werden (Lakatta et al. 2010).

Der Begriff *membrane clock* fasst alle Ströme zusammen, die durch die Aktivität von Ionenkanälen und Ionenpumpen in der Zellmembran entstehen und zur SDD beitragen (Hennis et al. 2021b).

Zusätzlich zum *membrane clock*-Mechanismus gibt es noch einen weiteren Prozess, der am Schrittmachermechanismus beteiligt ist. Während des Schrittmacherzyklus kommt es zur spontanen, rhythmischen, lokalen Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), was als weiterer Mechanismus für die Erzeugung des Sinusrhythmus vorgeschlagen wird. Die rhythmischen Veränderungen der SR- Ca^{2+} -Freisetzung werden als *Ca²⁺-clock* bezeichnet (Joung et al. 2009). Diese lokalen Calciumfreisetzungen (LCRs, *local calcium releases*), die aus der spontanen Öffnung von Ryanodinrezeptoren in der SR-Membran resultieren (Vinogradova et al. 2004), aktivieren den Natrium-Calcium-Austauscher (NCX), dessen Aktivität die diastolische Depolarisation beschleunigt. Die *Ca²⁺-clock* bildet zusammen mit spannungsabhängigen Ionenkanälen (*membrane-clock*) ein gekoppeltes System, das die Feuerfrequenz der Aktionspotenziale und damit die Herzfrequenz reguliert (Bogdanov et al. 2001, Sirenko et al. 2017).

1.4 Inadäquate Sinustachykardie (IST)

Die IST ist eine unvollständig verstandene Erkrankung, die durch eine anhaltende Erhöhung der Herzfrequenz auf mehr als 100 Schläge/Min. (bei Menschen) in Ruhe gekennzeichnet ist, ohne dass ein Zusammenhang mit körperlichen, medikamentösen oder pathophysiologischen Ursachen für eine Herzfrequenzsteigerung vorliegt (Abed et al. 2016, Baruscotti et al. 2017, Sheldon et al. 2015). Als Mechanismen für die Entstehung von IST werden eine verstärkte oder eine abnorme autonome Regulation des SAN vorgeschlagen. Dieses Konzept beinhaltet eine übermäßige Sympathikusaktivität, eine reduzierte Aktivität des Parasympathikus oder eine Kombination aus beidem (Morillo et al. 1994), was jedoch spekulativ bleibt. Einige Studien weisen auch auf einen Anstieg der intrinsischen Herzfrequenz hin, der durch ATP-sensitive Kaliumkanäle im SAN verursacht wird (Still et al. 2002). Andere fanden wiederum erhöhte Plasmaspiegel von aktivierenden β -Adrenozeptor-Antikörpern bei IST-Patienten (Chiale et al. 2006).

IST hat in letzter Zeit viel medizinische Aufmerksamkeit erhalten, da die Behandlung durch Senkung der Herzfrequenz mit herkömmlichen Medikamenten unzureichend wirksam ist und somit eine Herausforderung darstellt. Dahingegen konnte die Herzfrequenz erfolgreich mit

Ivabradin, einem spezifischen Inhibitor des I_f -Stroms, gesenkt werden (Baruscotti et al. 2017, Cappato et al. 2012, Inamori et al. 2022). In mehreren klinischen Studien, die sich mit IST-Patienten befassten, konnte Ivabradin die minimale, mittlere und maximale Herzfrequenz wirksam senken und die Symptome verbessern oder vollständig beseitigen (Benezet-Mazuecos et al. 2013, Calo et al. 2010, Cappato et al. 2012). Ivabradin ist ein selektiver Blocker von HCN-Kanälen, der seine blockierende Wirkung nur unter bestimmten Bedingungen entfalten kann. Dieser als „*use dependence*“ bekannte Mechanismus beschreibt, dass Ivabradin-Moleküle nur zu ihrer Bindungsstelle gelangen und den Ionenfluss blockieren können, wenn der Kanal offen ist (Bucchi et al. 2002). Eine mögliche Rolle von HCN-Kanälen in der Pathogenese von IST war bis vor kurzem unbekannt. Der Nachweis, dass Ivabradin ein wirksames pharmakologisches Mittel bei der IST-Behandlung darstellt, deutet jedoch auf eine potenzielle Rolle der HCN-Kanäle in der Entwicklung der IST hin.

1.5 Kardiomyopathien

Anhaltende Tachyarrhythmien können zu einer Tachykardie-induzierten Kardiomyopathie (TIC, *tachycardia induced cardiomyopathy*; Abbildung 3) führen (Inamori et al. 2022, Sag et al. 2016, Winum et al. 2009). Unter dem Begriff der Kardiomyopathie werden viele verschiedene strukturelle und funktionelle Veränderungen des Herzmuskels zusammengefasst (Ciarambino et al. 2021, Maron et al. 2006). Es wird zwischen primären und sekundären Kardiomyopathien unterschieden (Brieler et al. 2017). Die häufigste primäre Kardiomyopathie ist die hypertrophe Kardiomyopathie, die mit einer Prävalenz von 1:500 auftritt. Die dilatative Kardiomyopathie hat eine Prävalenz von 1:2500. Sie ist eine der Hauptursachen für Herzversagen (Richardson et al. 1996) und somit die häufigste Indikation für eine Herztransplantation bei Menschen (Ciarambino et al. 2021). Bei Hunden ist die dilatative Kardiomyopathie eine der wichtigsten Ursachen kardialer Morbidität und Mortalität. Die Diagnose der frühen Stadien und die rechtzeitige Therapie bietet einen erheblichen Überlebensvorteil für Hunde (Abbott-Johnson et al. 2021, O'Grady and O'Sullivan 2004, O'Grady et al. 2009).

Bei der TIC handelt es sich im Allgemeinen um eine potenziell reversible Form der Kardiomyopathie, wenn die ursächliche Tachykardie wirksam behandelt werden kann. Ohne eine Behandlung kann sich TIC jedoch zu einer vollständigen klinischen Manifestation der chronischen Herzinsuffizienz entwickeln. Die häufigsten Arrhythmien, die mit einer TIC in

Verbindung gebracht werden, sind Vorhofflattern, Vorhofflimmern, AV-Knoten-Reentry-Tachykardien und ventrikuläre Tachykardien (Ellis and Josephson 2013).

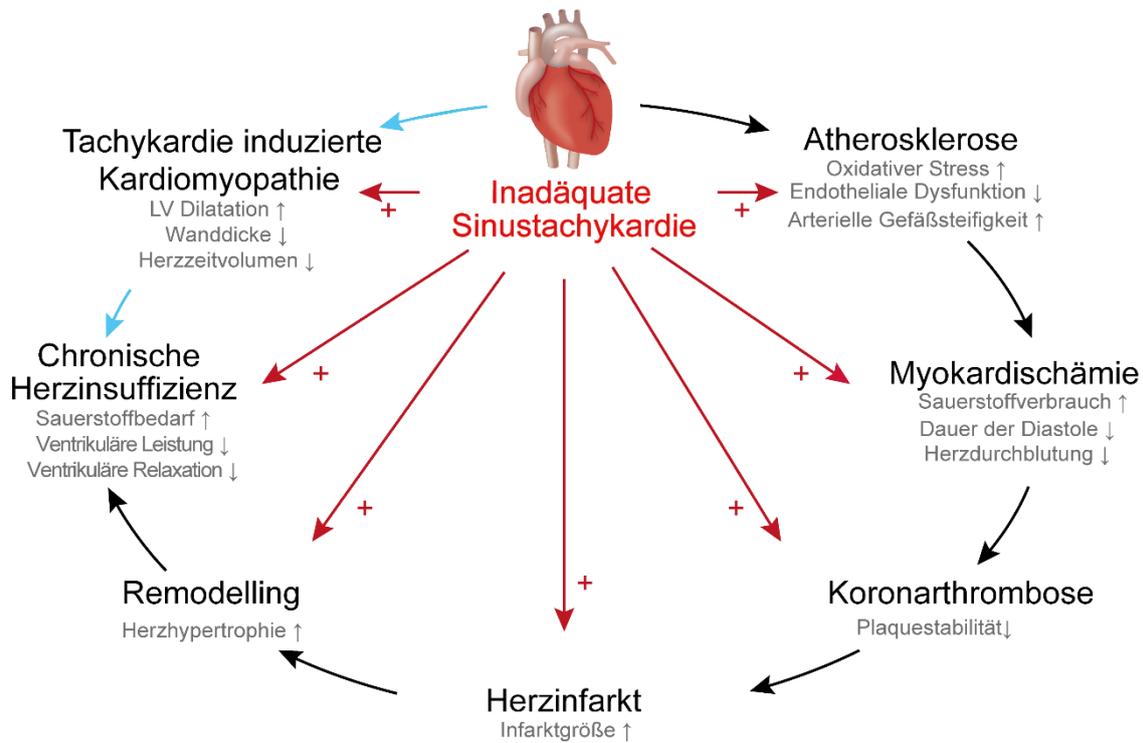


Abbildung 3. Einfluss einer Sinustachykardie auf die Progredienz kardialer Erkrankungen. Blaue Pfeile: Anhaltend hohe Herzfrequenzen bei Patienten mit inadäquater Sinustachykardie führen zu einer Tachykardie bedingten Kardiomyopathie und verschlimmern diese. Ohne Behandlung der zugrunde liegenden Ursache entwickelt sich eine chronische Herzinsuffizienz. Schwarze Pfeile: Erhöhte Herzfrequenzen aggravierern ebenfalls alle Stadien des Kontinuums der Herzinsuffizienz. Abbildung modifiziert nach (Reil and Bohm 2012).

Das erste experimentelle Tiermodell der TIC wurde bereits 1962 von Whipple et al. beschrieben. Mit Hilfe dieses Modell wurde die Auswirkung einer chronischen schnellen Herzstimulation (*Pacing*) auf die ventrikuläre Funktion untersucht (Ellis and Josephson 2013). Seitdem haben zahlreiche Studien, die vor allem an Hunden und Schweinen durchgeführt wurden, gezeigt, dass durch anhaltende, schnelle atriale oder ventrikuläre Stimulation es zu einer systolischen und diastolischen Dysfunktion mit einer Zunahme der linksventrikulären Wandspannung sowie erhöhtem ventrikulären Füllungsdruck (EDP, *enddiastolic pressure*), reduziertem Herzzeitvolumen (HZV) und verminderter ventrikulären Kontraktilität (dP/dt_{max}) kommt (Huizar et al. 2019, Shinbane et al. 1997, Spinale et al. 1995).

Kardiomyopathien können nicht nur durch anhaltend hohe Herzfrequenzen ausgelöst werden, sondern vor allem auch durch eine erhöhte Nachlast des Herzens. Beispielsweise führt eine Aortenstenose oder ein chronisch erhöhter Blutdruck zu einer gesteigerten Nachlast. Um den

hohen Auswurfwiderstand zu überwinden und die Wandspannung zu verringern, finden im Herzen strukturelle und zelluläre Umbauprozesse statt, die durch einen Anstieg der Wanddicke und myokardialen Masse gekennzeichnet sind. Die transverse Aortenkonstriktion (TAC, *transverse aortic constriction*) wurde von Rockman (Rockman et al. 1991) erstmalig angewendet und ist mittlerweile ein etabliertes Tiermodell zur Induktion von chronischer Druckbelastung. Solche Tiermodelle sind der Schlüssel zum Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen bei der Entwicklung von Kardiomyopathien.

1.6 HCN4F-Mausmodell

In dieser Arbeit wurde ein gentechnisch verändertes Knock-in Mausmodell HCN4^(Y527F) verwendet, das am Lehrstuhl Pharmakologie für Naturwissenschaften im Rahmen einer Dissertation generiert wurde (Scharr 2011). Um ein Mausmodell mit permanent erhöhten Herzfrequenzen zu erzeugen, wurde zuvor ein *in vitro* Screen für eine *gain-of-function* Mutation im murinen HCN4-Kanal (mHCN4) durchgeführt. HCN4F-Tiere tragen eine Punktmutation im Exon 4 des HCN4-Gens, durch die in der A' Helix des C-Linkers ein Tyrosin durch Phenylalanin (Y527F) ersetzt wird (Abbildung 4). Praktisch alle Interaktionen der C-terminalen Domänen der vier Kanaluntereinheiten finden über den C-Linker statt. Normalerweise erfolgt diese Interaktion über die Wechselwirkung der A'- und B'-Helices einer Untereinheit mit den C'- und D'-Helices der benachbarten Untereinheit (Craven and Zagotta 2004). Die Kristallstruktur des HCN4 C-Terminus lässt eine Interaktion des Tyrosin 527 in der A'-Helix des C-Linkers mit dem Glutamat 556 der B'-Helix vermuten. Der Aminosäureaustausch von Tyrosin nach Phenylalanin (Y527F) führt zu einer Störung dieser Interaktion, da Phenylalanin keine OH-Gruppe am Phenylring besitzt, was zur Abschwächung der Interaktion der A'-Helix mit der B'-Helix führen könnte. Dieses Ereignis könnte auch die gegenseitige Interaktion der C-Linker der vier Kanal-Untereinheiten beeinflussen. Durch eine Abschwächung dieser Interaktion könnte das spannungsabhängige *gating* des Kanals, ähnlich wie nach Bindung von cAMP, erleichtert werden (Scharr 2011).

In einer später erschienenen Arbeit beschreibt die isovolumetrischen Druckabfall von Dario DiFrancesco die erste humane HCN4 *gain-of-function*-Mutation (R524Q), die mit IST-bezogenen Symptomen im Zusammenhang steht. Die R524Q-Mutation befindet sich im ersten Teil der A' α -Helix des C-Linkers (Baruscotti et al. 2017).

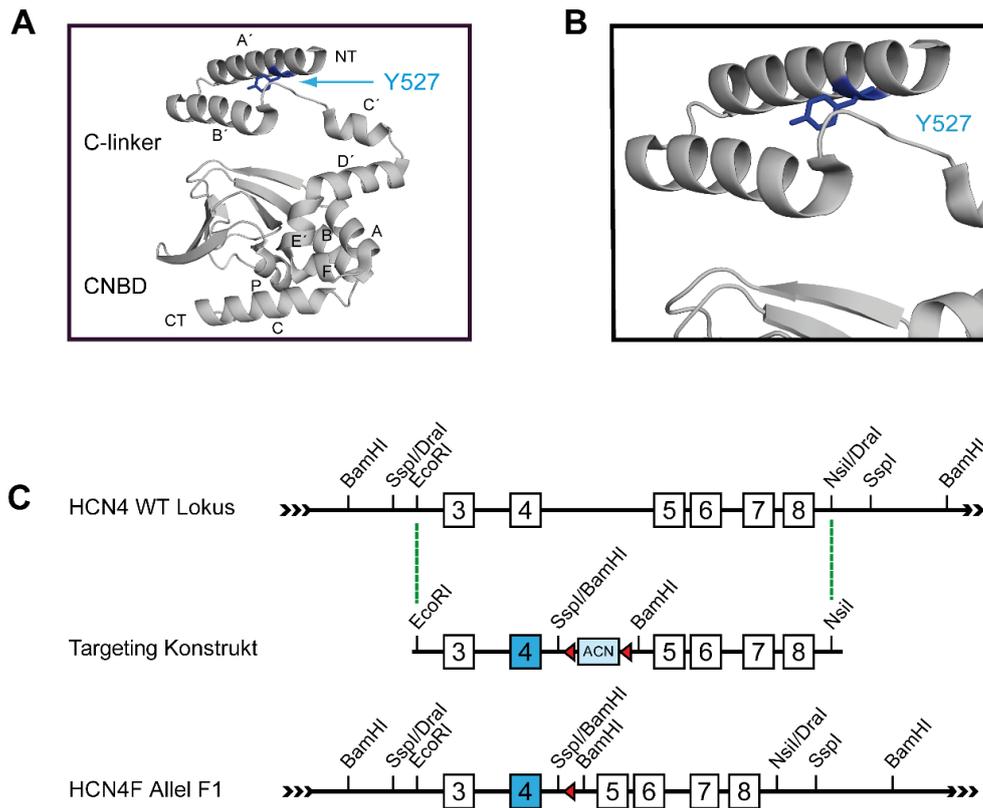


Abbildung 4. Generierung des HCN4F Mausmodells. (A) C-Terminus des humanen HCN4-Kanals (PDB #Q9Y3Q4). Die Aminosäure Y527 (blau) ist hervorgehoben. (B) Vergrößerung der α -Helices A' und B'. (C) Targeting-Strategie zur Generierung des HCN4F Knock-in Mausmodells. Der HCN4 WT Locus umfasst Exon 3 bis 8. Exon 4 trägt die Punktmutation, die im C-Linker (Y527F) des Kanalproteins zum Tragen kommt. Abbildung modifiziert nach (Fenske et al. 2020).

Bei vorherigen Untersuchungen wurde festgestellt, dass der Austausch eines Tyrosin-Restes an Position 527 durch Phenylalanin (mHCN4F) in der A'-Helix des C-Linkers die Aktivierungskurve verändert (Abbildung 5A-C). Patch-Clamp-Messungen von mutierten mHCN4F-Kanälen, die stabil in HEK293-Zellen exprimiert wurden, zeigten, dass die *Steady-State*-Aktivierungskurve zu positiveren Potenzialen verschoben war, während die Steigung der Aktivierungskurve, die Stromdichte und die Aktivierungskinetik unverändert waren. Bei physiologischen Membranpotentialen stehen also mehr HCN4-Kanäle zur Verfügung (*gain-of-function*), die zur langsamen diastolischen Depolarisation beitragen und somit eine Erhöhung der basalen Herzfrequenz bewirken können. Die Gabe von cAMP verschob die Aktivierungskurve der mHCN4- und mHCN4F-Kanäle zu positiveren Potenzialen (Abbildung 5D).

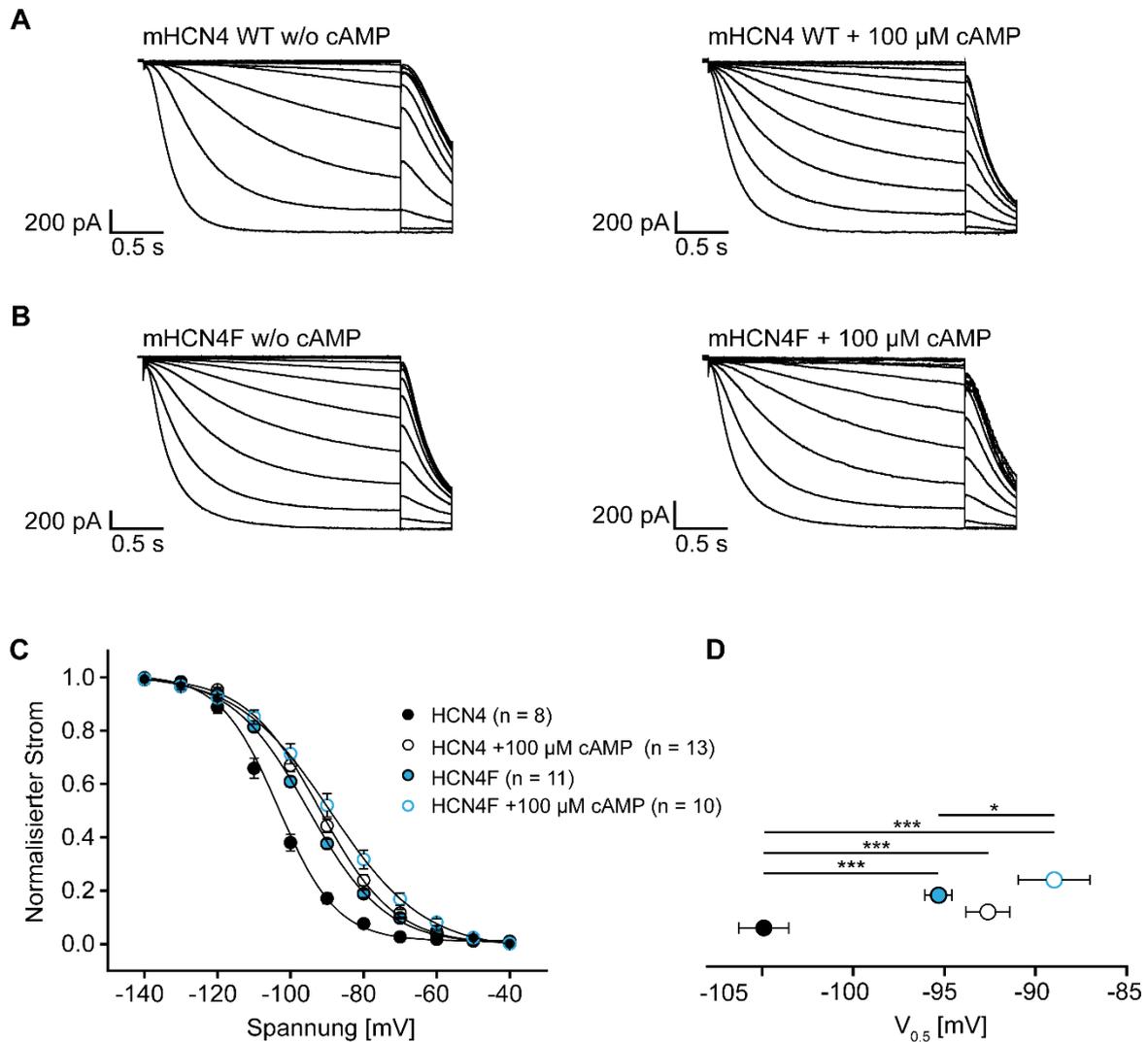


Abbildung 5. Elektrophysiologische Charakterisierung der mHCN4F-Kanäle. (A, B) Repräsentative I_f Stromspuren gemessen in HEK293-Flp-in-Zellen mit stabiler mHCN4 (A) bzw. mHCN4F Expression (B) ohne (links) und mit Zugabe von 100 μ M cAMP (rechts) in der intrazellulären Lösung. (C) Steady-State-Aktivierungskurven wurden aus den gemessenen Stromspuren ermittelt und zeigen, dass die HCN4F-Mutation die Aktivierungskurve bereits ohne Zugabe von cAMP zu positiveren Potentialen verschiebt. (D) Halbmaximale Aktivierungsspannungen wurden aus den in C gezeigten Aktivierungskurven ermittelt. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. (Die Daten wurden von Dr. René Rötzer generiert).

In weiteren Vorarbeiten wurden telemetrische EKG-Messungen an sich frei bewegenden, männlichen WT- und HCN4F-Mäusen über 60 Stunden durchgeführt. Die Auswertung der EKG-Spuren zeigte einen regelmäßigen Sinusrhythmus bei WT- und HCN4F-Tieren (Abbildung 6A). Im Herzfrequenz-Tachogramm war ersichtlich, dass die HCN4F-Mäuse aber eine mild ausgeprägte Sinustachykardie (Abbildung 6B) aufweisen, die nicht auf eine höhere Aktivität der Tiere zurückzuführen ist. Aufgrund der F-Mutation liegt eine Verschiebung der

halbmaximalen Aktivierungsspannung des HCN4-Kanals um ca. 9 mV zu positiveren Potentialen vor und somit eine erhöhte Kanalverfügbarkeit im physiologischen Potentialbereich, die ursächlich dafür ist, dass die HCN4F-Mäuse eine um ca. 10% höhere Herzfrequenz zeigen (Abbildung 6C-D).

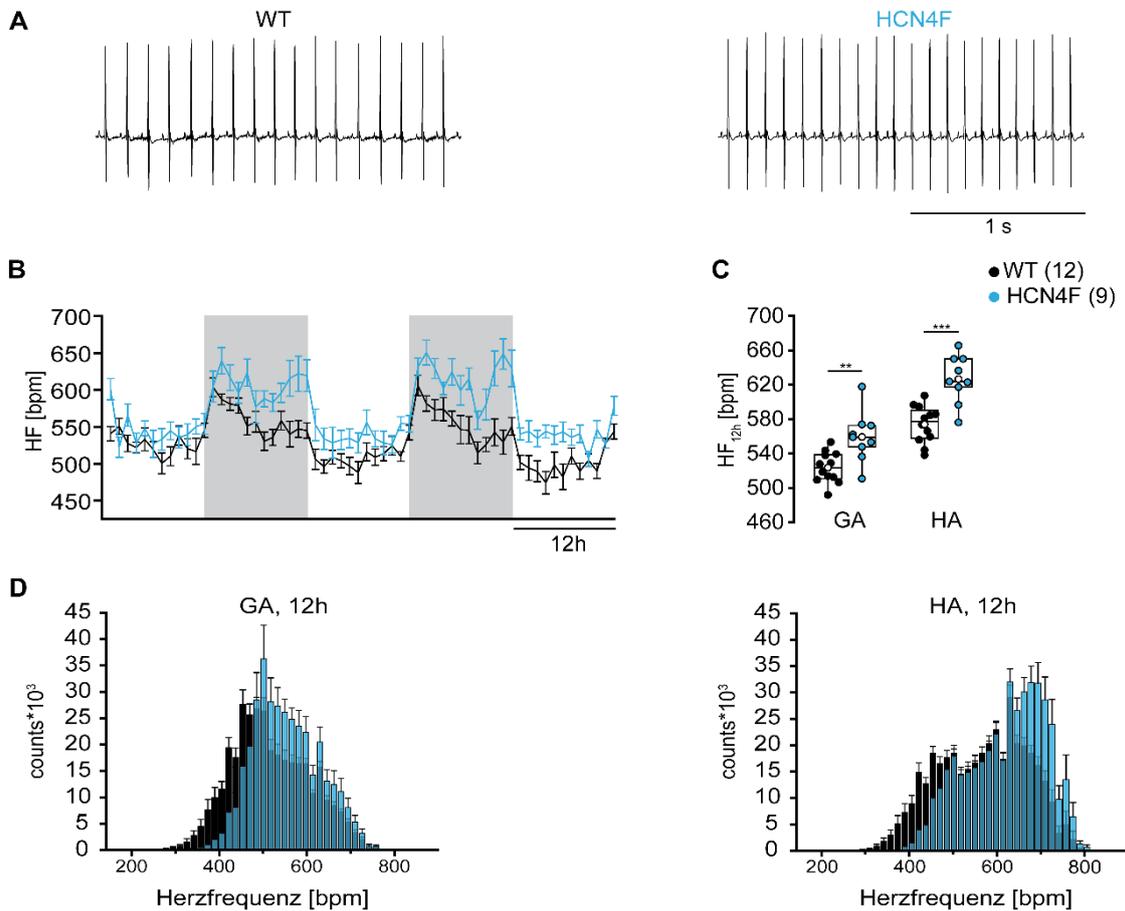


Abbildung 6. HCN4F-Mäuse haben eine Sinustachykardie. (A) Telemetrische EKG-Aufzeichnungen von einer sich frei bewegenden WT-Maus (links) und HCN4F-Maus (rechts). (B) Herzfrequenz-Tachogramm von WT- (schwarz, n = 12) und HCN4F-Tieren (blau, n = 9). (C) Mittlere Herzfrequenz während der 12h Phase mit geringer Aktivität (GA) und einer Phase mit hoher Aktivität (HA). (D) Gemittelte Herzfrequenz-Histogramme von WT (schwarz) und HCN4F-Mäusen (blau), während der 12 h Phase mit geringer Aktivität und der Phase mit hoher Aktivität. Die Herzfrequenz-Histogramme von HCN4F-Mäusen sind zu höheren Schlagfrequenzen verschoben. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM dar. **p < 0,005; ***p < 0,001. (Die Daten wurden von Dr. René Rötzer generiert).

2. Zielsetzung der Arbeit

Obwohl TIC bereits im Jahr 1913 erstmals beschrieben wurde, sind die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen nach wie vor nicht eindeutig geklärt und werden kontrovers diskutiert (Femenia et al. 2012, Minciuna et al. 2019, Olshansky and Sullivan 2013).

In früheren Tierstudien, die vor allem an Hunden und Schweinen durchgeführt wurden und die den Zusammenhang zwischen hohen Herzfrequenzen und linksventrikulärer Dysfunktion untersuchten, wurde eine schnelle und langanhaltende Vorhofstimulation zur Erhöhung der Herzfrequenz eingesetzt. Diese Studien haben gezeigt, dass eine solche atriale oder ventrikuläre Stimulation in experimentellen Modellen eine linksventrikuläre Dysfunktion, eine tiefgreifende kardiale Dilatation mit der typischerweise einhergehenden ventrikulären Wandverdünnung, einen erhöhten ventrikulären Füllungsdruck und eine verringerte Kontraktilität in Verbindung mit einer schweren biventrikulären systolischen und diastolischen Dysfunktion hervorruft, die der TIC beim Menschen ähnelt (Ellis and Josephson 2013, Mohamed 2007, Patel et al. 2000, Shinbane et al. 1997, Spinale et al. 1990). Es ist wichtig zu berücksichtigen, dass eine schnelle und konstante Stimulation zwar eine gute Annäherung an die Auswirkungen einer nativen Tachyarrhythmie darstellt, diese Annahme jedoch nicht zweifelsfrei bestätigt werden kann (Ellis and Josephson 2013).

Um das Wissen über die IST-induzierte TIC zu verbessern und tiefere Einblicke in die Krankheitsentstehung und deren zugrundeliegenden Mechanismen zu bekommen, wurde das zuvor beschriebene, gentechnisch veränderte HCN4F-Mausmodell generiert, bei dem eine HCN4 *gain-of-function* Mutation in das Genom eingeführt wurde. Eine basale Charakterisierung dieses Mausmodells zeigte, dass die Herzfrequenz permanent erhöht ist, aber dennoch durch das autonome Nervensystem moduliert werden kann. Nach aktuellem Kenntnisstand wurde bisher kein solches Tiermodell mit intrinsisch erhöhter Herzfrequenz verwendet, um den strukturellen Umbau des Herzens (kardiales *Remodeling*) zu untersuchen.

Um die kardiale Hypertrophie zu untersuchen, war es zunächst nötig die transverse Aortenkonstriktion (TAC) in Mäusen zu etablieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun ein solches murines Modell etabliert und genau charakterisiert. Mittels linksventrikulären Druck-Volumen-Messungen sollte die systolische und diastolische Funktion des linken Ventrikels erfasst und analysiert werden. Anschließend sollte ermittelt werden, wie sich das kardiale *Remodeling* bei Hypertrophie auf die Genexpression im Gewebe des linken Ventrikels auswirkt.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Für die Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurde die Knock-in Mauslinie HCN4^{tm1(Y527F)Biel} verwendet. Mäuse dieser Linie tragen eine Punktmutation im HCN4 Gen, welche zu einem Aminosäureaustausch in der C-Linker-Region (Y527F) führt.

Die Mäuse wurden mit einem genetisch gemischtem Hintergrund aus den Stämmen 129SvJ und C57-Bl6/N gezüchtet. Wildtyp- (WT) Mäuse mit demselben genetischen Hintergrund wurden als Kontrollgruppe verwendet.

Die Tiere wurden in konventionellen Eurostandard Käfigen vom Typ II L (Fa. Tecniplast) unter SPF-Bedingungen bei einem 12 Stunden Dunkel-Licht-Zyklus gehalten und hatten Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum*. Der Gesundheitszustand sowie der mikrobielle Status der Tiere wurden regelmäßig kontrolliert.

Alle Tierversuche wurden nach den Bestimmungen des Deutschen Tierschutzgesetzes und unter Einhaltung der behördlichen Vorschriften durchgeführt. Es galten Bestrebungen die Anzahl der verwendeten Mäuse so gering wie möglich zu halten. Alle Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Geschäftszeichen: ROB-55.2-2532.Vet_03-18-105; ROB-55.2-2532.Vet_02-17-149).

3.2 Versuchsablauf

Für die *in vivo* Experimente wurden acht bis zwölf Wochen alte männliche WT- und HCN4F-Mäuse verwendet. Die zu untersuchenden Tiere wurden in vier experimentelle Gruppen eingeteilt. Der Versuch begann zunächst mit einer operativen Stenosierung des Aortenquerschnitts (TAC-) oder einer Schein- (Sham-) Operation (OP). Scheinoperierte WT- und HCN4F-Tiere wurden miteinander verglichen und dienten zusätzlich der Kontrolle. Im Folgenden werden solche Tiere mit Sham abgekürzt. WT- und HCN4F-TAC Tiere, deren Aortenbogen operativ verengt wurde, werden im Folgenden als TAC bezeichnet. Genau fünf Wochen nach einer TAC- bzw. Sham-OP erfolgte die hämodynamische Messung mittels eines Druck-Volumen-Katheters (Linksherzkatheter). Im Anschluss wurden die Organe für histologische und molekularbiologische Untersuchungen entnommen und der Versuch beendet.

3.3 Genotypisierung von Versuchstieren

Desoxyribonukleinsäure (DNA, deoxyribonucleic acid)

Zur Bestimmung des Genotyps von in dieser Arbeit verwendeten Tieren (WT, HCN4F) wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde genomische DNA aus Ohrbiopsien isoliert. Die Gewebeproben wurden in 600 µl Natriumhydroxid (NaOH; 50 mM) bei 95°C für 10 Minuten in einem Heizblock inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid (Tris-HCl; pH = 8,0) zur pH-Neutralisierung zugegeben und die Proben 6 Minuten lang bei 15700 × g zentrifugiert. Die Überstände wurden als genomische DNA-Proben für die PCR-Analyse verwendet.

Amplifikation der DNA-Polymerasekettenreaktion

Die PCR wurde mit einem ProFlex PCR System Cycler (Applied Biosystems) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mit GoTaq-Polymerase (Promega Corporation) in Kombination mit folgenden HCN4 spezifischen Primern (Eurofins Genomics) durchgeführt:

Primer 1 (HCN4F_for): 5'-CTC AAG GTC TCA GCT GAG G-3'

Primer 2 (HCN4F_rev): 5'-GTA ATG TAA GCA CAC GGT ACC-3'

Der Reaktionsmix wurde wie folgt zubereitet:

PCR Ansatz	Volumen [µl]
DNA	2
Primer 1 (10 µM)	2
Primer 2 (10 µM)	2
dNTPs	0,5
5x Green Buffer	5
Taq Polymerase (GoTaq)	0,125
ddH ₂ O	11,375

PCR-Programm

1.	Initiale Denaturierung	95°C	3 min	
2.	Denaturierung	95°C	1 min	
3.	Primeranlagerung	56°C	30 s	40 Zyklen
4.	Elongation	72°C	30 s	
5.	Finale Polymerisation	72°C	5 min	

Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurde ein 2% Agarosegel hergestellt, in dem die Agarose (Genaxxon Bioscience) in Tris/Borat/EDTA-Puffer (TBE-Puffer) durch Erhitzen aufgelöst und nach abkühlen peqGREEN (5µl/100ml; VWR International GmbH) zugesetzt wurde, um die aufgetrennten DNA-Banden im UV-Licht sichtbar zu machen. Die Auftrennung erfolgte in einer mit Laufpuffer (TBE-Puffer) gefüllten horizontalen Elektrophorese-Kammer bei 130V bis 150V. Die DNA-Banden wurden mit einem GelDoc 2000 *Molecular Imager* (Bio-Rad Laboratories, Inc.) visualisiert. Die DNA-Fragmentgröße wurde mit Hilfe einer zum Vergleich auf das Gel aufgetragenen 1 kb GeneRuler Plus DNA-Leiter (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Die zu erwartenden PCR-Produkte hatten eine Länge von 345 bp bei WT und 471 bp bei HCN4F.

3.4 Vorbereitungsmaßnahmen für die Durchführung einer TAC-OP

Die Tiere wurden vor dem Versuch untersucht, gewogen, dabei wurde das Gewicht dokumentiert. Als präventives und intraoperatives Analgetikum wurde ca. 30 Minuten vor Beginn der OP 0,1 mg/kg Körpergewicht (KG) Buprenovet® (Richter Pharma AG) subkutan in die Nackenfalte injiziert. Die Narkose-Einleitung erfolgte intraperitoneal mit Ketamin (Serumwerk Bernburg AG, 120 mg/kg Körpergewicht) und Xylarium® (Ecuphar N.V, 16 mg/kg Körpergewicht). Alle Injektionslösungen wurden am Tag der OP unter aseptischen Bedingungen zubereitet. Um die Hornhaut (*Cornea*) vor Austrocknung zu schützen, wurde eine Augensalbe (Bepanthen®, Bayer Vital GmbH) appliziert. Eine flexible Temperatursonde (Harvard Apparatus) wurde ca. 0,5 cm tief in das Rektum eingeführt, um die Körpertemperatur zu überwachen. Die TAC-OP erfolgte unter Verwendung eines Mikroskops (OPMI 1 FR Pro, Carl Zeiss Meditec AG). Eine Intubation durch das Einführen einer Intubationskanüle (VasoVet

Braunüle G22, B. Braun Melsungen) in die Trachea und Beatmung über einen Respirator (*MiniVent*, Hugo Sachs Elektronik) stellte eine regelmäßige Atmung sicher. Zusätzlich wurden eine Wärmeplatte (*Hot Plate 062*, Labotect GmbH), stumpfe Wundhaken 2,5 mm (FST; Abbildung 7A-B) und als Abstandhalter eine speziell angefertigte stumpfe Sterican® Kanüle 26G (B. Braun Melsungen AG; Abbildung 7C) verwendet. Die stumpfen Wundhaken wurden speziell an einem Ende mit einem ca. 8 cm langen Schrumpfschlauch ummantelt. Dazu wurde der Schrumpfschlauch erhitzt und flach zusammengedrückt (Abbildung 7B).

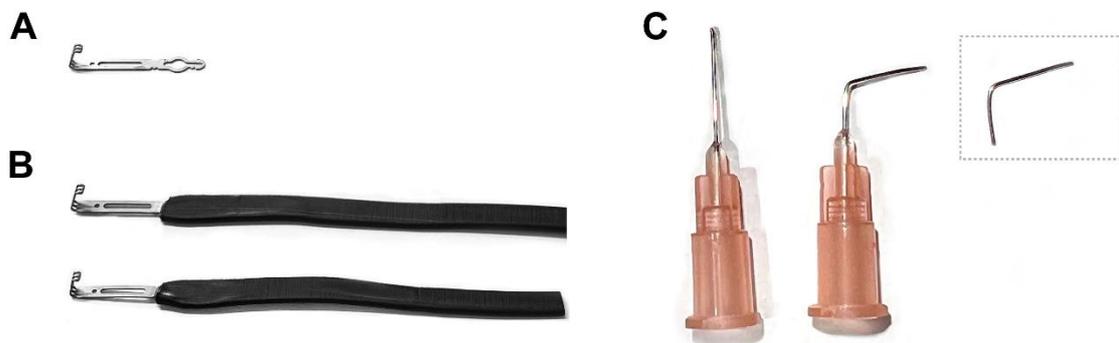


Abbildung 7. (A) Kommerziell erhältlicher Wundhaken mit einer Breite von 2,5 mm. (B) Mit Schrumpfschlauch ummantelte Wundhaken. (C) Speziell angefertigte stumpfe 26G Kanüle (Ø 0,45 mm).

3.5 Intubation

Nachdem die Maus die volle Narkosetiefe erreichte, erfolgte die Intubation. Die Maus wurde in der Rückenlage auf die Wärmeplatte gelegt. Die Gliedmaßen wurden mit Klebeband (*Leukosilk®*; BSN Medical GmbH) an der Wärmeplatte befestigt. Dabei wurde beachtet, dass die Atmung nicht durch ein zu festes Befestigen beeinträchtigt wurde. Die oberen *Incisivi* (Schneidezähne) wurden mit einem 4-0 Seidenfaden fixiert (Abbildung 8A). Eine Kaltlichtquelle mit Schwanenhals wurde im Halsbereich etwa 1,5 cm von der Hautoberfläche entfernt repositioniert. Dabei wurde sichergestellt, dass sich die beleuchtete Stelle trotz Verwendung einer Kaltlichtquelle nicht erwärmt und die Position gegebenenfalls justiert.

Die Zunge wurde vorsichtig mit einer stumpfen Pinzette aus der Maulhöhle herausgezogen. Anschließend wurde eine gebogene Klemme nach Hartmann in einem geschlossenen Zustand in die Maulhöhle eingeführt und die Zunge leicht nach oben Richtung Unterkiefer gedrückt.

Die Kaltlichtquelle wurde in der Höhe der Hauptbronchien positioniert, die *Ligamenta vocale* und die *Trachea* visualisiert und die VasoVet Braunüle G22 (Abbildung 8B) in die *Trachea* eingeführt und an einen Respirator (*mouse ventilator MiniVent*; Hugo Sachs Elektronik) angeschlossen. Es ist darauf zu achten, dass die Verbindungsschläuche von *MiniVent* zum Tier kurz und dünn sind, damit das eingestellte Hubvolumen wirklich in die Lunge gepumpt wird. Der *MiniVent* arbeitet volumenkonstant nach dem sogenannten Taumelkolbenprinzip, wobei die Kolbenbewegung sowohl das Beatmungsvolumen bestimmt als auch die Funktion des benötigten Steuerventils übernimmt.

Einstellungen des Hubvolumens und Beatmungsfrequenz:

Gewicht (g)	Hubvolumen (μl)	Atemfrequenz (bpm)
15	98	159
20	132	148
25	166	140
30	201	133
40	270	124

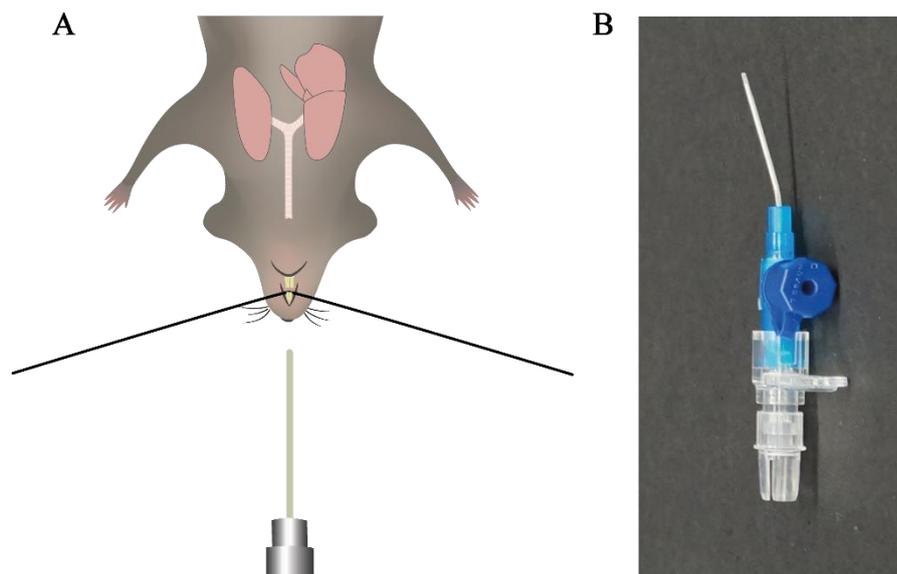


Abbildung 8. Endotracheale Intubation einer narkotisierten Maus. (A) Schematische Darstellung der endotrachealen Intubation. Die Maus befindet sich in Rückenlage auf einer Wärmeplatte. Die oberen Schneidezähne der Maus werden mit einem Seidenfaden fixiert, wodurch der Nacken überstreckt wird. (B) Als Intubationstubus dient eine 22G VasoVet Braunüle mit gekürzter, stumpfer Kanülenspitze als Führungsdraht.

Danach erfolgten die Enthaarung und die Desinfektion des Operationsbereiches. Nach erneuter Kontrolle der ausreichenden Narkosetiefe erfolgte die Operation. Der chirurgische Eingriff wurde wie im Abschnitt „Ergebnisse“ beschrieben durchgeführt.

Aufrechterhaltung der Narkose

Für den Fall, dass die chirurgische Toleranz der Ketamin-Xylazin-Narkose nicht ausreicht, stand zur weiteren Aufrechterhaltung der Narkose über den Tubus Isofluran (1,5 Vol% bei einer Durchflussrate von 1 L/min) in Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) als Inhalationsnarkose zur Verfügung. Die Regulation von Durchflussrate und der zu verabreichenden Isofluran-Konzentration erfolgte mittels eines Durchflussverdampfers (Völker-vet GmbH), welcher eine schnelle und einfache Veränderung der Narkosetiefe ermöglichte.

3.6 Ermittlung des Verhältnisses zwischen Herzgewicht und Tibialänge

Nach Tötung durch zervikale Dislokation unter Narkose wurde die rechte Hintergliedmaße entnommen, in einem Gefäß gekocht und das Schienbein (*Tibia*) herauspräpariert. Die Länge der *Tibia* wurde mit Hilfe der ZEN-Mikroskopsoftware (Carl Zeiss AG) vermessen.

Schwankungen im Körpergewicht machten es zu einer unzuverlässigen Referenz für die Normalisierung des Herzgewichts. Um das Ausmaß der vermuteten Hypertrophie zu quantifizieren, wurde das Herzgewicht (mg) durch die Tibialänge (mm) geteilt und somit das Verhältnis zwischen Herzgewicht (HG) und Tibialänge ermittelt.

3.7 Histologie

3.7.1 Anfertigung histologischer Schnitte

Die entnommenen Herzen von männlichen WT- und HCN4F-Mäusen wurden mit PBS gespült und in 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS für 24h bis 48h im Dunkeln bei 4°C fixiert. Nach der Fixation wurden die Proben einzeln in beschriftete Tissue-Tek Kassetten (Sakura Finetek) gelegt und ca. 2h unter fließendem VE-Wasser in einem Gefäß gespült. Die Organe wurden mit Hilfe eines Shandon Excelsior™ (Thermo Electron Corporation) entwässert und anschließend

mit einer Leica EG 1150H Paraffin Embedding Station (Leica Microsystems) in Paraffin eingebettet. Mit einem Microm HM335E (Mikrom GmbH) wurden die Proben zuerst in 10-20 µm Schritten getrimmt, um zu den repräsentativen Bereichen der Probe zu gelangen. Nach dem Trimmen wurden Schnitte von 5 µm Dicke angefertigt und im Wasserbad GFL 1052 (Gesellschaft für Labortechnik mbH) bei 42°C auf einen Objektträger aufgezogen und bei Raumtemperatur für 24h getrocknet. Es wurde drauf geachtet, dass die Schnitte von allen eingebetteten Herzen immer aus der gleichen Ebene sind.

Gewebeeinbettung Programm:

Reagenz	Temp.	Dauer
Ethanol 75%		2 h
Ethanol 90%		1 h
Ethanol 96%	37°C	1 h
Ethanol 100%		1 h
Ethanol 100%		1 h
Ethanol 100%		1 h
Xylol		1 h
Xylol	37°C	1 h
Xylol		1 h
Wachs		1:20 h
Wachs	61°C	2:20 h
Wachs		3:30 h

3.7.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Paraffinschnitte wurden vor der Hämatoxylin-Eosin (H&E-) Färbung mit Xylol entparaffinisiert und anschließend mit einer Ethanolreihe rehydriert. Die H&E-Färbung lief in zwei Färbeschritten ab. Im ersten Schritt wurden die Herzschnitte mit Mayer's Hämatoxylin Lösung (Sigma-ALDRICH Inc.) gefärbt. Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, der aus dem Blauholzbaum *Haematoxylum campechianum* extrahiert wird. Hämatoxylin färbt alle Strukturen blau, die sauer bzw. basophil sind wie z.B. Zellkerne, DNA und das mit Ribosomen angereicherte raue endoplasmatische Retikulum. Im zweiten Schritt der H&E-Färbung wurden alle basischen (eosinophilen) Strukturen, die vor allem die Zellplasmaproteine umfassen, mit

dem sauren Farbstoff Eosin Y (Sigma-ALDRICH Inc.) rot gefärbt. Nach der Färbung wurden die Schnitte ca. 1h lang bei Zimmertemperatur getrocknet und mit einem Deckglas mittels Eukitt Quick-hardening mounting Medium (Sigma Aldrich) luftdicht versiegelt. 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 Bilder von den Herzschnitten angefertigt.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung:

Reagenz	Zeit
Xylol I	10 min
Xylol II	10 min
Ethanol 100%	5 min
Ethanol 96%	5 min
Ethanol 70%	5 min
VE-H ₂ O	2-3 s
Mayer's Hämatoxylin	5 min
Leitungswasser	5 min
Eosin Y	5 min
VE-H ₂ O	2-3 s
Ethanol 96%	2-3 s
Ethanol 100%	5 min
Xylol II	5 min
Xylol III	5 min

3.7.3 Sirius Red-Fast Green Färbung

Sirius red und *Fast green* ist eine Farbstoffkombination, die zur Unterscheidung von Kollagen in Geweben verwendet wird. Bei dieser Färbung wird fibrotisches Gewebe unter dem Lichtmikroskop rot dargestellt. Im ersten Schritt wurden die Schnitte mit 0,1 % *Fast green* FCF F7252-5G (Sigma-Aldrich), gelöst in ddH₂O, gefärbt. Die zweite Färbung erfolgte in 0,01 % *Direct red* 80 (365548-5G, Sigma-Aldrich). Die Färbelösung bestand aus *Sirius red* in einer gesättigten wässrigen Lösung von Pikrinsäure. Nach der Färbung wurden die Schnitte ca. 1h lang bei Zimmertemperatur getrocknet und mit einem Deckglas mittels *Eukitt Quick-hardening mounting Medium* (Sigma Aldrich) luftdicht versiegelt. 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 Bilder von den Herzschnitten angefertigt.

Sirius Red-Fast Green Färbung:

Reagenz	Zeit
Xylol I	10 min
Xylol II	10 min
Ethanol 100%	5 min
Ethanol 96%	5 min
Ethanol 70%	5 min
VE-H ₂ O	2-3 s
Fast green 0,1%	30 min
Essigsäure 1%	1 min
Leitungswasser	5 min
Direct red 0,01%	20 min
VE-H ₂ O	2-3 s
Ethanol 70%	2-3 s
Ethanol 100%	1 min
Xylol III	3 min

3.8 Arbeiten mit Ribonukleinsäure (RNA, *ribonucleic acid*)

Der Umgang mit RNA erfordert größte Sorgfalt. RNA ist sehr anfällig für den Abbau durch RNasen, die eine sehr hohe Stabilität besitzen und sogar nach Autoklavierung immer noch aktiv sein können. Alle Organismen produzieren RNasen und sind auch im menschlichen Schweiß vorhanden. Um einen RNA-Abbau durch RNasen zu vermeiden, wurden Arbeitsflächen, Geräte sowie Einweghandschuhe vor dem Arbeiten mit RNase AWAY® (Molecular BioProducts, Inc.) behandelt.

3.8.1 Isolierung von RNA aus Gewebe

Herzgewebe (linker Ventrikel, LV) von WT- und HCN4F-Mäusen wurde isoliert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -

80°C gelagert. RNA aus dem LV wurde mit dem *RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit* (Qiagen) gemäß dem Protokoll des Herstellers extrahiert. Die RNA-Konzentrationen wurden mit dem Nanodrop™ 2000c Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.8.2 Komplementäre DNA (cDNA)-Synthese aus *messenger* RNA (mRNA)

Die cDNA-Synthese aus der isolierten mRNA erfolgte mit dem *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific) gemäß dem Protokoll des Herstellers. Dabei wird die einzelsträngige mRNA durch reverse Transkription mit Hilfe eines *Mastercycler nexus gradient* (Eppendorf) in doppelsträngige cDNA umgeschrieben.

cDNA Synthese Ansatz:

Gesamt-RNA	1 µg
Oligo (dT)18 primer	1 µl
Random hexamer primer	1 µl
H ₂ O (RNase frei) ad	12 µl

Im ersten Schritt wurde die Reaktionsmischung bei 65°C für 5 Minuten inkubiert, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen, und danach langsam auf 10°C abgekühlt, damit die Primer hybridisieren können. Anschließend wurden folgende Komponenten hinzugefügt:

5x Reaktionspuffer	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl)	1 µl
dNTP Mix (10 mM)	2 µl
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µl)	1 µl

Protokoll für den Thermocycler:

25°C	5 min
42°C	60 min
70°C	5 min
10°C	∞

Nach Abschluss des Prozesses wurde die cDNA bis zur direkten weiteren Verwendung auf Eis gelagert oder bei -80 °C für die spätere Verwendung aufbewahrt.

3.8.3 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR, *real-time quantitative PCR*)

Um das Expressionslevel von bestimmten Genen in einer Probe zu bestimmen, kam die Methode der qPCR zum Einsatz. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, wobei zusätzlich eine Quantifizierung der vervielfältigten DNA über eine Fluoreszenzmessung, deren Intensität proportional zur Menge des entstehenden PCR-Produkts ist, in Echtzeit erfolgt. Zu diesem Zweck wurden die Ansätze ausgehend von einer 1:5 Verdünnung der bereits amplifizierten cDNA in Kombination mit dem *PowerUp SYBR Green Master Mix* (ThermoFisher Scientific) erstellt. Primer für die Zielgene wurden von Eurofins Genomics GmbH bezogen. Die PCR-Reaktionen wurden mit einem QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt und mit der QuantStudio™ Design & Analysis Software (Applied Biosystems) ausgewertet. Für eine höhere Genauigkeit wurde die Quantifizierung jeweils mit einem Duplikat der Probe durchgeführt. Als Ergebnis wird jeweils der Mittelwert eines Duplikates angegeben. Die relative Genexpression wurde durch die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ermittelt (Livak and Schmittgen 2001). Hierbei wurde die jeweilige DNA zunächst anhand des mitgeführten Housekeeping-Gens mALAS normalisiert (ΔCT) und anschließend die relative Expression durch Bezug auf die Kontrollprobe (WT-Sham und WT-TAC) errechnet ($\Delta\Delta\text{CT}$). Der qPCR-Ansatz wurde wie folgt in eine MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate; 0,1 mL (Applied Biosystems™) pipettiert.

qPCR-Ansatz	Volumen [μl]
cDNA	2,5 μl
Vorwärtsprimer	0,8 μl
Rückwärtsprimer	0,8 μl
H ₂ O	3,4 μl
SYBR Green® Master Mix	10 μl

qPCR-Programm	Zeit
50°C	2 min
95°C	2 min
95°C	5 sec
58°C	5 sec (40 Zyklen)
60°C	30 sec
95°C	15 sec
60°C	1 min
95°C	5 sec
95°C	15 sec

qPCR Primersequenzen

Primer		Sequenz (5'→3')	Schmelzpunkt
Act1 (alpha-SA) vorwärts		AGTCAGAGCAGCAGAACTAGA	58°C
Act1 (alpha-SA) rückwärts		CCACGATGGATGGGAACACA	59°C
Nppa (ANP) vorwärts		CGTCTTGGCCTTTTGGCTTC	59°C
Nppa (ANP) rückwärts		GGTGGTCTAGCAGGTTCTTGAAA	61°C
Nppb (BNP) vorwärts		TTTGGGCTGTAACGCACTGA	57°C
Nppb (BNP) rückwärts		CACTTAAAGGTGGTCCCAGA	60°C
Col3a1 vorwärts		TGACTGTCCCACGTAAGCAC	59°C
Col3a1 rückwärts		GAGGGCCATAGCTGAACTGA	59°C
mAlas vorwärts		CAGGAGGACGTGCAGGAAAT	59,4°C
mAlas rückwärts		CGGCTTGGATCCTCTCCATC	61,4°C

3.8.4 RNA-Sequenzierung (RNA-Seq, *Next Generation Sequencing*)

Viele biologische Prozesse werden auf transkriptioneller Ebene reguliert (Casamassimi and Ciccodicola 2019). Eine Fehlregulierung der Transkription kann ein breites Spektrum von Krankheiten verursachen (Lee and Young 2013). Die RNA-Sequenzierung bietet die Möglichkeit Einblicke in das Transkriptom einer Zelle zu gewinnen (Kukurba and Montgomery 2015). Die Transkriptomanalyse hilft wichtige Veränderungen der biologischen Prozesse, die Krankheiten auslösen, aufzudecken und somit das Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen zu verbessern (Casamassimi et al. 2017).

Für die RNA-Seq wurden RNA-Proben aus dem LV genutzt, welche auch für die qPCR-Analyse verwendet wurden. Die RNA-Sequenzierung und die Analyse erfolgte extern bei *Azenta Life Sciences* mit *Next Generation Sequencing* (NGS). Für die Untersuchung wurden insgesamt 16 Proben, jeweils vier Proben pro Gruppe (WT-Sham, HCN4F-Sham, WT-TAC und HCN4F-TAC), verwendet. Ein Vergleich der Genexpression zwischen den Gruppen wurde mit DESeq2 durchgeführt. Der Wald-Test wurde verwendet, um p-Werte und *log2 fold changes* zu generieren. Gene mit einem adjustierten $p < 0,05$ und einer absoluten *log2 fold change* > 1 wurden als signifikant differenziell exprimierte Gene eingestuft.

3.9 Druck-Volumen-Messung

Mittels eines Linksherzkatheters ist es möglich, hämodynamische Druck-Volumen-Messungen des Herzens durchzuführen und Daten in Echtzeit zu erheben, die den exakten Herzzyklus als Druck-Volumen-Kurve (PV-Loop) beschreiben. Bereits in den 1980er-Jahren wurde die PV-Loop-Technologie bei Menschen und großen Tieren eingesetzt. Erst in den 90er-Jahren ermöglichte die technische Weiterentwicklung des Konduktanz-Katheters die Anwendung dieses Ansatzes an Nagetieren (Abraham and Mao 2015, Pacher et al. 2008). Dieses Verfahren eröffnet die Möglichkeit, im Mausmodell pathophysiologische Mechanismen komplexer Herzerkrankungen wie der Herzinsuffizienz, der Kardiomyopathie oder klappenbedingter Herzerkrankungen (Bastos et al. 2020, Burkhoff et al. 2015, Townsend 2016) zu bestimmen. Der Konduktanz-Linksherzkatheter verfügt über vier Ringelektroden und einen Drucksensor. Die Elektroden sind paarweise proximal und distal des Drucksensors lokalisiert. Zwischen den äußeren Elektroden wird ein hochfrequenter Wechselstrom mit niedriger Amplitude angelegt, der ein lokales elektrisches Feld zwischen diesen beiden Elektroden erzeugt. Das elektrische Feld durchdringt das Blut, das Herzmuskelgewebe und umliegende Strukturen, wobei die

Feldstärke mit dem Quadrat der Entfernung von den Elektroden abnimmt. Da die Leitfähigkeit des Blutes etwa dreimal so hoch wie die des Herzmuskels ist (Cingolani and Kass 2011), verändert sich dieses Feld unterschiedlich in Abhängigkeit vom Medium, das es durchdringt. Da der Einfluss des Herzmuskels auf das elektrische Feld näherungsweise konstant ist, während das Blutvolumen im zeitlichen Verlauf des Herzzyklus variiert, sind die zeitlichen Veränderungen im Leitwert-Signal auf Änderungen des Blutvolumens zurückzuführen. Die Spannungsänderungen werden von den innen liegenden Elektroden detektiert und aus ihnen das ventrikuläre Volumen berechnet.

Mithilfe dieser Technik konnte die Herzfrequenz (HF [bpm]), das Schlagvolumen (SV [μ l]), berechnet als Differenz zwischen linksventrikulärem enddiastolischen (EDV [μ l]) und linksventrikulärem endsystolischen Volumen (ESV [μ l]), schnellster Volumenanstieg und Volumenabfall (dV/dt_{max} und dV/dt_{min} [μ l/s]), sowie Auswurfraction (EF [%]) und das Herzzeitvolumen (HZV [ml/min]), als ein wichtiger Parameter in der Beurteilung der Herzleistung, über den gesamten Herzzyklus aufgezeichnet werden. Außerdem konnten der linksventrikulär entwickelte Druck als Differenz zwischen maximalem systolischen und dem enddiastolischen Druck, die Druckanstiegs- und Druckabfallgeschwindigkeit (dP/dT_{max} und dP/dT_{min} [mmHg/s]) als Parameter für die globale Kontraktilität und Relaxation des Myokards und darüber hinaus der linksventrikuläre maximale/minimale gemessene Druck beurteilt werden.

3.9.1 Durchführung der Hämodynamik-Messungen

Um die Auswirkung der TAC-OP zu untersuchen und eine Beurteilung der Herzfunktion zu ermöglichen, wurden die hämodynamischen Parameter der Mäuse fünf Wochen nach der Operation bestimmt. Hierzu wurden die Tiere gewogen und das Gewicht dokumentiert. Danach wurden die Mäuse mit einer Inhalationsnarkose (Isofluran) narkotisiert und auf einer Wärmeplatte fixiert. Die Narkose wurde über ein Masken-Narkosesystem mit Absaugmodul (L.A.S. Lab Active Scavenger; Groppler Medizintechnik) mittels Isofluran (1,5 Vol % bei einer Durchflussrate von 1 L/min) in Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) aufrechterhalten. Isofluran wurde gewählt, weil es nur geringe kardiodepressive Eigenschaften aufweist und somit die Herzfunktion (z. B. Herzfrequenz, Erregungsleitungsgeschwindigkeit) sehr wenig beeinflusst (Hennis et al. 2022b). Darüber hinaus lassen sich die Tiefe und die Dauer der Anästhesie mit Isofluran sehr gut kontrollieren. Außerdem wurde den Tieren eine Temperatursonde *rektal*

eingeführt, um durch Rückkopplung mit der Wärmeplatte die Körperkerntemperatur konstant bei 37°C zu halten. Die Operationsstelle wurde mit Lokalanästhetikum (Lidocain Braun 1% 0,5 mg/ml) umspritzt. Nach Enthaarung bestand der operative Eingriff aus einem Hautschnitt, sowie der Präparation und Eröffnung der *Arteria carotis sinistra*, über die der Linksherzkatheter (Transonic Systems Inc.; FTH-1212B-3518) im linken Ventrikel positioniert wurde. Nach einer erfolgreichen Positionierung des Linksherzkatheters, die durch Überwachung der Druckkurve überprüft werden konnte, wurden die hämodynamischen Messungen mittels des *Scisense Pressure-Volume Measurement System ADV500* (Fa. Transonic) durchgeführt. Mittels der *LabChart Software* konnten die Aufzeichnungen direkt in Druck-Volumen-Schleifen, die sogenannten PV-Loops, umgewandelt werden, wobei jede Schleife einen Herzzyklus darstellt. In einem Arbeitsdiagramm wird das Volumen (μl) auf der Y-Achse und der Druck (mmHg) auf der X-Achse dargestellt. Bei einer korrekten Platzierung des Katheters im linken Ventrikel wird ein abgeschlossener Herzzyklus, unter physiologischen Bedingungen, durch eine nahezu rechteckige PV-Schleife repräsentiert.

3.9.2 Datenauswertung

Die Aufzeichnungen wurden mit einem Scisense 1.2F Rodent Pressure Volume Catheter (Transonic Systems Inc.) in Verbindung mit einem ADV500 PV Loop System (Transonic Systems Inc.) und LabChart 8 Pro Software (ADInstruments Ltd) durchgeführt. Die Datenauswertung mit LabChart erfolgte mit Hilfe des PV-Loop-Softwaremoduls. Nach Auswahl der auszuwertenden Zeitabschnitte wurden die einzelnen Herzzyklen durch eine automatische Eventdetektion identifiziert und die o.g. hämodynamischen Parameter angezeigt. Für die weitere Datenauswertung wurden für jedes Versuchstier die Druck- und Volumensignale von 20 aufeinanderfolgenden PV-Loops einzeln aus LabChart exportiert und mit Hilfe der OriginPro 2019 Software weiterverarbeitet. Dabei wurde die Zeitskala jedes Herzzyklus auf 0-1 normalisiert und anschließend eine Datenreduktion der Druck- und Volumensignale relativ zur normalisierten Zeitskala mit einer einheitlichen Abtastrate von $x = 0,0075$ durchgeführt. Aus den so erhaltenen Druck- und Volumendaten der 20 PV-Loops wurde zunächst für jedes x -Inkrement ein Mittelwert gebildet. Anschließend wurde aus den berechneten Mittelwerten der einzelnen Versuchstiere innerhalb der zu untersuchenden Gruppen erneut für jedes x -Inkrement ein Mittelwert der Druck- und Volumendaten berechnet. Zur getrennten Visualisierung des gemittelten Druck- und Volumenverlaufs während eines Herzzyklus wurden die entsprechenden Datenmengen der einzelnen Versuchsgruppen gegen

die normalisierte Zeitskala (0-1) aufgetragen. Zur Visualisierung der gemittelten Druck-Volumen-Schleifen (PV-Loops) der einzelnen Gruppen wurden die Daten des Druckverlaufs gegen die entsprechenden Volumendaten aufgetragen. Nach der Durchführung der Hämodynamik-Messung wurden die untersuchten Tiere euthanasiert. Anschließend wurde das Herz entnommen und mit PBS (pH 7,4) gespült, von Blut befreit, trocken gewogen und das Ergebnis notiert.

3.10 Verwendete Materialien

Medikamente:

Baytril® (25mg/ml Inj. Enrofloxacin)	Elanco GmbH
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (5% Dexpanthenol)	Bayer Vital GmbH
Buprenovet® Multidose Inj. (0,3mg/ml Buprenorphin Hydrochlorid)	Richter Pharma AG
Isofluran CP® (1ml/ml Isofluran)	CP-Pharma
Ketamin Inj. (10% Ketamin Hydrochlorid)	Serumwerk Bernburg AG
Lidocain Inj. (Lidocainhydrochlorid 1 H ₂ O 10mg/ml)	B. Braun Melsungen AG
0,9% Isotonische Natriumchlorid-Lösung ad us. Vet. B. Braun Vet Care	B. Braun Melsungen AG
Octenisept® Wässriges Wund und Schleimhautantiseptikum (Ringer-Lactat-Lösung nach Hartmann B. Braun Vet Care)	Schülke & Mayr GmbH
Vet-Sept Salbe (100mg/g Povidon-Jod)	B. Braun Melsungen AG
Xylarium® Inj. (20mg Xylazin)	aniMedica GmbH
	Ecuphar N.V.

Instrumente für die Durchführung der Operation:

Abgewinkelte Schere (Dissector Scissors-Heavy Blades)	FST, Art Nr. 14082-09
Feine Knochenschere, gerade (Wolframkarbid)	FST, Art Nr. 14568-12
Feine Pinzetten (Dumont Nr. 5)	FST, Art Nr. 11253-25
Vannas-Federschere, 2.5 mm Klängen	FST, Art Nr. 15000-08
Gebogene anatomische Pinzetten (Graefe)	FST, Art Nr. 11051-10
Gerade anatomische Pinzetten (Semken)	FST, Art Nr. 11008-13
Hartmann Klemme, gebogen (Klemmlänge 18mm)	FST, Art Nr. 13003-10
Ligation Aids	FST, Art Nr. 18062-12
Nadelhalter (Olsen-Hegar)	FST, Art Nr. 12502-12
Stumpfe Präparierschere (Lexer-Baby)	FST, Art Nr. 14078-10
Stumpfe Wundhaken 2,5mm	FST Art Nr. 18200-10)

Nahtmaterial:

SEIDE schwarz 5/0 USP, HR12, 45cm; nicht resorbierbar	Resorba Medical GmbH, ref. 4023
SEIDE schwarz 6/0 USP, DR10F, 45cm; nicht resorbierbar	Resorba Medical GmbH, ref. 4072N
PGA Resorba® violett 6/0 USP, HR 12, resorbierbar	Resorba Medical GmbH, ref. PA 10273

Verbrauchsmaterialien:

Enthaarungsmousse	Pilca 150 ml; Müller Handels GmbH
ES-Kompressen, steril, 8fach, 7,5x7,5 cm	Paul Hartmann AG; ref. 220193
Gewebeklebeband weiß, 10mx19mm	Toolcraft; Best. Nr. K19W
HS-OP Abdecktuch PE grün 30x45cm steril	Henry Schein Inc.; ref. 9008810
Leukosilk® Fixierpflaster 9,2mx1,25cm	BSN Medical GmbH; ref. 221322
Sterican® Einmalkanülen 26G Ø 0,45x25mm	B. Braun Melsungen AG; ref. 4657683
Sterile Saugtupfer Sugi® Sponge points	Kettenbach GmbH; ref. 31603
VasoVet Braunüle G22 0,9x25 mm, blau	B. Braun Melsungen AG; ref. 322419
Wattestäbchen steril, 15 cm	Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH; ref. 370341

Geräte:

Aesculap Schermaschine Isis GT421-SN	Aesculap GmbH; Art Nr. 26899
Homeothermic Blanket System mit flexibler Sonde zur Temperaturüberwachung	Harvard Apparatus; Art Nr. 507221F
Isofluran-Verdampfer	Völker Medizintechnik GmbH)
Kaltlichtquelle Schott KL 2500 LCD	Carl Zeiss AG
Mouse Ventilator <i>MiniVent</i> Model 845	Hugo Sachs Elektronik; Art Nr. 73-0044
Operationsmikroskop OPMI 1 FR Pro	Carl Zeiss Meditec AG
Sterilisiergerät (Hot Bead Sterilizers)	FST, Art Nr. 18000-45
Systemmikroskop Modell BX41	Olympus; BX41TF
Stereomicroscope Stemi 2000	Carl Zeiss Meditec AG
Wärmeplatte Hot Plate 062	Labotect GmbH; Art Nr. 13854

Datenerfassung und Analyse:

Labchart v8.1.16	ADInstruments
CellSensEntry	Olympus LS
Excel 2013	Microsoft
ImageJ	Offene Quelle
Origin 2019	OriginLab
Zen	Carl Zeiss AG
QuantStudio™ Design & Analysis Software	Applied Biosystems

3.11 Datenanalyse

Die Datenanalyse wurde mit OriginPro 2019 (OriginLab) durchgeführt. Die Abbildungen wurden mit Adobe Illustrator 2022 (Adobe Systems, Inc.) erstellt. Alle Ergebniswerte wurden, sofern nicht anders vermerkt, als Mittelwert \pm SEM angegeben. Der Buchstabe n steht für die Anzahl der Tiere. Bei den statistischen Tests wurde $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen ($***p < 0,001$; $**p < 0,005$; $*p < 0,05$; $p > 0,05 = \text{n.s.} = \text{nicht statistisch signifikant}$). Die Daten wurden auf Normalverteilung getestet und Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit dem ungepaarten t-Test für zwei Stichproben analysiert.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der kardiale Phänotyp der HCN4F-Mauslinie charakterisiert. In diesem Zusammenhang wurde eine neue, anspruchsvolle *in vivo* Methode, die TAC, etabliert, um eine druck-induzierte Herzhypertrophie auszulösen. Dementsprechend ist die erfolgreiche Etablierung dieser TAC-OP im Ergebnisteil aufgeführt.

4.1 Transverse Aortenkonstriktion

Die transverse Aortenkonstriktion bei der Maus ist ein häufig verwendetes Versuchsmodell, bei dem durch eine definierte Konstriktion der Aorta eine Drucküberbelastung des linken Ventrikels erzielt wird, wodurch eine druck-induzierte Herzhypertrophie und die Entwicklung einer Herzinsuffizienz ausgelöst wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode eingesetzt, um den potenziellen Einfluss der HCN4F-Mutation und der einhergehenden erhöhten Herzfrequenz der HCN4F-Mäuse auf kardiale *Remodeling* Prozesse bei der Entwicklung der kardialen Hypertrophie zu untersuchen.

Die Narkoseeinleitung und die Vorbereitung für die Durchführung der TAC-OP wurden im Abschnitt 3. Material und Methoden ausführlich beschrieben. Nach dem sicheren Feststellen ausreichender Narkosetiefe, die in regelmäßigen Abständen mit Hilfe des Zwischenzehenreflexes überprüft wurde, erfolgte eine 0,5-1 cm lange, mediane Inzision der Haut auf der ventralen Seite des unteren Halses und der Brust, ungefähr auf der Höhe der *Clavicula* (Abbildung 9A-B). Die *Glandula thyroidea* wurde nach stumpfer Präparation des Bindegewebes vorsichtig nach kranial geschoben (Abbildung 9C). Die über der Trachea liegenden Halsmuskeln wurden nach Durchtrennung der zervikalen Faszien, vorsichtig voneinander getrennt. Der *Musculus pectoralis descendens* wurde vorsichtig angehoben und die gebogene stumpfe Pinzette im geschlossenen Zustand vorsichtig über der Trachea mittig hinter das *Sternum* eingeführt. Durch das Öffnen und Schließen der Pinzette wurde die prätracheale Muskulatur stumpf durchtrennt. Anschließend wurde das Sternum mit einer abgewinkelten Schere ca. 5 mm bis zur zweiten Rippe eingeschnitten (Abbildung 9D) und das Operationsfeld mit speziell angefertigten stumpfen Wundhaken gespreizt (Abbildung 9E). Die Wundhaken wurden mit Hilfe eines Gewebeklebebands an der Wärmeplatte fixiert. Die Thymuslappen wurden durch stumpfe Präparation getrennt und vorsichtig nach lateral geschoben (Abbildung 9F). Hierdurch konnte der *Arcus aortae* mit Darstellung des Abgangs

des *Truncus brachiocephalicus*, der *Arteria carotis communis sinister* sowie der linken *Arteria subclavia* freipräpariert werden (Abbildung 9G). Mittels einer Ligaturhilfe wurde ein nicht resorbierbarer Faden der Stärke 6-0 zwischen *Truncus brachiocephalicus* und *Arteria carotis communis sinistra* um den Aortenbogen geführt (Abbildung 9H-I) und ein zweifacher Knoten vorgelegt (Abbildung 9J). Das Festziehen der Knoten erfolgte nach Platzierung einer speziell angefertigten, abgestumpften 26G-Hilfskanüle als Abstandshalter unterhalb des Knotens (Abbildung 9K). Der Faden wurde gekürzt und die Kanüle sofort entfernt (Abbildung 9L). Hierdurch wurde der Durchmesser der *Aorta ascendens* auf einen standardisierten Durchmesser (26G) verringert und so der Druck im linken Ventrikel gesteigert. Im Anschluss wurden das Sternum, die Muskulatur und die Haut schichtweise mit Einzelknopfnähten geschlossen. Der chirurgische Eingriff dauerte in der Regel etwa 20 Minuten. Abschließend wurde die Intubationskanüle entfernt und die Tiere bis zum Aufwachen mit Sauerstoff über eine Maske versorgt. In dieser Zeit wurde deren Körpertemperatur mittels eines Heizkissens weiterhin konstant auf 37°C gehalten. Für einen Zeitraum von 24 Stunden nach dem Erwachen der Tiere wurde eine Hälfte des Käfigs auf eine Wärmeplatte positioniert, damit die Tiere sich bei Bedarf wärmen konnten. Zur Analgesie an den postoperativen Tagen wurde Buprenorphin 0,1 mg/kg KG in einer sterilen 0,9% NaCl Lösung subkutan verabreicht. Die Applikation erfolgte an den ersten drei Tagen in Intervallen von acht Stunden. An den letzten beiden Tagen wurde das Intervall auf zwölf Stunden erhöht. Als Kontrolltiere dienten Mäuse, die einer Schein-OP (Sham-OP) unterzogen wurden. Die Schein-OP wurde in gleicher Weise ausgeführt, wie die TAC-OP jedoch wurde keine Ligatur durchgeführt und somit keine Konstriktion der Aorta vorgenommen.

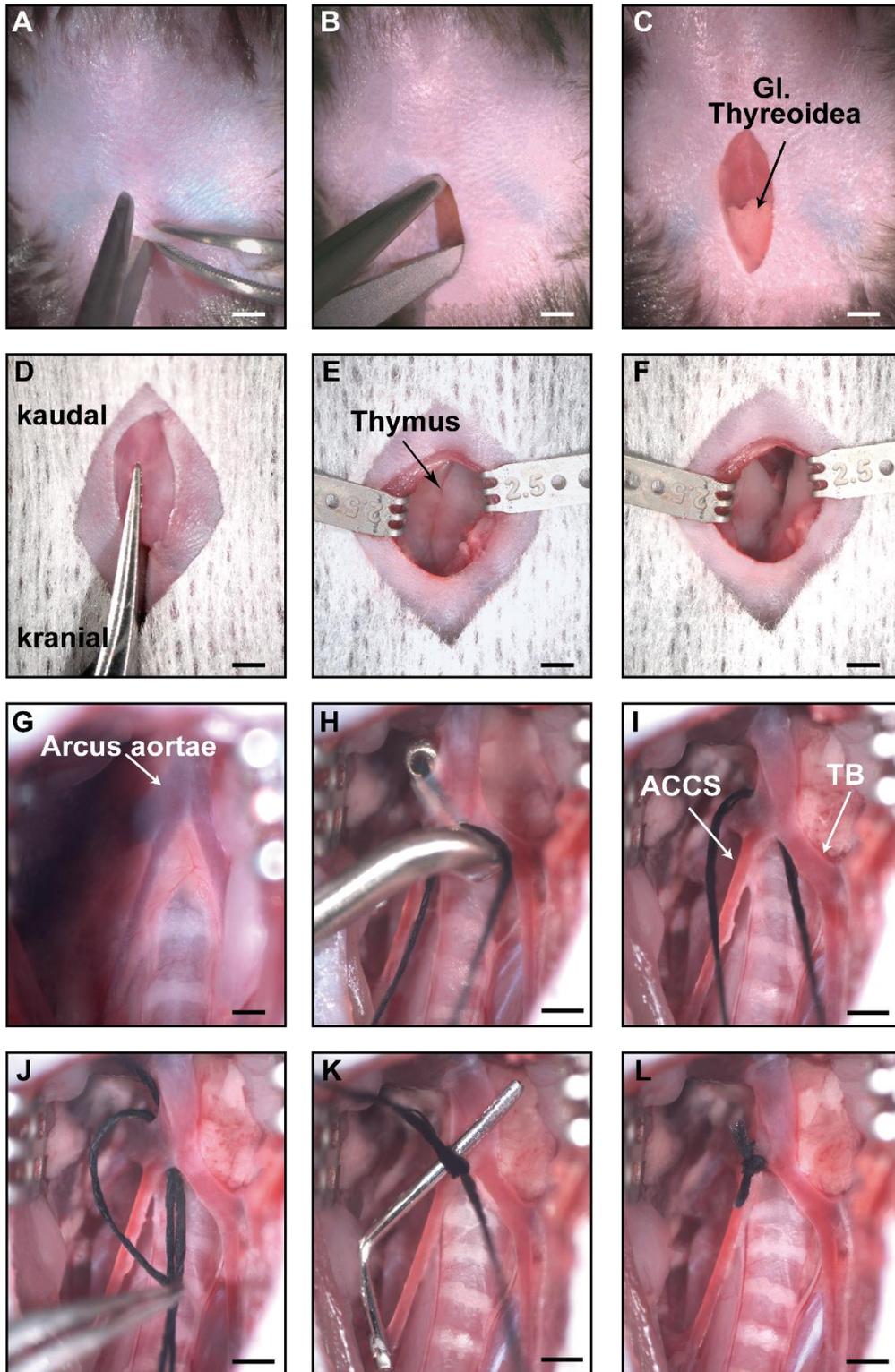


Abbildung 9. Durchführung einer transversalen Aortenkonstriktion. (A, B) Mediane Inzision der Haut ca. 1 cm lang. (C) Stumpfe Präparation der Gl. Thyroidea. (D) Eröffnung des Thorax entlang des Sternums bis zur zweiten Rippe. (E) Aufspreizen des OP-Felds mit speziell angefertigten, stumpfen Wundhaken. (F) Trennung der Thymuslappen durch stumpfe Präparation und Verlagerung nach lateral. (G) Freilegung des Arcus aortae. (H, I) Platzierung des Fadens unter dem Aortenbogen zwischen Truncus brachiocephalicus (TB) und Arteria carotis communis sinister (ACCS) mittels einer Ligaturhilfe. (J) Vorlegen eines doppelten Knotens um den Arcus aortae. (K) Platzierung einer abgestumpften 26G Kanüle als Abstandshalter und Festziehen des Knotens. (L) Die Kanüle wurde entfernt und das Lumen der Aorta auf einen standardisierten Durchmesser von 26G verengt. Maßstabsbalken: 2mm A-G, 1mm H-L.

4.2 Histologische Analyse struktureller Veränderungen auf Organebene

Durch die Verengung des Lumens der Aorta durch das Aortenbanding wird eine druckinduzierte Herzhypertrophie ausgelöst. Das Herz reagiert auf die erhöhte Druckbelastung mit morphologischen Veränderungen. Diese Umbauvorgänge des Herzmuskels werden kardiales *Remodeling* genannt (Abbildung 10A-B).

Um Aussagen über die linksventrikuläre Hypertrophie und das Ausmaß des *Remodeling*-Prozesses treffen zu können, wurden Herzen der vier Experimentalgruppen isoliert, die Herzgewichte gemessen, Dimensionen der Kammern und Wanddicken des Herzmuskels in koronalen Schnitten vermessen sowie die Größe der Kardiomyozyten bestimmt.

Das durchschnittliche Herzgewicht von scheinoperierten WT-Mäusen war vergleichbar mit dem Herzgewicht von scheinoperierten HCN4F-Mäusen (WT-Sham: $148,3 \pm 3,6$ mg, $n=12$; HCN4F Sham: $144,7 \pm 2,9$ mg, $n=14$; Abbildung 10C). Da die Größe und das Gewicht eines Herzens mit der Körpergröße korrelieren, wurde das Herzgewicht zusätzlich auf die Länge des Schienbeins (Tibiallänge) normalisiert, wobei ebenso kein Unterschied zwischen den normalisierten Herzgewichten der beiden Genotypen festgestellt wurde (WT-Sham: $8,1$ mg/mm; HCN4F-Sham: $7,9$ mg/mm; Abbildung 10D). Hinsichtlich des Körpergewichts zeigten die Versuchstiergruppen keine signifikanten Differenzen.

Erwartungsgemäß zeigten sowohl WT- als auch HCN4F- Tiere nach der TAC-OP einen signifikanten Anstieg des Herzgewichtes gegenüber ihrer jeweiligen scheinoperierten Kontrollgruppe (WT-TAC: $210,9 \pm 9,7$ mg, $n=18$; HCN4F-TAC: $195,4 \pm 7$ mg; $n=14$), jedoch war die Erhöhung des Gewichts nach der TAC-OP bei beiden Genotypen gleich stark ausgeprägt (Abbildung 10C-D).

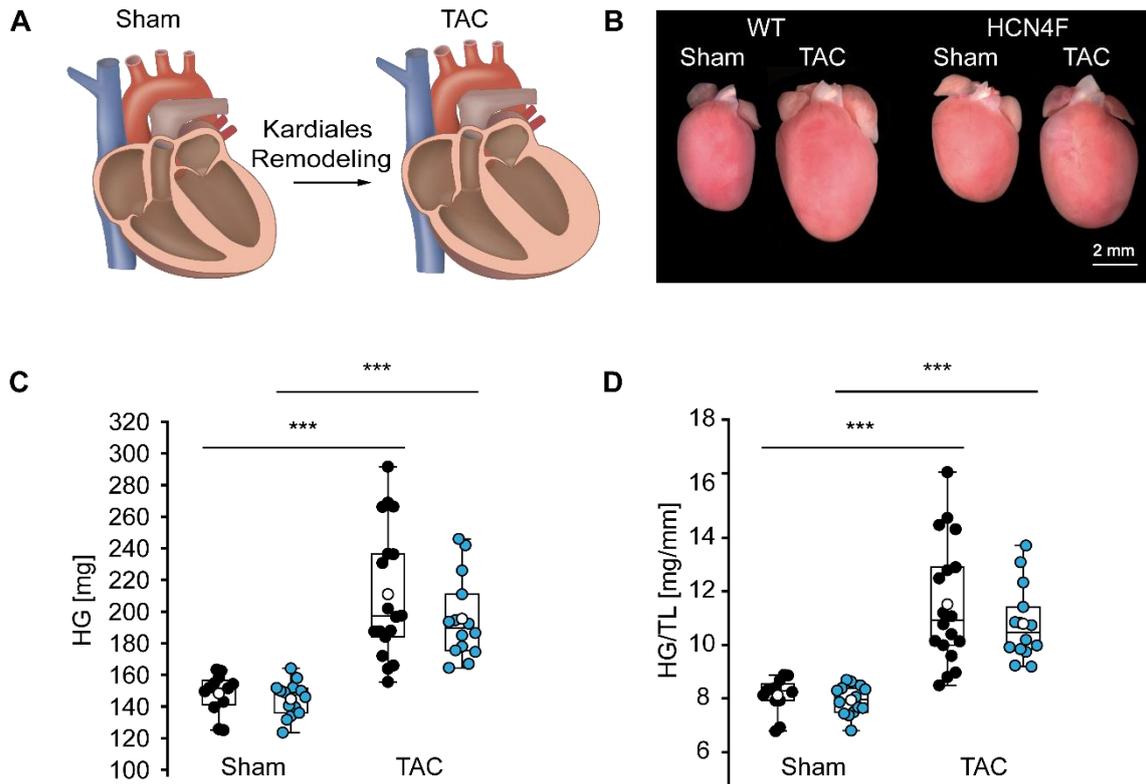


Abbildung 10. Kardiales Remodeling nach der TAC-OP. (A) Schematische Darstellung des druck-induzierten kardialen Remodelings. Vergrößerung und Verdickung des Herzmuskels bei gleichzeitiger Verkleinerung des Ventrikelvolumens aufgrund einer Aortenkonstriktion (TAC, rechts) im Vergleich zu einem gesunden Herzen nach Scheinoperation (Sham, links). (B) Repräsentative Bilder von Herzen isoliert aus WT- (links) und HCN4F- (rechts) Mäusen nach einer Scheinoperation (Sham) und nach einer transversen Aortenkonstriktion (TAC). Deutlich zu erkennen ist die Vergrößerung der Herzen durch die TAC-OP. (C) Herzgewichte ohne statistische Signifikanz in der scheineroperierten Gruppe (WT vs. HCN4F) und in der TAC-operierten Gruppe (WT vs. HCN4F). (D) Herzgewichte normalisiert auf die Tibiallänge. Berechnung der statistischen Signifikanz wurde mittels eines ungepaarten t-Tests durchgeführt. *** $p < 0,001$. (WT-Sham: $n = 12$; HCN4F-Sham: $n = 14$; WT-TAC: $n = 18$; HCN4F-TAC: $n = 14$).

Um die Dimensionen der Herzkammern und Wanddicken des Herzmuskels zu bestimmen, wurden koronale Paraffinschnitte von Herzen der vier Experimentalgruppen angefertigt und mit H&E gefärbt. Von diesen Schnitten wurden Übersichtsbilder angefertigt (Abbildung 11A) und anhand dieser Bilder die Querschnittsflächen der Lumina der rechten Ventrikel (RV) und linken Ventrikel (LV) bestimmt, wobei der Papillarmuskel von der Vermessung ausgeschlossen wurde. In den repräsentativen Übersichtsdarstellungen ist eine deutliche Zunahme der linksventrikulären Querschnittsfläche durch die TAC-OP bei beiden Genotypen zu erkennen, die jedoch signifikant geringer bei HCN4F-Tieren ausgeprägt ist (Abbildung 11B). Noch deutlicher wurde dieser Unterschied erkennbar, nachdem die Fläche auf die Tibiallänge normalisiert wurde (Abbildung 11C). Die Lumina der RV zeigten lediglich eine

Tendenz zu höheren Querschnittsflächen nach der TAC-OP auf, wobei jedoch weder in der scheinoperierten noch in der TAC-operierten-Gruppe Unterschiede zwischen den beiden Genotypen aufgetreten sind (Abbildung 11D-E).

Des Weiteren wurden anhand dieser koronalen Schnitte auch die Wanddicken des RV, des interventrikulären Septums (IVS) und des LV bestimmt. Eine Zunahme der Wanddicke war sehr deutlich im LV und im IVS der Herzen von TAC-operierten WT- und HCN4F-Tieren gegenüber den Herzen der jeweiligen Sham-operierten Tieren zu beobachten. Jedoch zeigte sich hierbei kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen (Abbildung 11F).

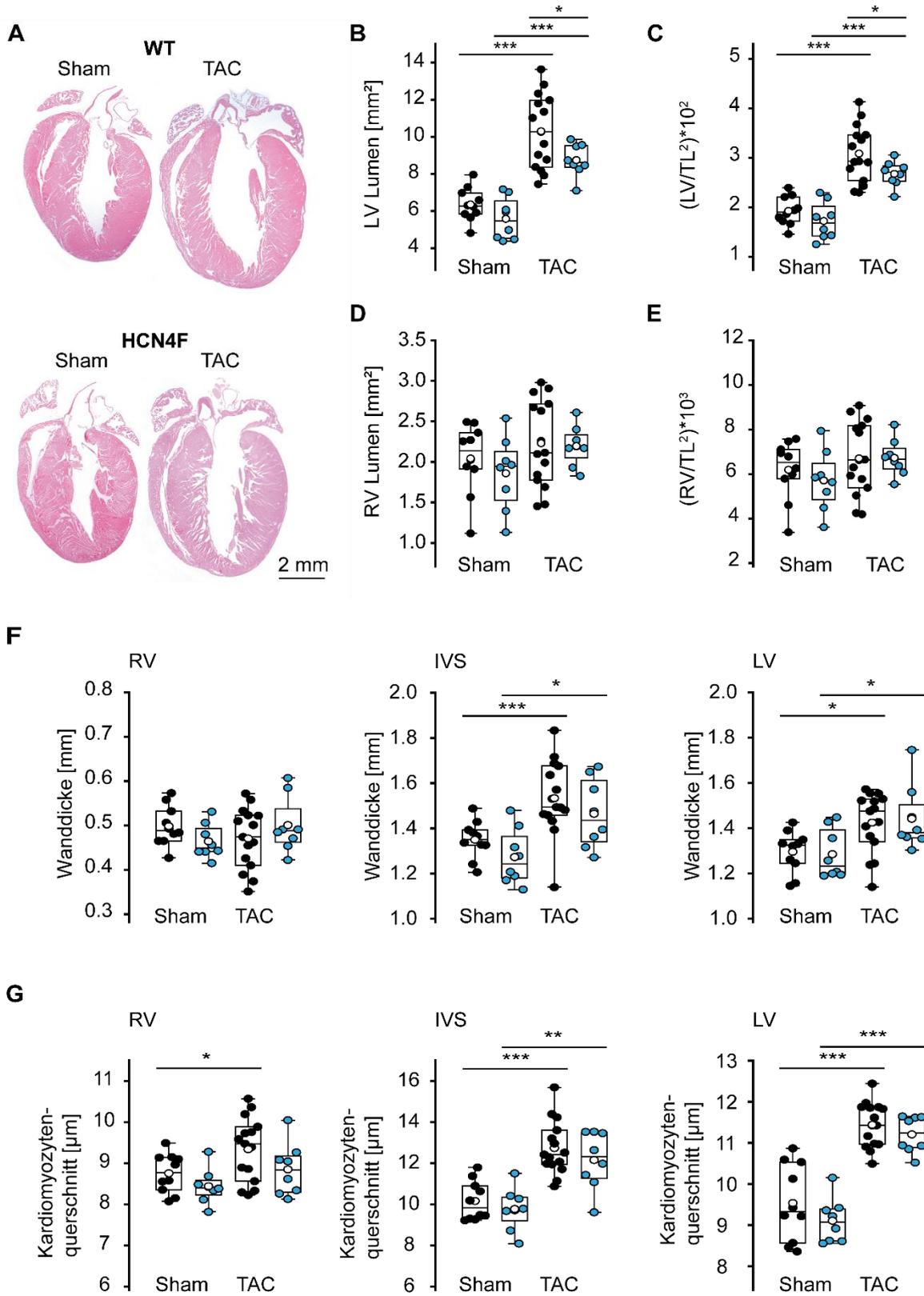


Abbildung 11. Histologische Analyse von WT- und HCN4F- Herzen. (A) H&E-Färbungen repräsentativer, koronaler Herzschnitte von scheinoperierten (Sham, links) und TAC-operierten (TAC, rechts) WT- (oben) und HCN4F-Mäusen (unten). (B) Querschnittsfläche des linksventrikulären Volumens von scheinoperierten (Sham) und TAC-operierten (TAC) WT- (schwarz) und HCN4F-Mäusen (blau). (C) Querschnittsfläche des linksventrikulären Lumens normalisiert auf die Tibiallänge. (D) Querschnittsfläche des rechtsventrikulären Lumens. (E) Querschnittsfläche des rechtsventrikulären Volumens normalisiert auf die Tibiallänge. (F) Wanddicke des rechten Ventrikels (RV, links), interventrikulären Septums (IVS, mittig) und linken Ventrikels (LV, rechts). (G) Kardiomyozytenquerschnitt von Zellen des RV (links), IVS (mittig) und LV (rechts). Bei der Normalisierung von Querschnittsflächen auf die Tibiallänge wurde eine spezielle Formel für die Indexierung von Flächenmessungen verwendet, bei der zweidimensionale Maße (Herzkammern) nicht mit demselben Maß indexiert, sondern mit der quadrierten Tibiallänge (TL^2) (Hagdorn et al. 2019). Die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde mittels eines ungepaarten t-Tests durchgeführt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$. (WT-Sham: $n = 7$; HCN4F-Sham: $n = 7$; WT-TAC: $n = 9$; HCN4F-TAC: $n = 9$).

Zusätzlich zu den Lumina und Wanddicken wurden auch die ventrikulären Querschnittsflächen des Herzens (Herzflächen) und des Muskelgewebes des linken Ventrikels und des interventrikulären Septums bestimmt. Erwartungsgemäß nahmen beide Parameter durch die TAC-OP zu, jedoch signifikant weniger ausgeprägt in HCN4F-Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren (Abbildung 12A-B).

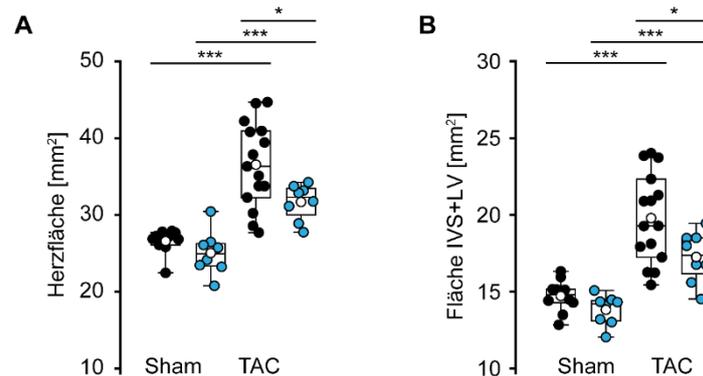


Abbildung 12. Ventrikuläre Flächenparameter. (A) Querschnittsfläche des Muskelgewebes und der Herzkammern. (B) Querschnittsfläche des Muskelgewebes des linken Ventrikels (LV) und des interventrikulären Septums (IVS) von scheinoperierten (Sham) und TAC-operierten (TAC) Tieren. Die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde mittels eines ungepaarten t-Tests durchgeführt. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. (WT-Sham: $n = 10$; HCN4F-Sham: $n = 8$; WT-TAC: $n = 15$; HCN4F-TAC: $n = 8$).

Da die Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) im adulten Organismus ihre Teilungsfähigkeit weitestgehend verloren haben, geschieht bei einer Herzhypertrophie die Zunahme der Myokardmasse nicht durch eine Erhöhung der Zellanzahl (Hyperplasie), sondern durch eine Zunahme der Kardiomyozytengröße (Hypertrophie) (Borlaug and Paulus 2011, Swynghedauw 1999, Zhao et al. 2020). Bei der Größenbestimmung der Kardiomyozyten zeigten WT-TAC und HCN4F-TAC eine signifikante Zunahme des Kardiomyozytenquerschnitts gegenüber den

jeweiligen Sham-Tieren (Abbildung 11G). Hierbei waren die Zellgrößen zwischen WT-TAC und HCN4F-TAC sowie zwischen WT-Sham und HCN4F-Sham jeweils vergleichbar.

Im Rahmen des hypertrophen *Remodelings* kommt es auch zu einer Veränderung der extrazellulären Matrix. Durch die chronische Druckbelastung wird der Aufbau einer kollagenreichen Extrazellulärmatrix induziert und es kommt zu einer interstitiellen sowie einer perivaskulären Fibrose.

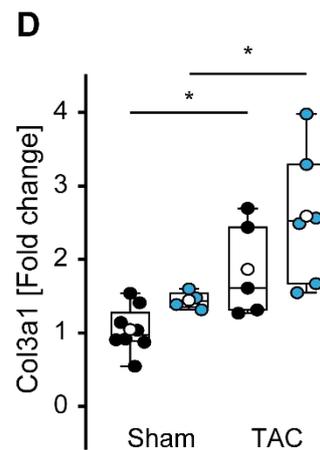
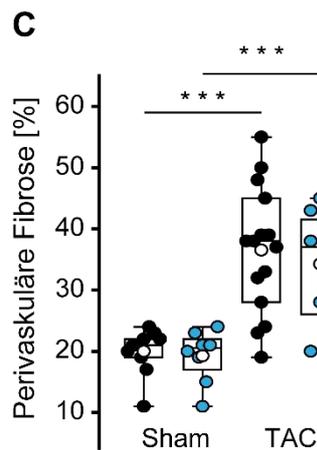
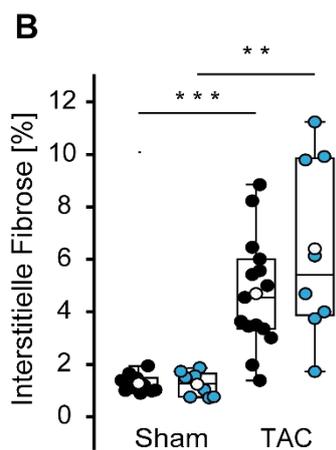
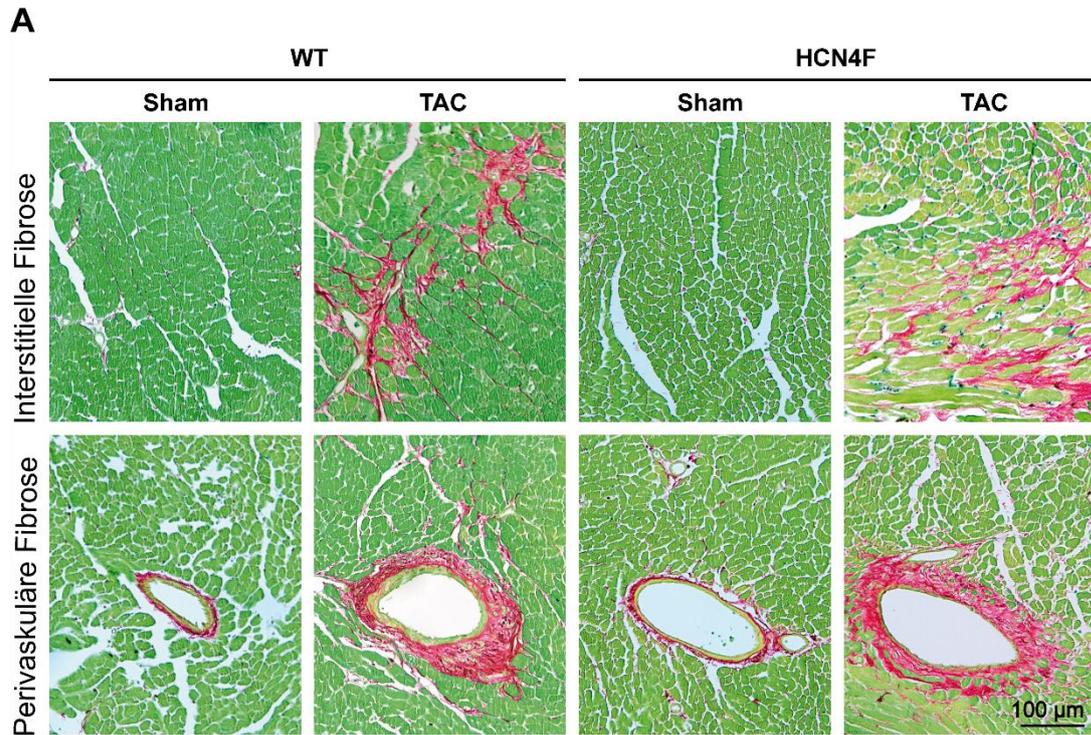


Abbildung 13. HCN4F-Tiere weisen das gleiche Ausmaß von Fibrose auf wie WT-Tiere. (A) Repräsentative linksventrikuläre Aufnahmen der mittels *Sirius red-Fast green* für Fibrose gefärbten koronalen Schnitte von WT- (links) und HCN4F- (rechts) Tieren nach Scheinoperation (Sham) und nach TAC-Operation (TAC). Die Ausschnitte zeigen interstitielle (obere Reihe) sowie perivaskuläre (untere Reihe) Fibrose. **(B)** Quantifizierung der interstitiellen Fibrose. **(C)** Quantifizierung der perivaskulären Fibrose. **(D)** mRNA-Expression des Fibrosemarkers Kollagen III (Col3a1) in linksventrikulärem Gewebe. Die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde mittels eines ungepaarten t-Tests durchgeführt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$. (B-C) WT-Sham: $n = 10$; HCN4F-Sham: $n = 8$; WT-TAC: $n = 15$; HCN4F-TAC: $n = 8$. (D) WT-Sham: $n = 8$; HCN4F-Sham: $n = 4$; WT-TAC: $n = 5$; HCN4F-TAC: $n = 6$.

Es wurden Paraffinschnitte von Sham- und TAC-Herzen angefertigt und der *Sirius red- Fast green* Färbung unterzogen. *Sirius Red* bindet an alle Arten von Kollagen und färbt diese rot, während *Fast Green* nicht-kollagene Proteine anfärbt. Hierdurch wurde das Auftreten von Kollageneinlagerungen im Herzmuskelgewebe untersucht. Es war gut zu erkennen, dass die TAC-Herzen großflächige Bereiche mit interstitieller und perivaskulärer Fibrose aufwiesen, während die Schnitte von Sham-Herzen keine Anreicherung von Kollagen erkennen ließen (Abbildung 13A). Jedoch ergab sich kein Unterschied im Ausmaß der Fibrose zwischen WT- und HCN4F-Herzen der beiden Gruppen (Abbildung 13B-C).

Um die Fibrosierung auf molekularer Ebene genauer zu untersuchen, wurde die Expression der mRNA von Kollagen III (Col3a1) mittels qPCR untersucht. Hierbei zeigte sich keine signifikante Differenz weder in der Sham- noch in der TAC-Gruppe (Abbildung 13D), und somit spiegelten diese Befunde die Erkenntnisse aus der histologischen Untersuchung wider.

4.3 Expression kardialer Hypertrophiemarker

Die natriuretischen Peptide ANP und BNP (ANP, *atrial natriuretic peptide*, Nppa; BNP, *brain natriuretic peptide*, Nppb) und die α -Skelettmuskel-Isoform des Aktins (Acta1) stellen prototypische Vertreter des fetalen Genprogramms dar und sind hochsensible Marker für die kardiale Hypertrophie (Dorn et al. 2003). Zur Bestimmung der mRNA-Expressionslevel von diesen drei Hypertrophiemarkern bezogen auf die Expression des *Housekeeping*-Gens murine δ -Aminolävulinatsynthase 1 (mALAS) wurde eine qPCR durchgeführt. Dadurch sollte ein Einblick in mögliche Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen in Bezug auf das Ausmaß der Hypertrophie auf molekularer Ebene gewonnen werden.

Zuerst wurde der Einfluss der TAC-OP auf die Expression der Hypertrophiemarker im LV von männlichen 13-17 Wochen alten Mäusen untersucht. Die relative Expression wurde durch Normalisierung auf die scheinoperierte WT-Kontrollgruppe (WT-Sham) ermittelt. Der Erwartung entsprechend, waren die drei Marker in TAC-operierten WT- und HCN4F-Tieren

signifikant erhöht (ANP: WT-Sham: $1 \pm 0,1$; HCN4F-Sham: $1,12 \pm 0,17$; WT-TAC: $3,95 \pm 0,5$; HCN4F-TAC: $7,97 \pm 2,38$), (BNP: WT-Sham: $1,1 \pm 0,1$; HCN4F-Sham: $1,04 \pm 0,3$; WT-TAC: $3,82 \pm 0,3$; HCN4F-TAC: $5,01 \pm 0,58$) und (Acta: WT-Sham: $1,22 \pm 0,3$; HCN4F-Sham: $1,11 \pm 0,1$; WT TAC: $8,6 \pm 1,2$; HCN4F TAC: $14,56 \pm 4$) (Abbildung 14A-C). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den bisherigen phänotypischen und histologischen Daten und unterstreichen die Entwicklung einer Hypertrophie durch die Aortenstenose bei beiden Genotypen, die von einer Aktivierung des typischen hypertrophen Genprogramms begleitet wird.

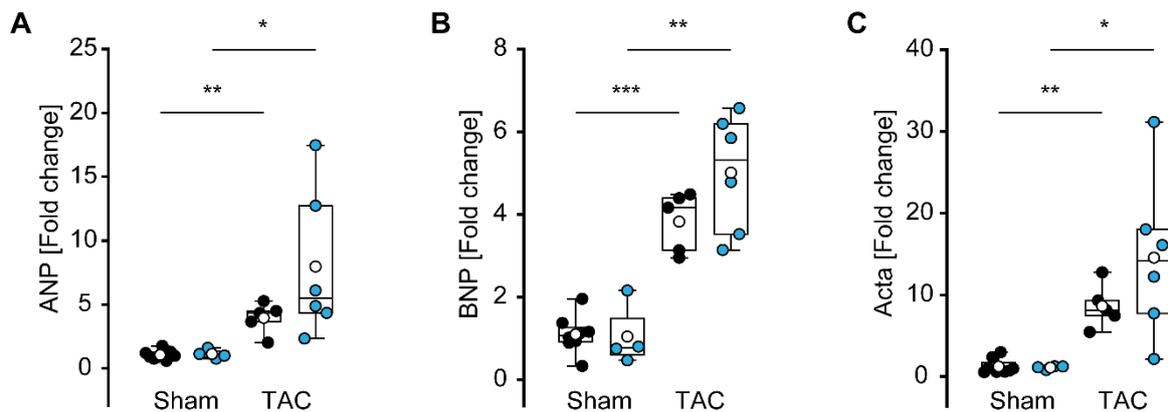


Abbildung 14. mRNA-Expression kardialer Hypertrophie marker in Bezug auf die basale Expression in WT-Tieren. (A-C) Die mRNA-Expression der Hypertrophie marker ANP (A), BNP (B) und Acta1 (C) wurden durch die TAC-OP (TAC) in linken Ventrikeln von WT-Mäusen (schwarz) und HCN4-Mäusen (blau) hochreguliert. Die Expressionsdaten wurden auf die scheinoperierten WT-Daten (WT-Sham) normalisiert. Die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde mittels eines ungepaarten t-Tests durchgeführt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$ (WT-Sham: $n = 8$; HCN4F-Sham: $n = 4$; WT-TAC: $n = 5$; HCN4F-TAC: $n = 6$).

Im nächsten Schritt wurde derselbe Datensatz analysiert, jedoch wurden die Expressionsdaten der einzelnen Hypertrophie marker von HCN4F-Tieren auf die Expressionsdaten der jeweiligen WT-Kontrollgruppe (WT-Sham oder WT-TAC) normalisiert, um Unterschiede zwischen den beiden Genotypen herauszuarbeiten. In der scheinoperierten Versuchsgruppe zeigte die Analyse keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Hypertrophie marker zwischen WT- bzw. HCN4F-Mäusen (Abbildung 15A). Auch in der TAC-operierten Versuchsgruppe gab es keinen signifikanten Unterschied in der Expression von ANP und BNP in HCN4F- und WT-Herzen. Bemerkenswerterweise wiesen die HCN4F-Herzen im Vergleich zu den WT-Herzen eine signifikante Erhöhung von Acta1 auf (WT-TAC: $1,03 \pm 0,1$; HCN4F-TAC: $2,07 \pm 0,3$; Abbildung 15B).

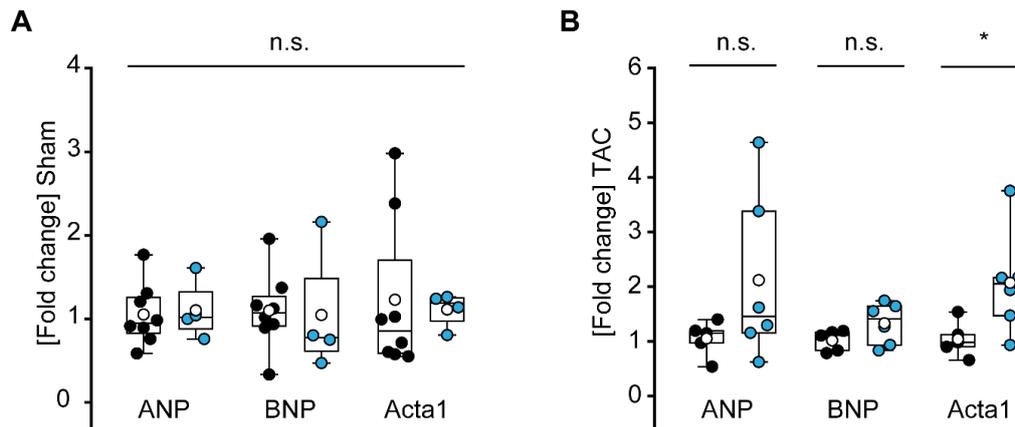


Abbildung 15. Unterschiede in der mRNA-Expression kardialer Hypertrophiemarker in WT und HCN4F-Mäusen. (A, B) mRNA-Expression der Hypertrophiemarker ANP, BNP und Acta1 in linken Ventrikeln isoliert aus scheineroperierten (A) und TAC-operierten (B) WT- (schwarz) und HCN4F- (blau) Tieren. Die Expressionsdaten der HCN4F-Tiere wurden auf die der jeweiligen WT-Kontrollgruppe normalisiert. Acta1 mRNA Level sind in TAC-operierten HCN4F Ventrikeln signifikant erhöht im Vergleich zu WT-TAC. Die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde mittels eines ungepaarten t-Tests durchgeführt * $p < 0,05$. (WT-Sham: $n = 8$; HCN4F-Sham: $n = 4$; WT-TAC: $n = 5$; HCN4F-TAC: $n = 6$).

4.4 Genexpressionsanalyse mittels RNA-Sequenzierung (RNA-Seq)

Um einen tieferen Einblick in die TAC-induzierten transkriptionellen Veränderungen zu erhalten und um Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen zu untersuchen, wurde eine RNA-Seq-Analyse von linksventrikulärem Gewebe durchgeführt.

Differentiell exprimierte Gene in den scheineroperierten Gruppen

In der Transkriptom-Analyse der scheineroperierten Gruppen (WT-Sham vs. HCN4F-Sham) wurden insgesamt 83 signifikant differenziell exprimierte Gene bei HCN4F-Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren nachgewiesen. Davon zeigten 42 Transkripte eine Abnahme und 41 Transkripte eine Zunahme der Genexpression. Die Expressionsanalyse hypertropher Markergene wie Nppa, Nppb oder Acta1 ergab bei der RNA-Seq keine signifikante Differenz zwischen scheineroperierten WT- und HCN4F-Tieren. Bemerkenswerterweise wurde für HCN1 eine signifikant erhöhte Genexpression ($\sim 3,7$ -fach) bei HCN4F-Proben gegenüber den WT-Proben gezeigt (Abbildung 16A). Dies könnte einen Einfluss auf die ventrikuläre Funktion haben.

Durch TAC-OP induzierte differentielle Genexpression

Um Veränderungen des Herzens durch eine TAC-OP auf der Ebene des Transkriptoms zu untersuchen, wurden die Sequenzierungsergebnisse von scheineroperierten Tieren mit den Ergebnissen von den jeweiligen TAC-operierten Tieren verglichen. Die Drucküberlastung durch die TAC-OP führte bei WT-Tieren zu einer signifikant höheren Expression von 105

Genen. Wie erwartet waren darunter Hypertrophie bzw. Fibrose assoziierte Gene, wie *Egr1* (~ 7,1-fach), *Acta1* (~ 6-fach), *Nppa* (~ 3-fach), *Myh7* (~ 2,8-fach), *Col8a1* (~ 2,5-fach), *Ankrd1* (~ 2,5-fach) und *Timp1* (~ 2,2-fach) (Abbildung 16B). Die Hochregulierung dieser Gene legt eine Manifestation des kardialen *Remodelings* nahe. Weitere 66 Gene waren nach der TAC-OP signifikant herunterreguliert im Vergleich zur WT-Sham-Gruppe.

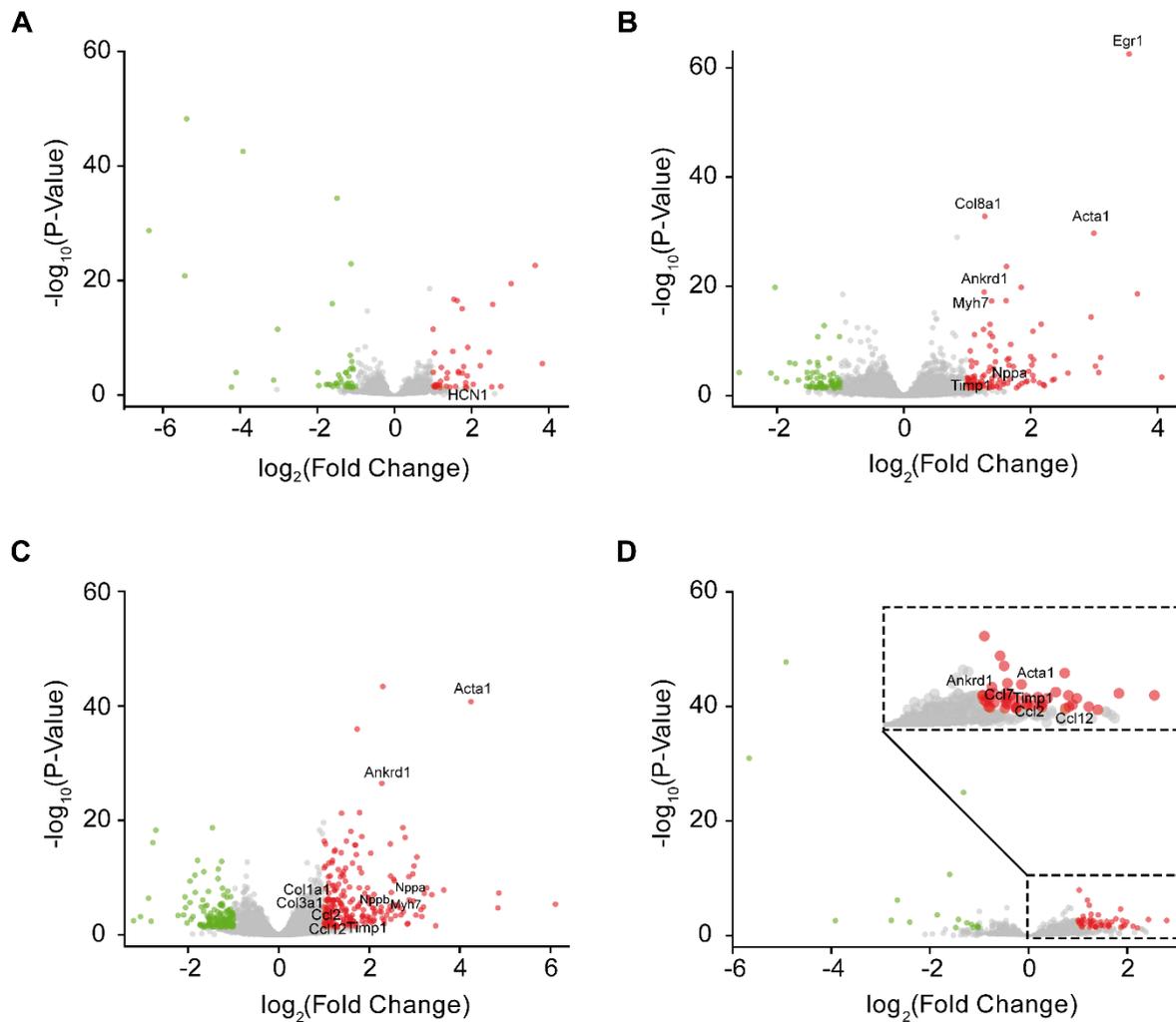


Abbildung 16. Volcano-Plot-Darstellung der differentiellen Expressionsanalysen der vier Versuchsgruppen. Datenpunkte indizieren die Gene mit signifikant verringerter (grün), erhöhter (rot) oder unveränderter (grau) Expression in linksventrikulären Gewebeproben von scheinoperierten HCN4F-Tieren im Vergleich zu scheinoperierten WT-Tieren (A), von TAC-operierten WT-Tieren im Vergleich zu scheinoperierten WT-Tieren (B), von TAC-operierten HCN4F-Tieren im Vergleich zu scheinoperierten HCN4F-Tieren (C) von TAC-operierten HCN4F-Tieren im Vergleich zu TAC-operierten WT-Tieren (D). Die x-Achse zeigt die log2-fache Veränderung (\log_2 fold change) der Expression und die y-Achse die $-\log_{10}$ -Wahrscheinlichkeit, dass ein Gen unterschiedlich exprimiert wird. $p < 0,05$, \log_2 fold change > 1 . (WT-Sham: n = 4; HCN4F-Sham: n = 4; WT-TAC: n = 4; HCN4F-TAC: n = 4).

Des Weiteren wurde die Genexpression von TAC-operierten HCN4F-Tieren mit der ihrer scheinoperierten HCN4F-Tieren verglichen. Für die HCN4F-TAC-Gruppe wurden 353 signifikant differenziell exprimierte Transkripte im Vergleich zur HCN4F-Sham-Gruppe nachgewiesen. Davon waren 216 Transkripte hochreguliert und 137 Transkripte herunterreguliert. Neben der erwarteten signifikanten Hochregulation von Hypertrophie-, sowie Fibrose-assoziierten Genen wie *Acta1* (~ 8,5-fach), *Nppa* (~ 6,4-fach), *Myh7* (~ 4,9-fach), *Ankrd1* (~ 4,5-fach) und *Timp1* (~ 3,2-fach), war in den TAC-operierten Tieren unter anderem auch die Expression von *Nppb* (~ 4,5-fach), *Col1a1* (~ 2,3-fach), *Col3a1* (~ 2-fach) sowie den Chemokinen *Ccl12* (~ 3-fach) und *Ccl2* (~ 2,2-fach) signifikant erhöht (Abbildung 16C). Letztere werden von Makrophagen nach kardialer Schädigung ausgeschüttet und könnten bei der Entwicklung von linksventrikulärer Hypertrophie von Bedeutung sein (Nemska et al. 2016, Patel et al. 2018).

Differenziell exprimierte Gene in den beiden TAC-operierten Gruppen

Um mögliche Unterschiede bei den Hypertrophie-induzierten Veränderungen der Genexpression zwischen den beiden TAC-Gruppen zu identifizieren, wurden die Transkriptom-Daten von HCN4F-TAC mit WT-TAC verglichen. Die Untersuchung der Genexpression von einzelnen Genen der TAC-Gruppe ergab insgesamt 64 signifikant unterschiedlich exprimierte Gene. Die Analyse zeigte, dass es bei HCN4F-TAC Proben mehr hochregulierte Gene (47) als herunterregulierte Gene (17) gab. Von den Genen, die hochreguliert waren und potenziell mit kardialem *Remodeling* zusammenhängen, sind *Timp1* (~ 2,9-fach) und *Ankrd1* (~ 2,2-fach) zu nennen. Eine signifikant erhöhte Genexpression wiesen auch die proinflammatorischen Chemokine *Ccl12* (~ 3,7-fach), *Ccl2* (~ 2,9-fach) und *Ccl7* (~ 2,5-fach) auf (Abbildung 16D). Interessanterweise zeigte die Untersuchung der typischen hypertrophen Marker in Übereinstimmung mit der vorherigen qPRC-Analyse einen signifikanten Anstieg von Skelettmuskel-Alpha-Aktin (*Acta1*, ~ 2,8-fach) bei der HCN4F-TAC-Gruppe, während sich ANP und BNP im Vergleich zur WT-TAC-Gruppe nicht unterschieden. Eine vollständige Auflistung der differenziell regulierten Gene der vier Experimentalgruppen ist in Tabelle 2 gegeben.

4.5 Hämodynamik-Messungen in scheinoperierten und TAC-operierten Mäusen

HCN4F-Mäuse zeigten in telemetrischen EKG-Messungen eine mild ausgeprägte Sinustachykardie im Vergleich zu WT-Kontrolltieren. Solche anhaltenden Tachyarrhythmien können zu einer Tachykardie-induzierten Kardiomyopathie führen.

Durch eine zusätzliche Aortenstenose wird dem Herzen ein erhöhter Auswurfwiderstand entgegengesetzt. Durch die erhöhte Nachlast steigt die Wandspannung des Herzmuskels an. Um dieser erhöhten Wandspannung entgegenzuwirken, reagiert das Herz mit morphologischen und funktionellen Umbauprozessen (*Remodeling*). Zunächst hypertrophieren die Ventrikel konzentrisch (konzentrische Herzhypertrophie) was häufig mit einer vorübergehenden Verbesserung der kardialen Kontraktilität und einer Verkleinerung des linksventrikulären Querschnitts einhergeht. Im Laufe der Zeit wird die Reaktion auf die chronische Druckbelastung jedoch maladaptiv, was zu einer Herzdilatation und Herzinsuffizienz führt.

Um die basale Pumpfunktion des Herzens und aus der Drucküberlastung resultierende Veränderungen der linksventrikulären Pumpfunktion in den TAC-operierten Tieren zu ermitteln, wurden hämodynamische Messungen mittels eines Druck-Volumen-Katheters (Linksherzkatheter) durchgeführt (Abbildung 17A-B). Die Daten, die aus den aufgezeichneten Druck-Volumen-Kurven der vier Versuchsgruppen ermittelt wurden (WT-Sham, WT-TAC, HCN4F-Sham, HCN4F-TAC), wurden dann miteinander verglichen. Die operativen Eingriffe zur Platzierung des Katheters, die Messung der Druck-Volumen-Kurven und die Datenanalyse wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Konstantin Hennis durchgeführt.

Anhand des Druck- und Volumenverlaufs kann jeder Herzzyklus in vier Aktionsphasen unterteilt werden. Die Systole besteht aus der Anspannungs- und Austreibungsphase, die Diastole aus der Entspannungs- und Füllungsphase. Zu Beginn der Systole sind während der Anspannungsphase alle Herzklappen geschlossen und es kommt durch die Ventrikelkontraktion zu einem isovolumetrischen Druckanstieg. Sobald der linksventrikuläre Druck den Aortendruck übersteigt, öffnet sich Aortenklappe. Während der Austreibungsphase wird das Blut in die Aorta ausgeworfen, wodurch das Blutvolumen im linken Ventrikel um den Betrag des Schlagvolumens abnimmt. Am Ende der Systole fällt der Ventrikeldruck wieder unter den Aortendruck und die Aortenklappe schließt sich. Die nun folgende Diastole beginnt mit der Entspannungsphase, während der es zu einem isovolumetrischen Druckabfall kommt bis der Ventrikeldruck den Vorhofdruck unterschreitet und sich die Mitralklappe öffnet. In der Füllungsphase kommt es durch die vorliegende Druckdifferenz zunächst zu einer passiven

Füllung des Ventrikels, die erst am Ende der Diastole durch die Vorhofkontraktion aktiv unterstützt wird. Zuletzt schließt sich die Mitralklappe durch erneute Umkehr der Druckverhältnisse zwischen Vorhof und Kammer und die nächste Systole beginnt. Der Herzzyklus des rechten Herzens verläuft analog, jedoch mit deutlich geringen Druckentwicklungen. In Abbildung 17C (linkes Feld) sind die typischen Druck- und Volumenverläufe des linken Herzens gegen die Zeit aufgetragen und die vier Aktionsphasen farblich gekennzeichnet. Das Öffnen und Schließen der Aorten- bzw. Mitralklappe markiert den jeweiligen Übergang zwischen den Aktionsphasen. Eine intuitivere Betrachtung der Hämodynamik lässt jedoch die Darstellung als Druck-Volumen-Schleife (PV-Loop) zu. Hierbei wird für jeden Zeitpunkt des Herzzyklus der Druck (y-Achse) gegen das entsprechende Volumen (x-Achse) aufgetragen (Abbildung 17C, rechtes Feld). Dabei ergibt sich unter physiologischen Bedingungen eine nahezu rechteckige Druck-Volumen-Schleife, wobei die vier Seiten des Rechtecks die jeweilige Aktionsphase widerspiegeln.

Aus den so aufgezeichneten PV-Loops können nun wesentliche Parameter der Herzarbeit ermittelt und analysiert werden. Die simultane Erfassung von Druck und Volumen ermöglicht beispielsweise die Bestimmung des Schlagvolumens, Herzzeitvolumens und der Ejektionsfraktion sowie die maximale Druckerhöhung- und Druckabfallgeschwindigkeit als Messgrößen der ventrikulären Kontraktilität und Relaxation. Zudem lassen sich durch die Absolutwerte der Volumina, d.h. durch die Position des PV-Loops auf der x-Achse, Aussagen über die Größe und Füllung des linken Ventrikels treffen. Die Fläche innerhalb der Druck-Volumen-Schleife spiegelt die Schlagarbeit wider und wird durch das Schlagvolumen und den in der Systole aufgebauten Ventrikeldruck bestimmt.

Wesentliche Indikatoren für die Pumpfunktion des Herzens sind das Herzzeitvolumen und die Ejektionsfraktion. Das Herzzeitvolumen wird als das Produkt des Schlagvolumens und der Herzfrequenz nach der Formel $HZV [\mu\text{l}/\text{min}] = SV [\mu\text{l}] \times HF [\text{min}^{-1}]$ berechnet, wobei das Schlagvolumen der Differenz zwischen enddiastolischem und endsystolischem Volumen entspricht ($SV [\mu\text{l}] = EDV [\mu\text{l}] - ESV [\mu\text{l}]$). Die Ejektionsfraktion ergibt sich aus dem Verhältnis von Schlagvolumen zu enddiastolischem Volumen nach der Formel $EF [\%] = (SV [\mu\text{l}] / EDV [\mu\text{l}]) \times 100$. Dabei wird die kardiale Pumpfunktion grundsätzlich von der Herzfrequenz, der Nachlast und der Kontraktilität (Inotropie) beeinflusst. Die Inotropie hängt wiederum von der Vorlast (Frank-Starling-Mechanismus), der Herzfrequenz (Bowditch-Effekt) und der Sympathikusaktivität ab.

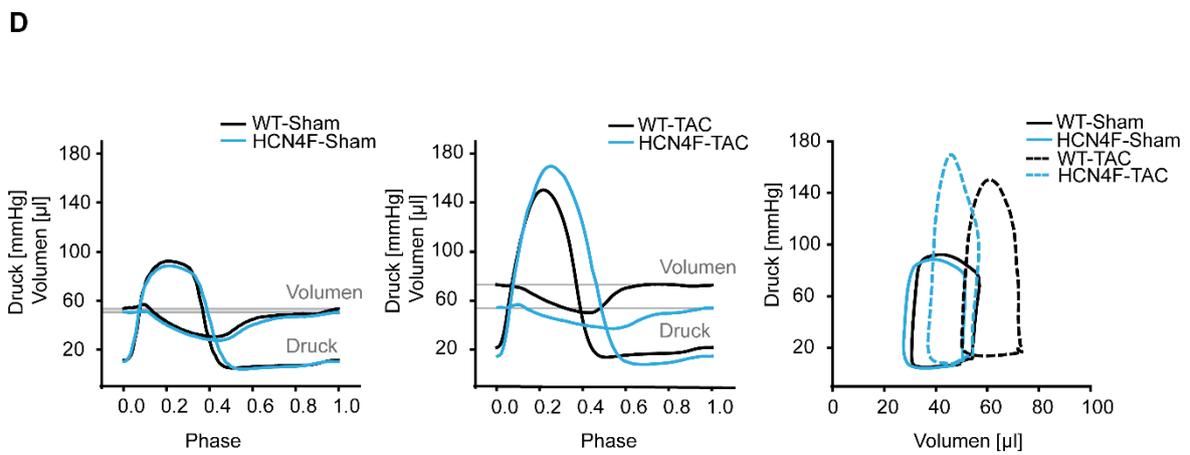
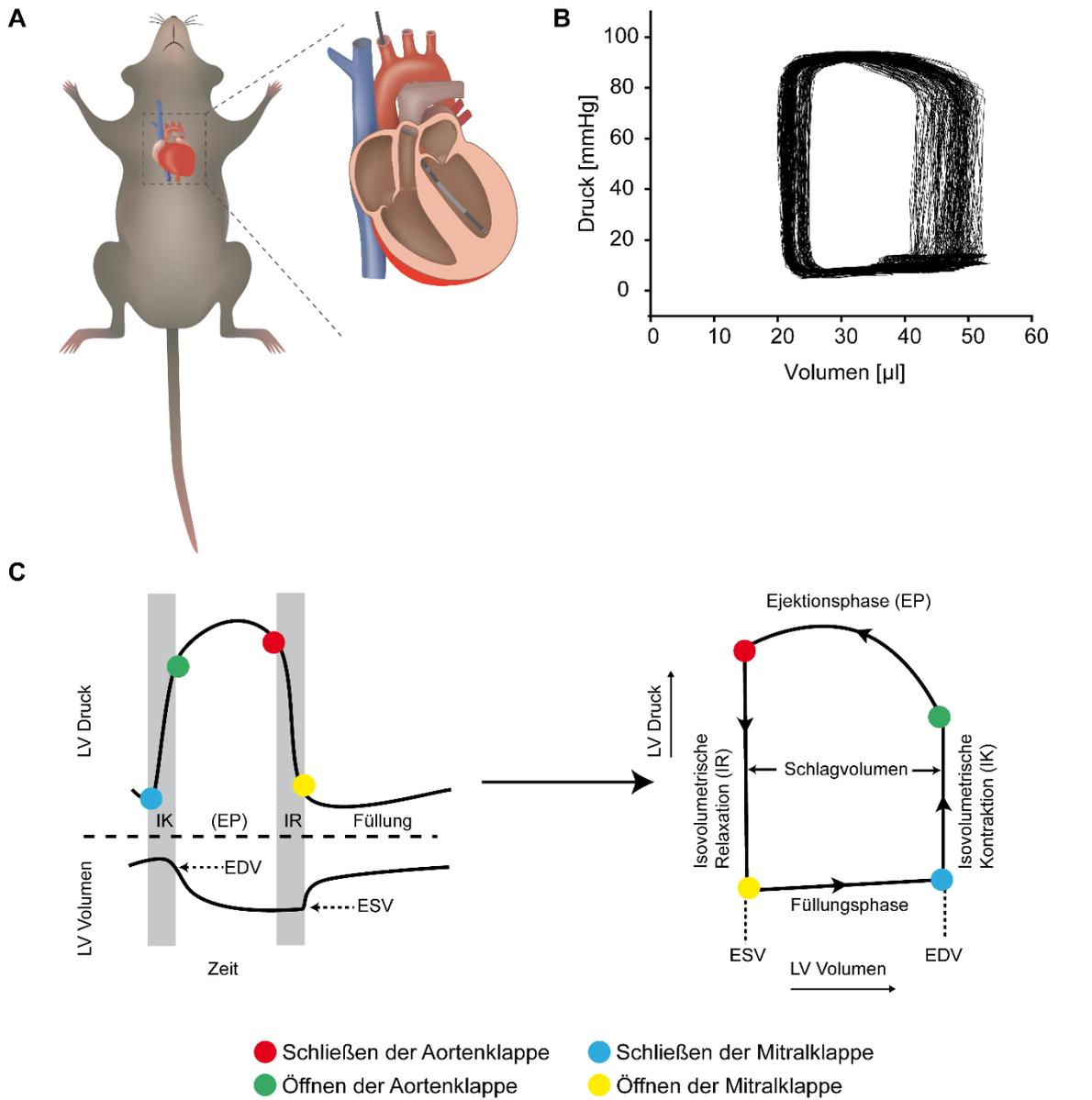


Abbildung 17. Die TAC-OP induziert unterschiedliche Hypertrophie-Formen in HCN4F- und WT-Tieren. (A) Schematische Darstellung eines Linksherzkatheters, der über die rechte *Arteria carotis communis* in den linken Ventrikel eingeführt wird. Abbildung modifiziert nach (Hennis et al. 2022b). (B) Repräsentative linksventrikuläre PV-Loops einer WT-Maus. (C) Schematische Darstellung der Druck- und Volumenmessungen und der daraus abgeleiteten Druck-Volumen-Schleifen (PV-Loops). Abbildung modifiziert nach (Rodriguez 2015). (D) Der linksventrikuläre Druck bzw. das Volumen über den zeitlichen Verlauf einer Herzphase von Sham-operierten Mäusen (links) und TAC-operierten Mäusen (mittig). Gemittelte PV-Loops der vier Experimentalgruppen (rechts) zeigen unterschiedliche Auswirkungen der TAC-OP in HCN4F-Tieren (blau) im Vergleich zu WT-Tieren (schwarz). Die PV-Loops der TAC-operierten WT-Tiere sind im Vergleich zu scheinoperierten WT-Tieren ausgeprägt nach rechts, zu höheren Volumina verschoben. Dies indiziert eine ausgeprägte Dilatation der linken Ventrikel. Zusätzlich sind die PV-Loops zu höheren Druckwerten verschoben, da das Herz den erhöhten Auswurfwiderstand durch die TAC-OP überwinden muss. Die PV-Loops von TAC-operierten HCN4F-Tieren sind nur minimal zu höheren Volumina verschoben jedoch sind die systolischen Drücke, die aufgebaut werden höher im Vergleich zu WT PV-Loops. Dies zeigt, dass die TAC-OP in HCN4F-Tieren eine andere Form des kardialen *Remodelings* induziert, die eher einer konzentrischen Hypertrophie entspricht.

Vergleich der Druck- und Volumen-Parameter von scheinoperierten Tieren

HCN4F-Tiere zeigten bei den Linksherzkatheter-Untersuchungen unter Narkose ebenfalls wie bei den telemetrischen EKG-Messungen eine signifikant erhöhte Herzfrequenz (HF) im Vergleich zu WT-Tieren (Abbildung 18A). Aufgrund des leicht verminderten Schlagvolumens (SV) bei HCN4F-Mäusen, ergab sich durch die erhöhte Herzfrequenz der HCN4F-Tiere nur ein tendenziell erhöhtes Herzzeitvolumen ($HZV = HF * SV$; Abbildung 18B-C). Des Weiteren gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen in allen Druck- oder Volumenparametern, die bestimmt wurden (Pdev: linksventrikulär entwickelter Druck, LVPmax: maximaler linksventrikulärer Druck, LVESP: linksventrikulärer endsystolischer Druck, Pmean: mittlerer Druck, LVPmin: minimaler linksventrikulärer Druck, LVEDP: linksventrikulärer enddiastolischer Druck, ESV: endsystolisches Volumen, EDV: enddiastolisches Volumen, EF: Ejektionsfraktion; dV/dt_{max} : schnellster Volumenanstieg).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Sinustachykardie der HCN4F-Mäuse allein nicht zu einer Tachykardie-induzierten Kardiomyopathie führt.

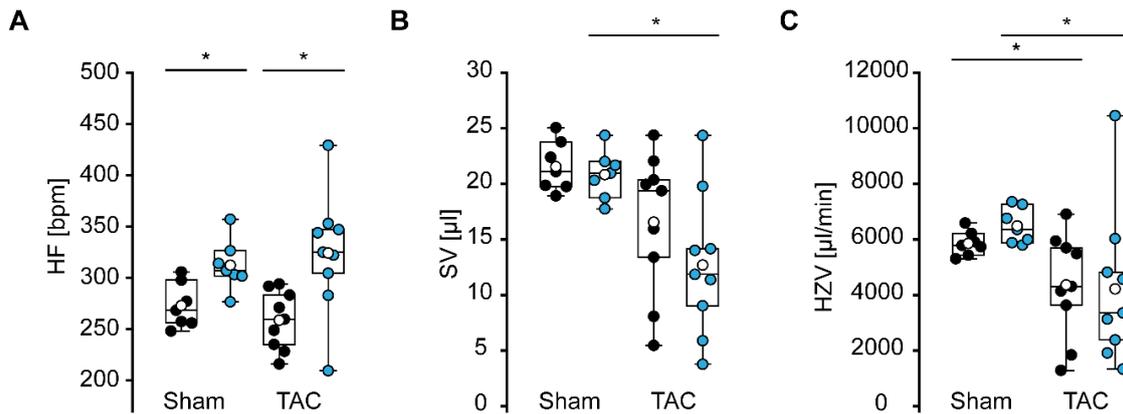


Abbildung 18. Das Schlagvolumen ist in HCN4F-Mäusen nach TAC-OP stärker reduziert. (A) Die Herzfrequenz ist bei scheinoperierten (Sham) und TAC-operierten (TAC) HCN4F-Mäusen (blau) signifikant erhöht im Vergleich zu den jeweiligen WT-Tieren (schwarz). (B) Das Schlagvolumen von TAC-operierten HCN4F-Mäusen ist im Vergleich zu HCN4F-scheinoperierten Tieren erniedrigt. (C) Beim Herzzeitvolumen konnten sowohl bei WT- als auch bei HCN4F-TAC operierten Tieren eine signifikante Reduktion des HZV festgestellt werden. Die Berechnung der statistischen Signifikanz mittels eines ungepaarten t-Tests. * $p < 0.05$ (WT Sham, $n = 7$; WT TAC, $n = 9$; HCN4F Sham, $n = 7$; HCN4F TAC, $n = 9$).

Vergleich der Druck- und Volumen-Parameter nach Aortenstenose durch die TAC-OP

Auch nach der TAC-OP wiesen HCN4F-Tiere eine erhöhte Herzfrequenz im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe auf (Abbildung 18A). Das Schlagvolumen der HCN4F-Tiere war tendenziell erniedrigt, aber das Herzzeitvolumen war in beiden operierten Versuchsgruppen gleich (Abbildung 18B-C).

Erwartungsgemäß zeigten sowohl die Tiere der WT-TAC als auch der HCN4F-TAC-Gruppe einen signifikanten Anstieg linksventrikulärer Druckparameter wie Pdev: linksventrikulär entwickelter Druck, LVPmax: maximaler linksventrikulärer Druck, LVESP: linksventrikulärer endsystolischer Druck, Pmean: mittlerer Druck, mit der Ausnahme von LVPmin: minimaler linksventrikulärer Druck und LVEDP: linksventrikulärer enddiastolischer Druck für die HCN4F-Gruppe, gegenüber ihrer jeweiligen scheinoperierten Kontrollgruppe (Abbildung 19A-F). Die Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}) als ein Maß für die Kontraktilität des Herzens sowie die Relaxationszeitkonstante (τ) der TAC-operierten Tiere waren im Vergleich zu scheinoperierten Tieren nicht signifikant verändert (Abbildung 19G-I).

Auffällig war jedoch, dass die Herzen der HCN4F-Mäuse nach der TAC-OP in der Lage sind, deutlich höhere Drücke im Vergleich zu WT-TAC Tieren während der Systole aufzubauen. So

zeigten die HCN4F-TAC Tiere signifikant höhere Werte von P_{dev} , LVP_{max} , $LVESP$ und P_{mean} im Vergleich zu den WT-TAC Tieren (Abbildung 19A-D). Interessanterweise war die Kontraktilität von TAC-operierten HCN4F-Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zu TAC-operierten WT-Mäusen und tendenziell erhöht im Vergleich zu scheinoperierten HCN4F-Mäusen (Abbildung 19G).

Im Gegensatz dazu waren die Druckparameter in der Diastole (LVP_{min} und $LVEDP$) bei HCN4F-TAC Tieren signifikant niedriger als in WT-TAC Tieren (Abbildung 19E-F). Darüber hinaus zeigte sich tendenziell eine schnellere Relaxationsgeschwindigkeit (dP/dt_{min}) und eine signifikante Reduktion der Relaxationszeit (τ) von Herzen der TAC-operierten HCN4F-Tiere im Vergleich zu WT-Herzen (Abbildung 19H-I).

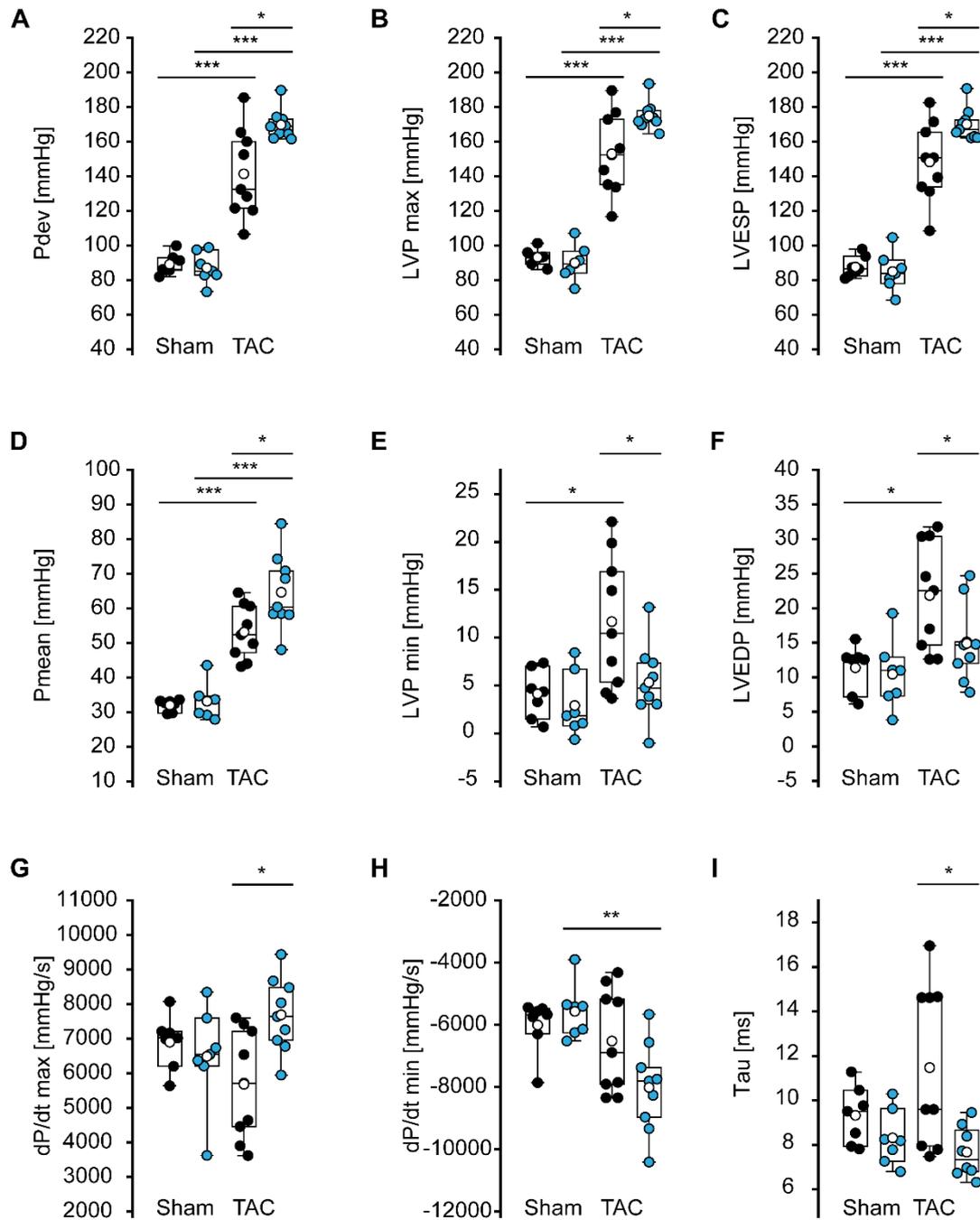


Abbildung 19. HCN4F-Herzen bauen nach der TAC-OP während der Systole höhere und während der Diastole niedrigere Drücke im Vergleich zu WT-Tieren auf. (A) Linksventrikulär entwickelter Druck (Pdev) von scheinoperierten und TAC-operierten WT- (schwarz) und HCN4F- (blau) Tieren. **(B)** Maximal entwickelter Druck (LVP max). **(C)** Linksventrikulär endsystolischer Druck (LVESP). **(D)** mittlerer Druck (Pmean). **(E)** Linksventrikulärer minimaler Druck (LVPmin). **(F)** Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP) **(G)** Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dtmax). **(H)** Minimale Relaxationsgeschwindigkeit (dP/dtmin). **(I)** Die Relaxationszeitkonstante (Tau). Die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde mittels eines ungepaarten t-Tests durchgeführt. *p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,001. (WT Sham n = 7, WT TAC n = 9, HCN4F Sham n = 7, HCN4F TAC n = 9).

Die Analyse der Volumenparameter, die aus den Linksherzkatheter-Messungen bestimmt werden können, ergab, dass sich sowohl das enddiastolische als auch das endsystolische Volumen bei TAC-operierten WT-Mäusen im Vergleich zu scheinoperierten WT-Mäusen vergrößert hatte (Abbildung 20A-B). Im Gegensatz dazu nahmen die linksventrikulären Volumina nach der TAC-OP in HCN4F-Mäusen nur gering zu und das enddiastolische Volumen (EDV) sowie dV/dt_{max} waren im Vergleich zu WT-TAC Mäusen signifikant verringert (Abbildung 20A-C). Dies deutet auf eine dilatative Hypertrophie der WT-TAC-Herzen hin, wohingegen in HCN4F-TAC-Herzen keine Dilatation, sondern eher eine konzentrische Hypertrophie auftritt. Dies korreliert auch mit der Abnahme der Kontraktilität von WT-TAC-Herzen und der Zunahme der Kontraktilität der HCN4F-Herzen im Vergleich zu ihren jeweiligen scheinoperierten Kontrollgruppen.

Die niedrigeren Volumenparameter bei TAC-operierten HCN4F-Tieren im Vergleich zu WT-Tieren sind im Einklang mit den geringeren Querschnittsflächen der linken Ventrikellumina, die in den histologischen Untersuchungen festgestellt wurden.

Die Bestimmung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (EF) wird zur Diagnostik von systolischen Herzfunktionsstörungen verwendet. Die TAC-operierten Mäuse beider Genotypen zeigen im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren eine signifikant reduzierte Ejektionsfraktion. (Abbildung 20D).

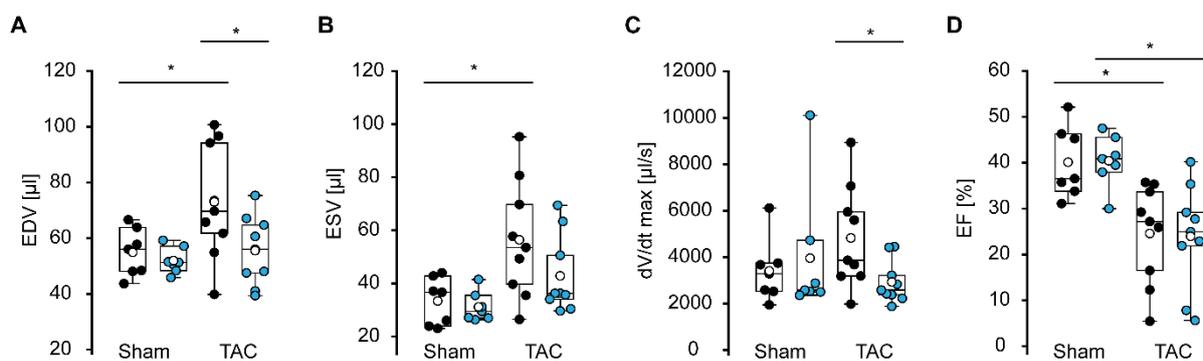


Abbildung 20. HCN4F Herzen zeigen nach der TAC-OP ein geringeres linksventrikuläres Volumen. (A, B) TAC-operierte (TAC) HCN4F-Tiere (blau) zeigen im Vergleich zu TAC-operierten WT-Tieren (schwarz) ein signifikant reduziertes linksventrikuläres enddiastolisches (A, EDV) und ein tendenziell verringertes endsystolisches Volumen (B, ESV). (C) Ebenso zeigt sich eine Reduktion des schnellsten Volumenanstieges (dV/dt_{max}) bei TAC-operierten HCN4F-Tiere im Vergleich zu TAC-operierten WT-Tiere. Das enddiastolische (A) und das endsystolische Volumen (B) waren bei WT-TAC Tieren signifikant erhöht im Vergleich zu scheinoperierten (Sham) WT-Mäusen. (D) Die TAC-OP reduziert in beiden Genotypen die Ejektionsfraktion. Die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde mittels eines ungepaarten t-Tests durchgeführt. * $p < 0,05$. (WT Sham $n = 7$, WT TAC $n = 9$, HCN4F Sham $n = 7$, HCN4F TAC $n = 9$).

5. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mittels einer genetisch veränderten Knock-in Mauslinie der Einfluss der HCN4F *gain-of-function* Mutation auf die Entwicklung einer Tachykardie-induzierten Kardiomyopathie und einer druck-induzierten Herzhypertrophie untersucht. In diesem Zusammenhang wurde erfolgreich eine neue, anspruchsvolle *in vivo* Methode, die transverse Aortenkonstriktion etabliert, um eine druck-induzierte Herzhypertrophie auszulösen.

Der Fokus in dieser Diskussion liegt auf den Unterschieden zwischen WT- und HCN4F-Tieren in den kardialen, hypertrophen *Remodeling*-Prozessen im Besonderen nach der transversen Aortenkonstriktion.

Unterschiede zwischen den beiden Genotypen in scheinoperierten Tieren

HCN4F-Mäuse zeigen in telemetrischen EKG-Messungen eine milde Sinustachykardie mit einer Erhöhung der Herzfrequenz um etwa 10% im Vergleich zu WT-Kontrolltieren. Jedoch wurde anders als erwartet durch die anhaltende Sinustachykardie keine Tachykardie-induzierte Kardiomyopathie ausgelöst. WT- und HCN4F-Herzen unterscheiden sich weder in ihrer Größe noch im Ausmaß der Fibrose in histologischen Untersuchungen, die Expression klassischer Hypertrophiemarker ist in beiden Genotypen gleich und auch die linksventrikuläre Funktion, die durch Hämodynamik-Messungen untersucht wurde, unterscheidet sich nicht. Eine mögliche Ursache dafür, dass in diesem Mausmodell keine TIC ausgelöst wird, könnte die relativ geringe Frequenzsteigerung sein, die wesentlich kleiner ist als die Steigerung durch *Pacing*, die in größeren Tiermodellen (~100 %) angewandt wurde. Ein weiterer Grund könnte sein, dass Mäuse aufgrund ihrer hohen Grundfrequenz viel schwerer eine TIC entwickeln.

Interessanterweise zeigte sich in der Untersuchung der differentiell exprimierten Gene in linksventrikulärem Gewebe von beiden Genotypen, dass der HCN1-Kanal in HCN4F-Ventrikeln signifikant höher exprimiert wird. Dies könnte die Verlängerung der QT-Dauer in telemetrischen EKG-Messungen (Daten nicht gezeigt) von HCN4F-Tieren erklären. HCN-Kanäle leiten in ventrikulären Kardiomyozyten während der späteren Repolarisationsphase einen Kationen-Einwärtsstrom, der die Repolarisation und dadurch die Aktionspotentialdauer verlängert (Fenske et al. 2011). Dies könnte sich im EKG durch eine verlängerte QT-Dauer manifestieren.

Entwicklung einer Herzinsuffizienz nach TAC-OP

Da die anhaltende Sinustachykardie bei HCN4F-Tieren allein nicht ausreicht, um eine Tachykardie-induzierten Kardiomyopathie auszulösen, wurden die Tiere zusätzlich einer TAC-OP unterzogen, um zu untersuchen, ob die Sinustachykardie oder die HCN4F-Mutation per se Einfluss auf die Entwicklung einer druckinduzierten Hypertrophie hat. Wie erwartet führt die TAC-OP in beiden Gruppen zu einer Hypertrophie des Ventrikelmyokards und einer daraus resultierenden Herzinsuffizienz, jedoch sind diese in WT- und HCN4F-Tieren deutlich unterschiedlich ausgeprägt.

Dies zeigt zunächst die histologische Untersuchung des linksventrikulären Gewebes. Die Herzflächen und die Lumina der linken Ventrikel sind in beiden Gruppen nach der TAC-OP erhöht, wobei diese Unterschiede in den Herzen der WT-Tiere deutlich stärker ausgeprägt sind. Ebenso sind die Wanddicken des interventrikulären Septums und des linken Ventrikels sowie die entsprechenden Kardiomyozytenquerschnitte bei beiden Genotypen nach der TAC-OP deutlich erhöht. Die Quantifizierung der interstitiellen sowie perivaskulären Fibrose ergab einen signifikanten Anstieg nach der TAC-OP, wobei jedoch ein vergleichbares Ausmaß und Verteilungsmuster der kollagenhaltigen Einlagerungen in WT- und HCN4F-Herzen zu verzeichnen ist. Die HCN4F-Herzen sind nach der TAC-OP in Hinblick auf Ventrikellumen und Herzfläche signifikant kleiner als die entsprechenden WT-Herzen, obwohl das Herzgewicht in etwa gleich ist (~ 8% leichter bei HCN4F-TAC im Vergleich zu WT-TAC, n.s.). Dies weist darauf hin, dass die WT-Tiere nach der TAC-OP eine Dilatation des linken Ventrikels entwickeln, wohingegen bei HCN4F-Tieren eine konzentrische Hypertrophie auftritt, die mit einem kleineren Ventrikellumen im Vergleich zu den WT-Tieren einhergeht.

Der bei beiden Genotypen vorliegende Befund der Herzinsuffizienz leitet sich aus den hämodynamischen Parametern ab, die bei der Linksherzkatheter-Messung bestimmt wurden. Die Ejektionsfraktion und das Herzzeitvolumen sind nach der TAC-OP in beiden Gruppen gleichermaßen signifikant reduziert. Dies resultiert aus einer Abnahme des Schlagvolumens, die jedoch bei den HCN4F-Tieren tendenziell stärker ausgeprägt ist. Dennoch ergibt sich durch die höhere Herzfrequenz eine ähnlich starke Verringerung des Herzzeitvolumens. Der Betrag der Schlagarbeit, der aus den Flächen innerhalb der Druck-Volumen-Schleifen bestimmt wurde (Daten nicht gezeigt), unterscheidet sich nicht zwischen den beiden Genotypen. Allerdings ist dieser in den beiden Gruppen bedeutend unterschiedlich zusammengesetzt: Im Vergleich zu WT-Tieren bringen die Herzen der HCN4F-Tiere für die gleiche Schlagarbeit einen signifikant

höheren systolischen Druck auf, wobei jedoch ein geringeres Schlagvolumen ausgeworfen wird.

Der histologische Befund einer bei WT-Tieren durch die TAC-OP ausgelösten linksventrikulären Dilatation bestätigt sich anhand der hämodynamischen Parameter vor allem durch eine drastische Erhöhung des enddiastolischen Volumens. Zudem kommt es zu einer Abnahme des Schlagvolumens und zu einer Erhöhung des endsystolischen Drucks. Im ausdrücklichen Gegensatz dazu kann bei HCN4F-Tieren keine Dilatation festgestellt werden, da auch nach der TAC-OP ein normales enddiastolisches Volumen erreicht wird. Darüber hinaus kommt es bei einer ebenfalls vorliegenden Abnahme des Schlagvolumens zu einer markant stärkeren Zunahme des endsystolischen Drucks, was den Befund der konzentrischen Hypertrophie unterstützt.

Zelluläre Mechanismen der unterschiedlichen Hämodynamik

Mögliche zelluläre Mechanismen, die den o.g. Unterschieden zugrunde liegen, lassen sich unter anderem aus weiteren Ergebnissen der Linksherzkatheter-Messungen ableiten. Als maßgebliche Messgröße der Kontraktilität dient die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit ($dP/dt \max$). Im Gegensatz dazu beschreibt die maximale Druckabfallgeschwindigkeit ($dP/dt \min$) die aktive Relaxation des Ventrikelmyokards. Bei den HCN4F-Tieren sind beide Parameter nach der TAC-OP erhöht, was auf eine gesteigerte Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit des Ventrikelmyokards schließen lässt. Darüber hinaus ist durch die Rechtsverschiebung der gemittelten zeitabhängigen Druck- und Volumenkurven eine relative Verlängerung der Systole bei HCN4F-Tieren nach der TAC-OP erkennbar (Abbildung 17D mittig). Allerdings sind sowohl die Volumen- als auch die Druckparameter des Herzens abhängig von der Herzfrequenz und dürfen, da HCN4F-Mäuse eine signifikant erhöhte Herzfrequenz haben, streng genommen zwischen den beiden Genotypen nicht direkt miteinander verglichen werden. Die Unterschiede zwischen den PV-Loops beider Genotypen nach der TAC-OP sind jedoch so stark ausgeprägt, dass diese nicht allein durch Unterschiede in der Herzfrequenz bedingt sein können. Dagegen spricht auch, dass sich die PV-Loops der scheinoperierten Tiere der beiden Genotypen kaum unterscheiden, obwohl die Herzfrequenzunterschiede gleich sind (Abbildung 17D links und rechts). Um dennoch sicher ausschließen zu können, dass die Unterschiede in den PV-Loops durch unterschiedliche Herzfrequenzen während der Messungen bedingt sind, wurden zusätzlich PV-Loops von TAC-

operierten WT- und HCN4F-Tieren mit ähnlicher Herzfrequenz (Abbildung 21A-B; WT: $289,8 \pm 3,3$ bpm, $n = 3$; HCN4F: $293,8 \pm 10,8$ bpm, $n = 2$) miteinander verglichen, wobei die gleichen Unterschiede in den PV-Loops festgestellt werden konnten.

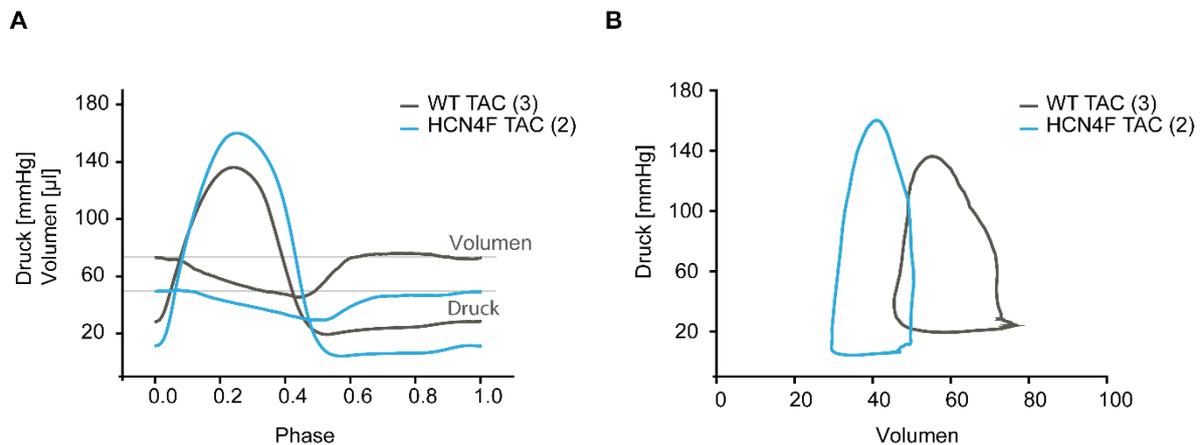


Abbildung 21. Gemittelte PV-Loops der TAC-Tiere mit gleicher Herzfrequenzrate. (A-B) Die PV-Loops der WT-TAC Tiere (schwarz) sind im Vergleich zu HCN4F-TAC Tieren (blau) ausgeprägt nach rechts, zu höheren Volumina verschoben. Der systolische Druck ist höher bei TAC-operierten HCN4F-Tieren im Vergleich zu WT-TAC Tieren.

Die Verlängerung der Systole könnte demnach eine Folge der chronisch erhöhten Herzfrequenz, nicht aber eine Verzerrung durch unterschiedliche Herzfrequenzen während der Messungen darstellen. Darüber hinaus steht sie im Einklang mit einer verlängerten QT-Zeit, die bei HCN4F-Tieren in telemetrischen EKG-Messungen festgestellt wurde (Daten nicht gezeigt). Mögliche Ursachen für eine QT-Zeit-Verlängerung sind eine grundsätzlich verlängerte Aktionspotentialdauer, eine räumliche Schwankung der regionalen Aktionspotentialdauer (Dispersion) oder eine Dispersion der Repolarisation innerhalb des Ventrikelmyokards.

Die bei TAC-operierten HCN4F-Tieren festgestellten Erhöhungen der Kontraktilität und Relaxation in Verbindung mit der verlängerten Systole und der drastisch erhöhten systolischen Druckentwicklung könnten unterschiedliche zelluläre Mechanismen haben. Höhere Herzfrequenzen führen zu einer Erhöhung der Kontraktionskraft (Bowditch-Effekt, Frequenzinotropie) (Janssen 2010, Lakatta 2004, Usman et al. 2022). Hierbei werden verschiedene Mechanismen für die Erhöhung der Kontraktionskraft diskutiert. Zum einen ist bei höheren Frequenzen die relative Zeit in der Systole verlängert, dadurch die Summe der Plateauzeiten der Aktionspotentiale pro Zeiteinheit erhöht und es steht mehr Zeit für den

Calciumeinstrom durch L-Typ Ca-Kanäle zur Verfügung. Zum anderen transportieren auch die Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) in den verlängerten Plateauphasen Ca^{2+} in die Zelle. Beides führt zu einer Akkumulation von Ca^{2+} im Zytosol und zu einer verstärkten Rückspeicherung von Ca^{2+} in das SR, woraus eine Zunahme der Kontraktionskraft resultiert. Dieser Effekt könnte bei den TAC-operierten HCN4F-Tieren durch die von der akuten Frequenz unabhängige Verlängerung der Systole noch verstärkt sein. Schließlich könnten die beobachteten Phänomene zum Teil auch eine physikalische Folge der TAC-induzierten Größenveränderung des Herzens sein. Nach dem Laplace-Gesetz besteht für das Herz ein Zusammenhang zwischen dem Ventrikellumen (Radius r), der Wandspannung (K), der Wanddicke (d) und dem auf sie einwirkenden Druck: $P = (K \cdot 2d)/r$. Dadurch könnte das bei TAC-operierten HCN4F-Tiere im Vergleich zu WT-Tieren kleinere Ventrikellumen bei ähnlicher Wanddicke und Wandspannung für die erhöhte systolische Druckentwicklung mitverantwortlich sein.

Klinische Bedeutung

Die im Besonderen bei chronischer Druckbelastung und Nachlasterhöhung festgestellten Unterschiede zwischen WT- und HCN4F-Tieren in den kardialen, hypertrophen *Remodeling*-Prozessen, haben wichtige Konsequenzen für den klinischen Verlauf der sich entwickelnden Herzinsuffizienz. Als auffälligster Befund ist zu nennen, dass die Herzen der HCN4F-Tiere nach der TAC-OP vor einer Dilatation geschützt sind. Dadurch sind sie besser in der Lage, die erhöhte Druckbelastung längerfristig zu kompensieren und ein noch ausreichendes Herzzeitvolumen bereitzustellen. Eine linksventrikuläre Dilatation ist typischerweise mit einer Progression der Erkrankung hin zu einer Dekompensation verbunden. Dieses schwerste Stadium der Herzinsuffizienz ist durch eine Symptomatik gekennzeichnet, die bereits in körperlicher Ruhe auftritt. Da bei HCN4F-Tieren auch nach der TAC-OP keine Dilatation auftritt, lässt sich vermuten, dass ein milderer Krankheitsverlauf stattfindet, bei dem ein Schutz vor Dekompensation der Herzinsuffizienz vorliegt.

Ausblick

Zum jetzigen Zeitpunkt ist noch unklar, ob die beobachteten Veränderungen eine Folge der bei HCN4F-Tieren auftretenden erhöhten Herzfrequenz sind und damit ihren Ursprung im Reizleitungssystem haben, oder durch die *gain-of-function* Mutation des Kanals in ventrikulären Kardiomyozyten entstehen. Um dies aufzuklären, könnten in zukünftigen Experimenten Aktionspotentialmessungen an isolierten Sinusknotenzellen und ventrikulären

Kardiomyozyten durchgeführt werden. Dies würde helfen, die zellulären Mechanismen aufzudecken und beispielsweise zeigen, ob eine verlängerte Aktionspotentialdauer in Ventrikelzellen für die Verlängerung der Systole von HCN4F-Tieren verantwortlich ist. Zudem könnten Patch-Clamp-Messungen oder Calcium-Imaging-Experimente durchgeführt werden, um herauszufinden, ob die basale intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, der Ca^{2+} -Gehalt des sarkoplasmatischen Retikulums oder die Ca^{2+} transienten in isolierten Kardiomyozyten von HCN4F-Tieren erhöht sind. Dies könnte helfen, die gesteigerte Kontraktilität und verstärkte systolische Druckentwicklung zu erklären.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass die milde Sinustachykardie der genetisch veränderten HCN4F-Knock-in Mauslinie, mit einer Erhöhung der Herzfrequenz um etwa 10%, keine Tachykardie-induzierte Kardiomyopathie (TIC) auslöst.

Eine Tachykardie-induzierte Kardiomyopathie kann als Folge einer anhaltend erhöhten Herzfrequenz auftreten. Das grundlegende Wissen darüber, dass lang andauernde Tachykardien eine fortschreitende, biventrikuläre systolische Dysfunktion verursachen können, die nach einer Normalisierung der Herzfrequenz reversibel ist, wurde durch zahlreiche Studien an experimentellen Tiermodellen, die einer chronischen Herzstimulation (*Pacing*) unterzogen wurden, gut belegt.

Die Entwicklung der TIC und das Fortschreiten der Herzinsuffizienz sind frequenzabhängig. Eine mögliche Ursache dafür, dass im HCN4F-Mausmodell keine TIC ausgelöst wird, könnte die relativ geringe Frequenzsteigerung sein. Diese ist wesentlich kleiner als die Steigerung durch Pacing, die bei größeren experimentellen Tiermodellen wie z.B. Hunden oder Schweinen angewendet wurde. Bei diesen Modellen wurde die Herzfrequenz durch Pacing um mehr als 100% erhöht. Ein weiterer Grund für das Ausbleiben der TIC bei HCN4F-Tieren könnte sein, dass Mäuse aufgrund ihrer hohen Grundfrequenz viel schwerer als größere Tiermodelle eine TIC entwickeln.

Interessanterweise konnte jedoch gezeigt werden, dass WT- und HCN4F-Mäuse unterschiedlich auf eine erhöhte Nachlast und Druckbelastung des linken Ventrikels infolge einer operativer Aortenstenosierung (TAC, *transverse aortic constriction*) reagieren. In beiden Genotypen induziert die TAC-OP eine Hypertrophie des Ventrikelmyokards mit einer dadurch verbundenen Einschränkung der Pumpfunktion des Herzens (Herzinsuffizienz). Die Progredienz der Erkrankung und das kardiale *Remodeling* unterscheiden sich jedoch deutlich. Die histologischen Befunde und die hämodynamischen Parameter weisen darauf hin, dass die WT-Tiere nach der TAC-OP eine Herzhypertrophie mit Dilatation des linken Ventrikels entwickeln, wohingegen bei HCN4F-Tieren eine konzentrische Hypertrophie auftritt, die mit einer kleineren Querschnittsfläche des linken Ventrikellumens, einem verringerten enddiastolischen Volumen und einer stärkeren Zunahme des endsystolischen Drucks im Vergleich zu den WT-Tieren einhergeht. Aus den histologischen Daten und den hämodynamischen Parametern abgeleitete Befunde, legen den Schluss nahe, dass die *Gain-of-function* Mutation des HCN4-Kanals die Knock-in Tiere vor einer Dilatation nach der TAC-

OP schützt. Dadurch sind die Herzen der HCN4F-Tiere in der Lage eine erhöhte Nachlast besser und längerfristig zu kompensieren.

Außerdem tragen diese Ergebnisse wesentlich zum Verständnis der Tachykardie-induzierten Kardiomyopathie des Hundes bei.

7. Summary

In this study, it was shown that mild sinus tachycardia of the genetically modified HCN4F knock-in mouse line, with an increase in heart rate of about 10%, does not result in tachycardia-induced cardiomyopathy (TIC).

Tachycardia-induced cardiomyopathy occurs as a consequence of persistently elevated heart rates. The basic knowledge that prolonged tachycardia can cause progressive biventricular systolic dysfunction, which is reversible after normalisation of the heart rate, has been well established by numerous studies in experimental animal models subjected to chronic cardiac pacing.

The development of TIC and the progression of heart failure are frequency dependent. One possible reason why TIC is not induced in the HCN4F mouse model could be the relatively small increase in frequency. This is much smaller than the increase due to pacing that has been used in larger experimental animal models such as dogs or pigs. In these models, pacing increased heart rate by more than 100%. Another reason for the lack of TIC in HCN4F animals could be that mice develop TIC much harder than larger animal models due to their high baseline heart rate.

WT and HCN4F mice have been shown to respond differently to increased afterload and left ventricular pressure after surgical transverse aortic constriction (TAC). In both genotypes, TAC surgery induces hypertrophy of the ventricular myocardium with a consequent limitation of the pumping function of the heart (heart failure). However, disease progression and cardiac remodelling differ markedly. Histological findings and haemodynamic parameters indicate that WT animals develop cardiac hypertrophy with dilatation of the left ventricle after TAC surgery, whereas HCN4F animals develop concentric hypertrophy associated with a smaller cross-sectional area of the left ventricular lumen, reduced end-diastolic volume and a greater increase in end-systolic pressure compared to WT animals. Findings derived from the histological data and haemodynamic parameters, suggest that the gain-of-function mutation of the HCN4 channel protects the knock-in animals from dilatation after TAC surgery. As a result, the hearts of HCN4F animals are able to compensate for increased afterload better and for longer periods of time.

Furthermore, these results contribute substantially to the understanding of tachycardia-induced cardiomyopathy in the dog.

8. Literaturverzeichnis

Abbott-Johnson, K., K. V. Pierce, S. Roof, C. L. Del Rio and R. Hamlin (2021). "Acute Effects of Pimobendan on Cardiac Function in Dogs With Tachycardia Induced Dilated Cardiomyopathy: A Randomized, Placebo-Controlled, Crossover Study." Front Vet Sci 8: 646437.

Abed, H. S., J. R. Fulcher, M. J. Kilborn and A. C. Keech (2016). "Inappropriate sinus tachycardia: focus on ivabradine." Intern Med J 46(8): 875-883.

Abraham, D. and L. Mao (2015). "Cardiac Pressure-Volume Loop Analysis Using Conductance Catheters in Mice." J Vis Exp(103).

Aggarwal, S. K. and R. MacKinnon (1996). "Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel." Neuron 16(6): 1169-1177.

Baruscotti, M., A. Bucchi, R. Milanese, M. Paina, A. Barbuti, T. Gneccchi-Ruscione, E. Bianco, L. Vitali-Serdoz, R. Cappato and D. DiFrancesco (2017). "A gain-of-function mutation in the cardiac pacemaker HCN4 channel increasing cAMP sensitivity is associated with familial Inappropriate Sinus Tachycardia." Eur Heart J 38(4): 280-288.

Bastos, M. B., D. Burkhoff, J. Maly, J. Daemen, C. A. den Uil, K. Ameloot, M. Lenzen, F. Mahfoud, F. Zijlstra, J. J. Schreuder and N. M. Van Mieghem (2020). "Invasive left ventricle pressure-volume analysis: overview and practical clinical implications." Eur Heart J 41(12): 1286-1297.

Benezet-Mazuecos, J., J. M. Rubio, J. Farre, M. A. Quinones, P. Sanchez-Borque and E. Macia (2013). "Long-term outcomes of ivabradine in inappropriate sinus tachycardia patients: appropriate efficacy or inappropriate patients." Pacing Clin Electrophysiol 36(7): 830-836.

Biel, M., A. Schneider and C. Wahl (2002). "Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation." Trends Cardiovasc Med 12(5): 206-212.

Biel, M., C. Wahl-Schott, S. Michalakis and X. Zong (2009). "Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function." Physiol Rev 89(3): 847-885.

Bogdanov, K. Y., T. M. Vinogradova and E. G. Lakatta (2001). "Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and Na(+)-Ca(2+) exchanger: molecular partners in pacemaker regulation." Circ Res 88(12): 1254-1258.

Borlaug, B. A. and W. J. Paulus (2011). "Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment." Eur Heart J 32(6): 670-679.

Boyett, M. R. (2009). "And the beat goes on. " The cardiac conduction system: the wiring system of the heart." Exp Physiol 94(10): 1035-1049.

Brieler, J., M. A. Breeden and J. Tucker (2017). "Cardiomyopathy: An Overview." Am Fam Physician 96(10): 640-646.

Bucchi, A., M. Baruscotti and D. DiFrancesco (2002). "Current-dependent block of rabbit sinoatrial node I(f) channels by ivabradine." J Gen Physiol 120(1): 1-13.

Burkhoff, D., G. Sayer, D. Doshi and N. Uriel (2015). "Hemodynamics of Mechanical Circulatory Support." J Am Coll Cardiol 66(23): 2663-2674.

Calo, L., M. Rebecchi, A. Sette, A. Martino, E. de Ruvo, L. Sciarra, L. De Luca, L. M. Zuccaro, G. Giunta, A. Ciccaglioni, E. Lioy and F. Fedele (2010). "Efficacy of ivabradine administration in patients affected by inappropriate sinus tachycardia." Heart Rhythm 7(9): 1318-1323.

Cappato, R., S. Castelvichio, C. Ricci, E. Bianco, L. Vitali-Serdoz, T. Gneccchi-Ruscone, M. Pittalis, L. De Ambroggi, M. Baruscotti, M. Gaeta, F. Furlanello, D. Di Francesco and P. P. Lupo (2012). "Clinical efficacy of ivabradine in patients with inappropriate sinus tachycardia: a prospective, randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover evaluation." J Am Coll Cardiol 60(15): 1323-1329.

Casamassimi, A. and A. Ciccodicola (2019). "Transcriptional Regulation: Molecules, Involved Mechanisms, and Misregulation." Int J Mol Sci 20(6).

Casamassimi, A., A. Federico, M. Rienzo, S. Esposito and A. Ciccodicola (2017). "Transcriptome Profiling in Human Diseases: New Advances and Perspectives." Int J Mol Sci 18(8).

Chen, J., J. S. Mitcheson, M. Lin and M. C. Sanguinetti (2000). "Functional roles of charged residues in the putative voltage sensor of the HCN2 pacemaker channel." J Biol Chem 275(46): 36465-36471.

Chiale, P. A., H. A. Garro, J. Schmidberg, R. A. Sanchez, R. S. Acunzo, M. Lago, G. Levy and M. Levin (2006). "Inappropriate sinus tachycardia may be related to an immunologic disorder involving cardiac beta adrenergic receptors." Heart Rhythm 3(10): 1182-1186.

Ciarambino, T., G. Menna, G. Sansone and M. Giordano (2021). "Cardiomyopathies: An Overview." Int J Mol Sci 22(14).

Cingolani, O. H. and D. A. Kass (2011). "Pressure-volume relation analysis of mouse ventricular function." Am J Physiol Heart Circ Physiol 301(6): H2198-2206.

Craven, K. B. and W. N. Zagotta (2004). "Salt bridges and gating in the COOH-terminal region of HCN2 and CNGA1 channels." J Gen Physiol 124(6): 663-677.

DiFrancesco, D. and P. Tortora (1991). "Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP." Nature 351(6322): 145-147.

Dorn, G. W., 2nd, J. Robbins and P. H. Sugden (2003). "Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation." Circ Res 92(11): 1171-1175.

Duhme, N., P. A. Schweizer, D. Thomas, R. Becker, J. Schroter, T. R. Barends, I. Schlichting, A. Draguhn, C. Bruehl, H. A. Katus and M. Koenen (2013). "Altered HCN4 channel C-linker interaction is associated with familial tachycardia-bradycardia syndrome and atrial fibrillation." Eur Heart J 34(35): 2768-2775.

Ellis, E. R. and M. E. Josephson (2013). "What About Tachycardia-induced Cardiomyopathy?" Arrhythm Electrophysiol Rev 2(2): 82-90.

Femenia, F., A. Baranchuk and C. A. Morillo (2012). "Inappropriate sinus tachycardia: current therapeutic options." Cardiol Rev 20(1): 8-14.

Fenske, S., 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 and C. Wahl-Schott (2020). "cAMP-dependent regulation of HCN4 controls the tonic entrainment process in sinoatrial node pacemaker cells." Nat Commun 11(1): 5555.

Fenske, S., 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. Papanizos, M. Biel and C. A. Wahl-Schott (2013). "Sick sinus syndrome in HCN1-deficient mice." Circulation 128(24): 2585-2594.

Fenske, S., R. Mader, A. Scharr, C. Papanizos, X. Cao-Ehlker, S. Michalakis, L. Shaltiel, M. Weidinger, J. Stieber, S. Feil, R. Feil, F. Hofmann, C. Wahl-Schott and M. Biel (2011). "HCN3 contributes to the ventricular action potential waveform in the murine heart." Circ Res 109(9): 1015-1023.

Hagdorn, Q. A. J., G. P. L. Bossers, A. C. Koop, A. Piek, T. R. Eijgenraam, D. E. van der Feen, H. H. W. Sillje, R. A. de Boer and R. M. F. Berger (2019). "A novel method optimizing the normalization of cardiac parameters in small animal models: the importance of dimensional indexing." Am J Physiol Heart Circ Physiol 316(6): H1552-H1557.

Hennis, K., M. Biel, S. Fenske and C. Wahl-Schott (2022a). "Paradigm shift: new concepts for HCN4 function in cardiac pacemaking." Pflugers Arch.

Hennis, K., M. Biel, C. Wahl-Schott and S. Fenske (2021a). "Beyond pacemaking: HCN channels in sinoatrial node function." Prog Biophys Mol Biol 166: 51-60.

Hennis, K., R. D. Rotzer, C. Piantoni, M. Biel, C. Wahl-Schott and S. Fenske (2021b). "Speeding Up the Heart? Traditional and New Perspectives on HCN4 Function." Front Physiol 12: 669029.

Hennis, K., R. D. Rotzer, J. Rilling, Y. Wu, S. B. Thalhammer, M. Biel, C. Wahl-Schott and S. Fenske (2022b). "In vivo and ex vivo electrophysiological study of the mouse heart to characterize the cardiac conduction system, including atrial and ventricular vulnerability." Nat Protoc 17(5): 1189-1222.

Herrmann, S., B. Layh and A. Ludwig (2011). "Novel insights into the distribution of cardiac HCN channels: an expression study in the mouse heart." J Mol Cell Cardiol 51(6): 997-1006.

Huizar, J. F., K. A. Ellenbogen, A. Y. Tan and K. Kaszala (2019). "Arrhythmia-Induced Cardiomyopathy: JACC State-of-the-Art Review." J Am Coll Cardiol 73(18): 2328-2344.

Inamori, T., K. Kodama, Y. Tamura, H. Okamatsu, Y. Sashida, Y. Horibata, E. Taguchi, K. Nakao and T. Sakamoto (2022). "Inappropriate sinus tachycardia-induced cardiomyopathy with severe functional mitral regurgitation and successful treatment with ivabradine." J Cardiol Cases 25(1): 6-9.

Janssen, P. M. (2010). "Myocardial contraction-relaxation coupling." Am J Physiol Heart Circ Physiol 299(6): H1741-1749.

Joung, B., M. Ogawa, S. F. Lin and P. S. Chen (2009). "The calcium and voltage clocks in sinoatrial node automaticity." Korean Circ J 39(6): 217-222.

Keith, A. and M. Flack (1907). "The Form and Nature of the Muscular Connections between the Primary Divisions of the Vertebrate Heart." J Anat Physiol 41(Pt 3): 172-189.

Kukurba, K. R. and S. B. Montgomery (2015). "RNA Sequencing and Analysis." Cold Spring Harb Protoc 2015(11): 951-969.

Laish-Farkash, A., M. Glikson, D. Brass, D. Marek-Yagel, E. Pras, N. Dascal, C. Antzelevitch, E. Nof, H. Reznik, M. Eldar and D. Luria (2010). "A novel mutation in the HCN4 gene causes symptomatic sinus bradycardia in Moroccan Jews." J Cardiovasc Electrophysiol 21(12): 1365-1372.

Lakatta, E. G. (2004). "Beyond Bowditch: the convergence of cardiac chronotropy and inotropy." Cell Calcium 35(6): 629-642.

Lakatta, E. G., V. A. Maltsev and T. M. Vinogradova (2010). "A coupled SYSTEM of intracellular Ca²⁺ clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker." Circ Res 106(4): 659-673.

Lee, C. H. and R. MacKinnon (2017). "Structures of the Human HCN1 Hyperpolarization-Activated Channel." Cell 168(1-2): 111-120 e111.

Lee, C. H. and R. MacKinnon (2019). "Voltage Sensor Movements during Hyperpolarization in the HCN Channel." Cell 179(7): 1582-1589 e1587.

Lee, T. I. and R. A. Young (2013). "Transcriptional regulation and its misregulation in disease." Cell 152(6): 1237-1251.

Li, N., T. A. Csepe, B. J. Hansen, H. Dobrzynski, R. S. Higgins, A. Kilic, P. J. Mohler, P. M. Janssen, M. R. Rosen, B. J. Biesiadecki and V. V. Fedorov (2015). "Molecular Mapping of Sinoatrial Node HCN Channel Expression in the Human Heart." Circ Arrhythm Electrophysiol 8(5): 1219-1227.

Liu, J., H. Dobrzynski, J. Yanni, M. R. Boyett and M. Lei (2007). "Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels." Cardiovasc Res 73(4): 729-738.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method." Methods 25(4): 402-408.

Macri, V., S. N. Mahida, M. L. Zhang, M. F. Sinner, E. V. Dolmatova, N. R. Tucker, M. McLellan, M. A. Shea, D. J. Milan, K. L. Lunetta, E. J. Benjamin and P. T. Ellinor (2014). "A novel trafficking-defective HCN4 mutation is associated with early-onset atrial fibrillation." Heart Rhythm 11(6): 1055-1062.

Mangoni, M. E. and J. Nargeot (2008). "Genesis and regulation of the heart automaticity." Physiol Rev 88(3): 919-982.

Mannikko, R., F. Elinder and H. P. Larsson (2002). "Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages." Nature 419(6909): 837-841.

Marionneau, C., B. Couette, J. Liu, H. Li, M. E. Mangoni, J. Nargeot, M. Lei, D. Escande and S. Demolombe (2005). "Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart." J Physiol 562(Pt 1): 223-234.

Maron, M. S., I. Olivotto, A. G. Zenovich, M. S. Link, N. G. Pandian, J. T. Kuvin, S. Nistri, F. Cecchi, J. E. Udelson and B. J. Maron (2006). "Hypertrophic cardiomyopathy is predominantly a disease of left ventricular outflow tract obstruction." Circulation 114(21): 2232-2239.

Milanesi, R., M. Baruscotti, T. Gnecci-Ruscone and D. DiFrancesco (2006). "Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel." N Engl J Med 354(2): 151-157.

Milano, A., A. M. Vermeer, E. M. Lodder, J. Barc, A. O. Verkerk, A. V. Postma, I. A. van der Bilt, M. J. Baars, P. L. van Haelst, K. Caliskan, Y. M. Hoedemaekers, S. Le Scouarnec, R. Redon, Y. M. Pinto, I. Christiaans, A. A. Wilde and C. R. Bezzina (2014). "HCN4 mutations in multiple families with bradycardia and left ventricular noncompaction cardiomyopathy." J Am Coll Cardiol 64(8): 745-756.

Minciuna, I. A., M. Puiu, G. Cismaru, G. Gusetu, H. Comsa, B. Caloian, D. Zdrenghea, D. Pop and R. Radu (2019). "Tachycardia-induced cardiomyopathy in a patient with left-sided accessory pathway and left bundle branch block: A case report." Medicine (Baltimore) 98(32): e16642.

Mohamed, H. A. (2007). "Tachycardia-induced Cardiomyopathy (Tachycardiomyopathy)." Libyan J Med 2(1): 26-29.

Morillo, C. A., G. J. Klein, R. K. Thakur, H. Li, M. Zardini and R. Yee (1994). "Mechanism of 'inappropriate' sinus tachycardia. Role of sympathovagal balance." Circulation 90(2): 873-877.

Much, B., C. Wahl-Schott, X. Zong, A. Schneider, L. Baumann, S. Moosmang, A. Ludwig and M. Biel (2003). "Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels." J Biol Chem 278(44): 43781-43786.

Nemska, S., L. Monassier, M. Gassmann, N. Frossard and R. Tavakoli (2016). "Kinetic mRNA Profiling in a Rat Model of Left-Ventricular Hypertrophy Reveals Early Expression of Chemokines and Their Receptors." PloS one 11(8): e0161273.

Nof, E., D. Luria, D. Brass, D. Marek, H. Lahat, H. Reznik-Wolf, E. Pras, N. Dascal, M. Eldar and M. Glikson (2007). "Point mutation in the HCN4 cardiac ion channel pore affecting synthesis, trafficking, and functional expression is associated with familial asymptomatic sinus bradycardia." Circulation 116(5): 463-470.

O'Grady, M. R. and M. L. O'Sullivan (2004). "Dilated cardiomyopathy: an update." Vet Clin North Am Small Anim Pract 34(5): 1187-1207.

O'Grady, M. R., M. L. O'Sullivan, S. L. Minors and R. Horne (2009). "Efficacy of benazepril hydrochloride to delay the progression of occult dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers." J Vet Intern Med 23(5): 977-983.

Olshansky, B. and R. M. Sullivan (2013). "Inappropriate sinus tachycardia." J Am Coll Cardiol 61(8): 793-801.

Pacher, P., T. Nagayama, P. Mukhopadhyay, S. Batkai and D. A. Kass (2008). "Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats." Nat Protoc 3(9): 1422-1434.

Park, D. S. and G. I. Fishman (2017). "Development and Function of the Cardiac Conduction System in Health and Disease." J Cardiovasc Dev Dis 4(2).

Patel, B., S. S. Bansal, M. A. Ismahil, T. Hamid, G. Rokosh, M. Mack and S. D. Prabhu (2018). "CCR2(+) Monocyte-Derived Infiltrating Macrophages Are Required for Adverse Cardiac Remodeling During Pressure Overload." JACC Basic Transl Sci 3(2): 230-244.

Patel, H. J., J. J. Pilla, D. J. Polidori, S. V. Pusca, T. A. Plappert, M. S. Sutton, E. B. Lankford and M. A. Acker (2000). "Ten weeks of rapid ventricular pacing creates a long-term model of left ventricular dysfunction." J Thorac Cardiovasc Surg 119(4 Pt 1): 834-841.

Ramentol, R., M. E. Perez and H. P. Larsson (2020). "Gating mechanism of hyperpolarization-activated HCN pacemaker channels." Nat Commun 11(1): 1419.

Reil, J. C. and M. Bohm (2012). "Is heart rate a treatment target in heart failure?" Curr Cardiol Rep 14(3): 308-313.

Richardson, P., W. McKenna, M. Bristow, B. Maisch, B. Mautner, J. O'Connell, E. Olsen, G. Thiene, J. Goodwin, I. Gyarfás, I. Martin and P. Nordet (1996). "Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies." Circulation 93(5): 841-842.

Rockman, H. A., R. S. Ross, A. N. Harris, K. U. Knowlton, M. E. Steinhilper, L. J. Field, J. Ross, Jr. and K. R. Chien (1991). "Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy." Proc Natl Acad Sci U S A 88(18): 8277-8281.

Rodriguez (2015). Left Ventricular Pressure-Volume Analysis: an example of function assessment on a sheep Université Paris Sud.

Sag, S., H. Coskun, I. Baran, S. Gullulu and A. Aydinlar (2016). "Inappropriate sinus tachycardia-induced cardiomyopathy during pregnancy and successful treatment with ivabradine." Anatol J Cardiol 16(3): 212-213.

Santoro, B., S. Chen, A. Luthi, P. Pavlidis, G. P. Shumyatsky, G. R. Tibbs and S. A. Siegelbaum (2000). "Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS." J Neurosci 20(14): 5264-5275.

Sartiani, L., G. Mannaioni, A. Masi, M. Novella Romanelli and E. Cerbai (2017). "The Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels: from Biophysics to Pharmacology of a Unique Family of Ion Channels." Pharmacol Rev 69(4): 354-395.

Scharr, A. (2011). Ein genetischer Ansatz zur Analyse der cAMP-abhängigen Modulation des Schrittmacherkanals HCN4. LMU München.

Schulze-Bahr, E., A. Neu, P. Friederich, U. B. Kaupp, G. Breithardt, O. Pongs and D. Isbrandt (2003). "Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease." J Clin Invest 111(10): 1537-1545.

Sheldon, R. S., B. P. Grubb, 2nd, B. Olshansky, W. K. Shen, H. Calkins, M. Brignole, S. R. Raj, A. D. Krahn, C. A. Morillo, J. M. Stewart, R. Sutton, P. Sandroni, K. J. Friday, D. T. Hachul, M. I. Cohen, D. H. Lau, K. A. Mayuga, J. P. Moak, R. K. Sandhu and K. Kanjwal (2015). "2015 heart rhythm society expert consensus statement on the diagnosis and treatment of postural tachycardia syndrome, inappropriate sinus tachycardia, and vasovagal syncope." Heart Rhythm 12(6): e41-63.

Shinbane, J. S., M. A. Wood, D. N. Jensen, K. A. Ellenbogen, A. P. Fitzpatrick and M. M. Scheinman (1997). "Tachycardia-induced cardiomyopathy: a review of animal models and clinical studies." J Am Coll Cardiol 29(4): 709-715.

Sirenko, S. G., D. Yang, L. A. Maltseva, M. S. Kim, E. G. Lakatta and V. A. Maltsev (2017). "Spontaneous, local diastolic subsarcolemmal calcium releases in single, isolated guinea-pig sinoatrial nodal cells." PLoS One 12(9): e0185222.

Spinale, F. G., D. A. Hendrick, F. A. Crawford, A. C. Smith, Y. Hamada and B. A. Carabello (1990). "Chronic supraventricular tachycardia causes ventricular dysfunction and subendocardial injury in swine." Am J Physiol 259(1 Pt 2): H218-229.

Spinale, F. G., H. H. Holzgrefe, R. Mukherjee, S. R. Arthur, M. J. Child, J. R. Powell and W. H. Koster (1995). "LV and myocyte structure and function after early recovery from tachycardia-induced cardiomyopathy." Am J Physiol 268(2 Pt 2): H836-847.

Stieber, J., S. Herrmann, S. Feil, J. Loster, R. Feil, M. Biel, F. Hofmann and A. Ludwig (2003). "The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart." Proc Natl Acad Sci U S A 100(25): 15235-15240.

Still, A. M., H. V. Huikuri, K. E. Airaksinen, M. J. Koistinen, R. Kettunen, J. Hartikainen, R. D. Mitrani, A. Castellanos, R. J. Myerburg and M. J. Raatikainen (2002). "Impaired negative chronotropic response to adenosine in patients with inappropriate sinus tachycardia." J Cardiovasc Electrophysiol 13(6): 557-562.

Swynghedauw, B. (1999). "Molecular mechanisms of myocardial remodeling." Physiol Rev 79(1): 215-262.

Townsend, D. (2016). "Measuring Pressure Volume Loops in the Mouse." J Vis Exp(111).

Ueda, K., Y. Hirano, Y. Higashiuesato, Y. Aizawa, T. Hayashi, N. Inagaki, T. Tana, Y. Ohya, S. Takishita, H. Muratani, M. Hiraoka and A. Kimura (2009). "Role of HCN4 channel in preventing ventricular arrhythmia." J Hum Genet 54(2): 115-121.

Ueda, K., K. Nakamura, T. Hayashi, N. Inagaki, M. Takahashi, T. Arimura, H. Morita, Y. Higashiuesato, Y. Hirano, M. Yasunami, S. Takishita, A. Yamashina, T. Ohe, M. Sunamori, M. Hiraoka and A. Kimura (2004). "Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia." J Biol Chem 279(26): 27194-27198.

Usman, A., J. Gandhi and G. Gupta (2022). Physiology, Bowditch Effect. StatPearls. Treasure Island (FL).

Vinogradova, T. M., Y. Y. Zhou, V. Maltsev, A. Lyashkov, M. Stern and E. G. Lakatta (2004). "Rhythmic ryanodine receptor Ca²⁺ releases during diastolic depolarization of sinoatrial pacemaker cells do not require membrane depolarization." Circ Res 94(6): 802-809.

Viscomi, C., C. Altomare, A. Bucchi, E. Camatini, M. Baruscotti, A. Moroni and D. DiFrancesco (2001). "C terminus-mediated control of voltage and cAMP gating of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels." J Biol Chem 276(32): 29930-29934.

Wahl-Schott, C. and M. Biel (2009). "HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function." Cell Mol Life Sci 66(3): 470-494.

Wahl-Schott, C., S. Fenske and M. Biel (2014). "HCN channels: new roles in sinoatrial node function." Curr Opin Pharmacol 15: 83-90.

Wainger, B. J., M. DeGennaro, B. Santoro, S. A. Siegelbaum and G. R. Tibbs (2001). "Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels." Nature 411(6839): 805-810.

Wang, Z. J., I. Blanco, S. Hayoz and T. I. Brelidze (2020). "The HCN domain is required for HCN channel cell-surface expression and couples voltage- and cAMP-dependent gating mechanisms." J Biol Chem 295(24): 8164-8173.

Winum, P. F., G. Cayla, M. Rubini, L. Beck and P. Messner-Pellenc (2009). "A case of cardiomyopathy induced by inappropriate sinus tachycardia and cured by ivabradine." Pacing Clin Electrophysiol 32(7): 942-944.

Yokoyama, R., K. Kinoshita, Y. Hata, M. Abe, K. Matsuoka, K. Hirono, M. Kano, M. Nakazawa, F. Ichida, N. Nishida and T. Tabata (2018). "A mutant HCN4 channel in a family with bradycardia, left bundle branch block, and left ventricular noncompaction." Heart Vessels 33(7): 802-819.

Zagotta, W. N., N. B. Olivier, K. D. Black, E. C. Young, R. Olson and E. Gouaux (2003). "Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels." Nature 425(6954): 200-205.

Zhao, M. T., S. Ye, J. Su and V. Garg (2020). "Cardiomyocyte Proliferation and Maturation: Two Sides of the Same Coin for Heart Regeneration." Front Cell Dev Biol 8: 594226.

Zhou, J., W. G. Ding, T. Makiyama, A. Miyamoto, Y. Matsumoto, H. Kimura, Y. Tarutani, J. Zhao, J. Wu, W. J. Zang, H. Matsuura and M. Horie (2014). "A novel HCN4 mutation, G1097W, is associated with atrioventricular block." Circ J 78(4): 938-942.

Zong, X., S. Krause, C. C. Chen, J. Kruger, C. Gruner, X. Cao-Ehlker, S. Fenske, C. Wahl-Schott and M. Biel (2012). "Regulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel activity by cCMP." J Biol Chem 287(32): 26506-26512.

9. Anhang

Tabelle 1. Zusammenfassung relevanter hämodynamischen Parameter

Hämodynamische Parameter	WT (n=7)	HCN4F (n=7)	WT (n=9)	HCN4F (n=9)
	Sham	Sham	TAC	TAC
HF [bmp]	273 ± 8,2	312 ± 9,4 *	258 ± 9,5	324 ± 19,7 *
HZV [ml/min]	9193 ± 917	10009 ± 940	9355 ± 914	8839 ± 816
SV [µl]	33,4 ± 2,8	32,1 ± 3,0	36,4 ± 3,6	27 ± 1,3 *
EDV [µl]	54,9 ± 3,2	51,9 ± 1,7	72,9 ± 6,8	55,5 ± 4,1
ESV [µl]	33,3 ± 3,3	31,1 ± 2	56,4 ± 7,4	42,8 ± 4,9 *
Pmean [mmHg]	31,9 ± 0,6	33,1 ± 1,9	53,1 ± 2,6	64,6 ± 3,6 *
Pdev [mmHg]	89,04 ± 2,2	87,06 ± 3,3	141,3 ± 8,5	169,7 ± 2,9 *
LVPmax. [mmHg]	93,1 ± 1,8	89,9 ± 3,8	153 ± 7,8	175 ± 2,7 *
LVPmin. [mmHg]	4,1 ± 0,9	2,9 ± 1,2	11,6 ± 2,3	5,3 ± 1,3 *
EF [%]	58,6 ± 1,5	61 ± 3,9	50,5 ± 1,8	49,1 ± 2,1
dP/dTmax [mmHg/s]	6895 ± 294,7	6485 ± 556,9	5676 ± 524	7686 ± 360,1*
dV/dtmin [µl/s]	-3597 ± 438,1	-3861 ± 645,2	-4451 ± 746,2	-2969 ± 280,5
LVESP [mmHg]	87,5 ± 2,3	84,9 ± 4,2	148,2 ± 7,6	170 ± 3 *
dP/dTmin [mmHg/s]	-6010 ± 326,4	-5572 ± 329,8	-6524 ± 557,8	-8016 ± 480,1*
LVEDP [mmHg]	11,3 ± 1,2	10,4 ± 1,8	21,8 ± 2,6	14,8 ± 1,8 *
dV/dtmax [µl/s]	3410 ± 514,6	3955 ± 1071	4825 ± 740,8	2933 ± 310 *
Tau [ms]	9,3 ± 0,4	8,3 ± 0,4	11,4 ± 1,2	8,2 ± 0,6 *

Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM dar. Vergleich zwischen den beiden Genotypen (scheinoperierten und TAC-operierten). T-Test *p < 0,05.

Tabelle 2. RNA-Sequenzierung Analysen**Differenziell exprimierte Gene im linken Ventrikel WT-Sham vs. HCN4F-Sham**

Die Expressionsanalyse zeigte im linken Ventrikel 83 signifikant differenziell exprimierte Gene (adjustierter p-Wert < 0,05; log2FoldChange > 1).

Gen Symbol	Gen ID	log2FoldChange	p-value	Padj
Slc15a2	ENSMUSG00000022899	3,83176	7,05E-09	3,26E-06
Egr1	ENSMUSG00000038418	3,64816	1,00E-26	2,40E-23
Egr2	ENSMUSG00000037868	3,02307	2,01E-23	3,60E-20
Gm26870	ENSMUSG00000097312	2,75911	7,47E-04	0,03169
Igha	ENSMUSG00000095079	2,54849	1,34E-19	1,48E-16
Gm10800	ENSMUSG00000075014	2,5218	9,28E-04	0,03673
Egr3	ENSMUSG00000033730	2,45911	4,87E-11	3,17E-08
Ptger4	ENSMUSG00000039942	2,22599	1,80E-08	7,57E-06
AI593442	ENSMUSG00000078307	2,03939	2,09E-04	0,01355
Fos	ENSMUSG00000021250	1,90006	6,33E-12	4,78E-09
Jchain	ENSMUSG00000067149	1,8909	2,79E-06	4,75E-04
Lyz1	ENSMUSG00000069515	1,87149	0,00108	0,04102
Igkc	ENSMUSG00000076609	1,84926	8,32E-05	0,00741
Hcn1	ENSMUSG00000021730	1,8414	0,00102	0,03912
Dock2	ENSMUSG00000020143	1,79337	2,86E-08	1,08E-05
Apold1	ENSMUSG00000090698	1,76125	7,23E-07	1,50E-04
Rnf157	ENSMUSG00000052949	1,75645	8,05E-19	8,24E-16
Rmrp	ENSMUSG00000088088	1,66677	6,41E-07	1,39E-04
Arc	ENSMUSG00000022602	1,65416	2,87E-07	7,91E-05
Junb	ENSMUSG00000052837	1,62628	2,53E-20	3,30E-17
Atp1a3	ENSMUSG00000040907	1,58383	7,33E-04	0,03128
Ier2	ENSMUSG00000053560	1,54225	1,38E-20	1,98E-17
Myc	ENSMUSG00000022346	1,51351	3,41E-11	2,33E-08
Ckap2	ENSMUSG00000037725	1,43815	0,00115	0,04288
Rpph1	ENSMUSG00000092837	1,37566	5,64E-07	1,26E-04
Clec7a	ENSMUSG00000079293	1,35412	8,75E-06	0,00121
Hoxa5	ENSMUSG00000038253	1,34021	6,43E-04	0,02971
Chac1	ENSMUSG00000027313	1,21639	4,69E-08	1,53E-05
Samd5	ENSMUSG00000060487	1,19604	3,88E-05	0,00403
Knstrn	ENSMUSG00000027331	1,18342	3,62E-04	0,01989
Ccl7	ENSMUSG00000035373	1,1829	0,00142	0,0492
Zfp69	ENSMUSG00000064141	1,11252	4,28E-04	0,02236
Cldn5	ENSMUSG00000041378	1,10341	2,64E-04	0,01599
Cdk1	ENSMUSG00000019942	1,0693	8,41E-04	0,03452
Serpina3n	ENSMUSG00000021091	1,06159	7,97E-04	0,03328
Sfn	ENSMUSG00000047281	1,04401	2,70E-04	0,01619
Rrm2	ENSMUSG00000020649	1,04089	0,00101	0,03895
Frem2	ENSMUSG00000037016	1,03862	6,29E-11	3,92E-08
Epop	ENSMUSG00000043439	1,01255	5,50E-04	0,02662

Anhang

Gadd45b	ENSMUSG00000015312	1,0078	4,00E-07	1,02E-04
Tcf15	ENSMUSG00000068079	1,00349	3,49E-15	3,12E-12
Dnaja1	ENSMUSG00000028410	-1,00098	5,59E-04	0,02687
Banp	ENSMUSG00000025316	-1,06359	1,20E-07	3,45E-05
Dnm3os	ENSMUSG00000078190	-1,07478	0,00124	0,04472
Atcay	ENSMUSG00000034958	-1,08479	9,84E-04	0,03833
Ip6k3	ENSMUSG00000024210	-1,08827	5,14E-08	1,64E-05
Dnajb1	ENSMUSG00000005483	-1,10265	2,67E-09	1,42E-06
Nnmt	ENSMUSG00000032271	-1,10983	1,11E-04	0,00869
Rsrp1	ENSMUSG00000037266	-1,1234	4,15E-27	1,19E-23
Gm31520	ENSMUSG00000107653	-1,13706	0,0013	0,04622
Cdh20	ENSMUSG00000050840	-1,13841	7,43E-04	0,0316
Trmp1	ENSMUSG00000056596	-1,14312	1,99E-10	1,19E-07
Fam84b	ENSMUSG00000072568	-1,1449	8,95E-08	2,73E-05
Tnfrsf25	ENSMUSG00000024793	-1,18349	3,29E-06	5,48E-04
Ppp1r3c	ENSMUSG00000067279	-1,18423	6,51E-04	0,02992
Dbh	ENSMUSG00000000889	-1,20024	1,03E-04	0,00834
Irs3	ENSMUSG00000047182	-1,23278	1,86E-04	0,01249
Gm16023	ENSMUSG00000086682	-1,236	9,02E-04	0,03603
Fam222a	ENSMUSG00000041930	-1,25639	4,42E-07	1,09E-04
Plekhh1	ENSMUSG00000060716	-1,25884	5,63E-07	1,26E-04
9430085M18Rik	ENSMUSG00000106164	-1,27489	5,43E-04	0,02637
Tagap	ENSMUSG00000033450	-1,37533	6,71E-05	0,00613
Gm43980	ENSMUSG00000107962	-1,39463	1,06E-05	0,00141
BC018473	ENSMUSG00000056032	-1,44448	1,66E-06	3,04E-04
Gm30238	ENSMUSG00000103898	-1,46648	5,75E-04	0,02736
Pts	ENSMUSG00000032067	-1,48659	8,99E-39	4,30E-35
Rp1	ENSMUSG00000025900	-1,49819	1,09E-04	0,00857
Sypl2	ENSMUSG00000027887	-1,52636	1,35E-04	0,01011
2610306O10Rik	ENSMUSG00000108614	-1,59717	7,87E-04	0,03298
Dixdc1	ENSMUSG00000032064	-1,61205	9,61E-20	1,15E-16
Ccdc63	ENSMUSG00000043036	-1,65832	2,80E-04	0,01654
Lpar3	ENSMUSG00000036832	-1,72077	1,96E-04	0,01294
1700119I11Rik	ENSMUSG00000082488	-1,76529	2,38E-04	0,01489
Noxred1	ENSMUSG00000072919	-1,95894	4,44E-04	0,02275
Nxpe2	ENSMUSG00000032028	-1,98387	5,10E-07	1,18E-04
Nrg4	ENSMUSG00000032311	-3,02495	3,90E-15	3,29E-12
Hspa1a	ENSMUSG00000091971	-3,12862	2,16E-05	0,00249
Gm12416	ENSMUSG00000083044	-3,92415	3,83E-47	2,74E-43
Hspa1b	ENSMUSG00000090877	-4,09926	4,80E-07	1,15E-04
Gm43305	ENSMUSG00000105703	-4,22103	0,00104	0,03983
Nxpe4	ENSMUSG00000044229	-5,38439	4,09E-53	5,85E-49
Gm10290	ENSMUSG00000105775	-5,43154	7,64E-25	1,56E-21
Plet1os	ENSMUSG00000101304	-6,35954	5,50E-33	1,97E-29

Differenziell exprimierte Gene im linken Ventrikel WT-Sham vs. WT-TAC

Die Expressionsanalyse zeigte im linken Ventrikel 171 signifikant differenziell exprimierte Gene.

Gen Symbol	Gen ID	log2FoldChange	p-value	Padj
Igfbp2	ENSMUSG00000039323	4,06915	7,70E-06	4,29E-04
Egr2	ENSMUSG00000037868	3,68606	1,48E-22	2,37E-19
Egr1	ENSMUSG00000038418	3,55498	2,11E-67	3,04E-63
Igha	ENSMUSG00000095079	3,10603	3,96E-10	1,02E-07
Slc15a2	ENSMUSG00000022899	3,07477	6,97E-07	6,08E-05
S100a9	ENSMUSG00000056071	3,02645	2,93E-08	4,02E-06
Acta1	ENSMUSG00000031972	2,99804	4,03E-34	1,94E-30
Egr3	ENSMUSG00000033730	2,95399	4,37E-18	4,20E-15
Hcn1	ENSMUSG00000021730	2,5906	9,19E-07	7,53E-05
Igkc	ENSMUSG00000076609	2,37819	1,87E-10	5,29E-08
Jchain	ENSMUSG00000067149	2,37552	2,35E-05	0,00101
Pdzd3	ENSMUSG00000032105	2,34623	4,21E-05	0,00155
Ppp1r3g	ENSMUSG00000050423	2,22024	9,51E-04	0,01595
Fhad1	ENSMUSG00000051435	2,20379	4,99E-04	0,00993
Edn3	ENSMUSG00000027524	2,16761	1,13E-16	8,58E-14
St8sial	ENSMUSG00000030283	2,14338	1,92E-04	0,00491
Sell	ENSMUSG00000026581	2,04933	4,97E-05	0,00177
Fos	ENSMUSG00000021250	2,04643	1,25E-09	2,87E-07
Gas2l3	ENSMUSG00000074802	2,03812	3,00E-15	1,66E-12
Lman1l	ENSMUSG00000056271	2,03654	2,94E-06	2,05E-04
Myc	ENSMUSG00000022346	2,02167	1,72E-08	2,58E-06
Ltbp2	ENSMUSG00000002020	2,00367	2,49E-10	6,89E-08
Tbx15	ENSMUSG00000027868	1,97299	4,12E-07	3,89E-05
Kcnq5	ENSMUSG00000028033	1,9481	7,84E-05	0,00253
Gm30873	ENSMUSG00000109341	1,92321	1,03E-04	0,00313
Crlf1	ENSMUSG00000007888	1,89081	8,39E-07	7,16E-05
Ngef	ENSMUSG00000026259	1,86334	2,46E-04	0,00596
Junb	ENSMUSG00000052837	1,85335	6,22E-24	1,49E-20
Dbp	ENSMUSG00000059824	1,81612	9,25E-04	0,01571
Atp6v0a4	ENSMUSG00000038600	1,77848	0,00343	0,0391
Arc	ENSMUSG00000022602	1,7294	3,75E-08	4,84E-06
Aqp8	ENSMUSG00000030762	1,68775	1,18E-12	4,38E-10
Met	ENSMUSG00000009376	1,67682	2,04E-05	9,10E-04
Nlrc3	ENSMUSG00000049871	1,66001	1,96E-08	2,83E-06
Thbs1	ENSMUSG00000040152	1,65969	6,35E-10	1,57E-07
Serpine1	ENSMUSG00000037411	1,63973	2,11E-04	0,00529
Gm13943	ENSMUSG00000085277	1,63285	1,20E-09	2,83E-07
Cyr61	ENSMUSG00000028195	1,62067	8,24E-28	2,38E-24
Mybpc2	ENSMUSG00000038670	1,61513	3,17E-21	4,16E-18
Atp1a3	ENSMUSG00000040907	1,5745	4,18E-04	0,00868

Lrp8	ENSMUSG00000028613	1,5729	1,32E-04	0,00369
Kcnc1	ENSMUSG00000058975	1,51614	2,28E-05	9,90E-04
Hmmr	ENSMUSG00000020330	1,51224	0,00363	0,04062
Nppa	ENSMUSG00000041616	1,48823	2,33E-04	0,00567
Spsb4	ENSMUSG00000046997	1,46958	0,00145	0,02162
Klhl34	ENSMUSG00000047485	1,44887	2,02E-11	6,62E-09
Ptger4	ENSMUSG00000039942	1,44479	3,56E-09	7,03E-07
Sh3gl2	ENSMUSG00000028488	1,43656	3,46E-06	2,30E-04
Myot	ENSMUSG00000024471	1,42033	9,76E-08	1,11E-05
Kntc1	ENSMUSG00000029414	1,41592	0,00153	0,0223
Synpo21	ENSMUSG00000039376	1,40266	4,17E-14	1,77E-11
Pamr1	ENSMUSG00000027188	1,39328	1,58E-05	7,41E-04
Mgat5b	ENSMUSG00000043857	1,38906	0,00208	0,02771
Ksr2	ENSMUSG00000025658	1,38756	1,20E-04	0,00345
Myh7	ENSMUSG00000053093	1,38585	4,09E-21	4,92E-18
Ier2	ENSMUSG00000053560	1,36189	8,64E-15	4,30E-12
Tnfrsf12a	ENSMUSG00000023905	1,36016	1,20E-16	8,65E-14
Cilp	ENSMUSG00000042254	1,35986	5,13E-08	6,37E-06
Rnf165	ENSMUSG00000025427	1,3596	2,69E-04	0,00638
Hbegf	ENSMUSG00000024486	1,35911	2,23E-12	8,06E-10
Col8a2	ENSMUSG00000056174	1,35219	0,00274	0,03342
Apold1	ENSMUSG00000090698	1,34284	3,72E-07	3,57E-05
Lingo1	ENSMUSG00000049556	1,3316	0,00322	0,03741
Col8a1	ENSMUSG00000068196	1,27828	2,13E-37	1,54E-33
Ankrd1	ENSMUSG00000024803	1,26955	6,21E-23	1,12E-19
Frem2	ENSMUSG00000037016	1,2689	2,59E-06	1,85E-04
Gadd45g	ENSMUSG00000021453	1,25856	1,34E-15	7,70E-13
Lefty1	ENSMUSG00000038793	1,25663	0,00116	0,01845
Pou3f1	ENSMUSG00000090125	1,25248	5,80E-04	0,01117
Gdf15	ENSMUSG00000038508	1,24199	6,71E-06	3,86E-04
Fgf6	ENSMUSG00000000183	1,23342	3,67E-04	0,00788
Scd4	ENSMUSG00000050195	1,23256	8,15E-05	0,0026
Cxcl1	ENSMUSG00000029380	1,21078	0,00215	0,02817
Iqgap3	ENSMUSG00000028068	1,19084	3,56E-04	0,00774
Clec7a	ENSMUSG00000079293	1,18363	0,00167	0,02374
Dkk3	ENSMUSG00000030772	1,17697	1,18E-04	0,00338
Tox3	ENSMUSG00000043668	1,15747	8,76E-04	0,01507
Xirp1	ENSMUSG00000079243	1,14327	5,73E-09	1,06E-06
Dock2	ENSMUSG00000020143	1,13566	0,00316	0,03686
Bhlhe41	ENSMUSG00000030256	1,11761	4,49E-06	2,84E-04
Dok7	ENSMUSG00000044716	1,11573	1,46E-14	7,02E-12
Gadd45b	ENSMUSG00000015312	1,11081	1,87E-05	8,43E-04
Timp1	ENSMUSG00000001131	1,10736	2,98E-04	0,00685
Gm10129	ENSMUSG00000103789	1,10713	5,89E-05	0,002

Cdk1	ENSMUSG00000019942	1,10274	0,00226	0,02927
Wisp2	ENSMUSG00000027656	1,09944	7,42E-04	0,01331
Fstl4	ENSMUSG00000036264	1,0919	3,85E-04	0,00815
Chac1	ENSMUSG00000027313	1,08775	6,79E-06	3,89E-04
Cdc6	ENSMUSG00000017499	1,08732	0,00327	0,03773
Cpxm2	ENSMUSG00000030862	1,07213	3,76E-08	4,84E-06
Cnksr1	ENSMUSG00000028841	1,06684	2,21E-09	4,68E-07
Nox4	ENSMUSG00000030562	1,06	0,0028	0,03378
Bambi	ENSMUSG00000024232	1,04863	2,17E-11	6,95E-09
Col12a1	ENSMUSG00000032332	1,04753	0,0015	0,02209
Ctgf	ENSMUSG00000019997	1,04254	0,00212	0,02799
Abra	ENSMUSG00000042895	1,03821	2,82E-05	0,00116
Det	ENSMUSG00000022129	1,02606	2,19E-05	9,59E-04
Shisa3	ENSMUSG00000050010	1,02063	3,00E-05	0,00122
Runx2	ENSMUSG00000039153	1,02034	0,00426	0,04518
Casq1	ENSMUSG00000007122	1,01995	1,00E-04	0,00306
Scml4	ENSMUSG00000044770	1,01549	6,56E-05	0,0022
Armex4	ENSMUSG00000049804	1,00829	2,34E-04	0,00569
Tnc	ENSMUSG00000028364	1,00691	9,09E-06	4,93E-04
Prepl	ENSMUSG00000024127	1,00632	1,30E-05	6,46E-04
Per3	ENSMUSG00000028957	1,00131	4,79E-04	0,0096
Gm35339	ENSMUSG00000109179	-1,00212	0,00329	0,0379
Gm17491	ENSMUSG00000097042	-1,00238	1,63E-04	0,00433
Dnaaf3	ENSMUSG00000055809	-1,01265	3,67E-14	1,65E-11
Gm16170	ENSMUSG00000086245	-1,01798	7,48E-04	0,01338
Tmem56	ENSMUSG00000028132	-1,01857	3,75E-05	0,00145
Crybb1	ENSMUSG00000029343	-1,01932	2,82E-04	0,00659
Msc	ENSMUSG00000025930	-1,03729	2,24E-04	0,00552
Tgfbr3l	ENSMUSG00000089736	-1,03772	0,00177	0,02467
Celsr3	ENSMUSG00000023473	-1,05282	9,94E-06	5,19E-04
4930506C21Rik	ENSMUSG00000087478	-1,05393	3,13E-04	0,00708
Gm15903	ENSMUSG00000086916	-1,08356	0,0039	0,04269
Gm16316	ENSMUSG00000087129	-1,096	8,60E-04	0,01483
Acrbp	ENSMUSG00000072770	-1,09667	0,00427	0,04518
Chrm3	ENSMUSG00000046159	-1,09762	0,0023	0,02956
Mir208b	ENSMUSG00000077928	-1,10968	1,13E-06	8,92E-05
Gm12258	ENSMUSG00000072915	-1,11918	1,49E-04	0,00404
Sbk2	ENSMUSG00000030433	-1,12062	7,73E-05	0,00251
Cngb3	ENSMUSG00000056494	-1,13347	5,53E-04	0,01078
Frmpd3	ENSMUSG00000042425	-1,13441	5,75E-04	0,01111
A330023F24Rik	ENSMUSG00000096929	-1,14276	3,97E-05	0,00148
Gm43359	ENSMUSG00000105434	-1,14523	8,31E-04	0,01453
Aqp4	ENSMUSG00000024411	-1,15478	9,16E-05	0,00287
Gm28979	ENSMUSG00000101941	-1,16242	2,61E-06	1,86E-04

Klf2	ENSMUSG00000055148	-1,1716	5,58E-10	1,41E-07
Cenpf	ENSMUSG00000026605	-1,22308	0,00341	0,03903
Olf78	ENSMUSG00000043366	-1,22607	0,00177	0,02467
9430085M18Rik	ENSMUSG00000106164	-1,22741	0,00148	0,02185
Tbc1d10c	ENSMUSG00000040247	-1,25562	2,31E-16	1,58E-13
Slc22a1	ENSMUSG00000023829	-1,25852	9,52E-06	5,09E-04
Gapdhs	ENSMUSG00000061099	-1,27736	0,00377	0,04172
Ccdc63	ENSMUSG00000043036	-1,28074	0,00129	0,01983
Npas2	ENSMUSG00000026077	-1,29223	4,83E-04	0,00966
Pla2g4b	ENSMUSG00000098488	-1,29392	0,0018	0,02493
Gm43360	ENSMUSG00000105970	-1,29766	0,00252	0,03158
H19	ENSMUSG00000000031	-1,30337	0,00135	0,02045
Ras11a	ENSMUSG00000029641	-1,30385	4,44E-06	2,82E-04
Acot3	ENSMUSG00000021228	-1,3061	1,70E-04	0,00451
Mas1	ENSMUSG00000068037	-1,31039	2,33E-04	0,00567
Gm16023	ENSMUSG00000086682	-1,33094	3,07E-04	0,007
Lgals4	ENSMUSG00000053964	-1,34855	2,60E-08	3,72E-06
Rsrp1	ENSMUSG00000037266	-1,35438	4,05E-14	1,77E-11
Fam84b	ENSMUSG00000072568	-1,35839	4,52E-09	8,58E-07
Atcay	ENSMUSG00000034958	-1,36051	0,00226	0,02925
Gm15893	ENSMUSG00000085246	-1,3608	0,00202	0,02709
Gm10635	ENSMUSG00000111765	-1,36711	1,50E-05	7,18E-04
Banf2os	ENSMUSG00000086384	-1,36806	5,37E-07	4,93E-05
Gm30238	ENSMUSG00000103898	-1,38602	0,00247	0,03117
Rgn	ENSMUSG00000023070	-1,39382	0,00295	0,03499
Dbh	ENSMUSG00000000889	-1,43579	7,81E-07	6,74E-05
Irs3	ENSMUSG00000047182	-1,43641	2,27E-04	0,00557
Gm45805	ENSMUSG00000110626	-1,46545	0,00237	0,03028
Rp1	ENSMUSG00000025900	-1,47135	0,0011	0,01773
Nrg2	ENSMUSG00000060275	-1,47416	9,78E-06	5,17E-04
Cdh22	ENSMUSG00000053166	-1,48752	3,90E-09	7,61E-07
Rps3a3	ENSMUSG00000059751	-1,49326	0,0021	0,02781
Alkal2	ENSMUSG00000054204	-1,5182	1,27E-05	6,36E-04
Gm20045	ENSMUSG00000103983	-1,52411	6,63E-07	5,83E-05
0610005C13Rik	ENSMUSG00000109644	-1,53561	0,00108	0,0175
Cacng6	ENSMUSG00000078815	-1,65694	3,75E-05	0,00145
Cnmd	ENSMUSG00000022025	-1,71337	1,01E-08	1,57E-06
Gm43980	ENSMUSG00000107962	-1,79899	4,95E-09	9,26E-07
2610306O10Rik	ENSMUSG00000108614	-1,84927	1,10E-04	0,00325
Tmprss4	ENSMUSG00000032091	-2,0061	1,30E-05	6,46E-04
Aldob	ENSMUSG00000028307	-2,02946	7,57E-24	1,56E-20
Dnase1l2	ENSMUSG00000024136	-2,09414	9,10E-07	7,50E-05
Fgf10	ENSMUSG00000021732	-2,59522	6,99E-07	6,08E-05

Differenziell exprimierte Gene im linken Ventrikel HCN4F-Sham vs. HCN4F-TAC

Die Expressionsanalyse zeigte im linken Ventrikel 353 signifikant differenziell exprimierte Gene.

Gen Symbol	Gen ID	log2FoldChange	p-value	Padj
Igfbp2	ENSMUSG00000039323	6,10981	6,06E-08	4,28E-06
Gm29773	ENSMUSG00000110547	4,86301	4,02E-10	4,99E-08
Ereg	ENSMUSG00000029377	4,84257	3,49E-07	1,92E-05
Acta1	ENSMUSG00000031972	4,24722	2,56E-45	1,82E-41
Crlf1	ENSMUSG00000007888	3,64627	9,72E-11	1,48E-08
Vgl12	ENSMUSG00000049641	3,46824	0,00253	0,02558
Serpin1c	ENSMUSG00000079049	3,38164	8,16E-10	9,46E-08
Cilp	ENSMUSG00000042254	3,2737	3,31E-11	5,90E-09
Nppa	ENSMUSG00000041616	3,21555	4,40E-10	5,41E-08
Comp	ENSMUSG00000031849	3,19566	2,03E-07	1,21E-05
Spr1a	ENSMUSG00000050359	3,16329	2,22E-05	6,14E-04
Has1	ENSMUSG00000003665	3,14222	8,06E-07	3,90E-05
Tbx15	ENSMUSG00000027868	3,05168	4,78E-17	2,44E-14
Fgf6	ENSMUSG00000000183	3,03137	1,04E-05	3,35E-04
Gm13054	ENSMUSG00000086806	2,98898	2,32E-15	8,93E-13
Ltbp2	ENSMUSG00000002020	2,97302	1,38E-08	1,18E-06
Lrp8	ENSMUSG00000028613	2,96172	7,25E-14	2,11E-11
Thbs4	ENSMUSG00000021702	2,88119	8,48E-09	7,76E-07
Lman11	ENSMUSG00000056271	2,87668	2,81E-13	6,91E-11
1500015O10Rik	ENSMUSG00000026051	2,85411	6,81E-04	0,00958
Fmod	ENSMUSG00000041559	2,83875	9,70E-04	0,01248
Nlrc3	ENSMUSG00000049871	2,79331	1,02E-20	9,68E-18
Hspa1b	ENSMUSG00000090877	2,75425	2,11E-06	8,92E-05
Aqp8	ENSMUSG00000030762	2,74294	1,18E-22	1,91E-19
Col8a2	ENSMUSG00000056174	2,70084	1,01E-05	3,28E-04
Atp6v0a4	ENSMUSG00000038600	2,6693	3,07E-07	1,73E-05
Tceal7	ENSMUSG00000079428	2,62904	9,02E-08	5,90E-06
Hspa1a	ENSMUSG00000091971	2,57726	1,48E-05	4,41E-04
Grip1	ENSMUSG00000034813	2,55913	8,73E-08	5,80E-06
Mgat5b	ENSMUSG00000043857	2,55527	1,83E-12	3,96E-10
Thbs1	ENSMUSG00000040152	2,53698	7,72E-13	1,81E-10
Frem1	ENSMUSG00000059049	2,4948	9,29E-07	4,41E-05
Edn3	ENSMUSG00000027524	2,48731	2,92E-10	3,86E-08
Cilp2	ENSMUSG00000044006	2,47575	9,28E-05	0,00193
Sypl2	ENSMUSG00000027887	2,47221	2,02E-13	5,25E-11
Ptgs2	ENSMUSG00000032487	2,46661	1,82E-19	1,30E-16
Myh7	ENSMUSG00000053093	2,45885	1,77E-07	1,07E-05
Syndig1	ENSMUSG00000074736	2,42011	1,36E-06	6,11E-05
Gpr176	ENSMUSG00000040133	2,38465	1,16E-05	3,66E-04
Prrx2	ENSMUSG00000039476	2,33025	1,51E-04	0,0028

Gdf15	ENSMUSG00000038508	2,33014	8,48E-04	0,01134
Synpo2l	ENSMUSG00000039376	2,3003	2,97E-48	4,24E-44
Col9a2	ENSMUSG00000028626	2,28966	4,85E-05	0,00112
Ankrd1	ENSMUSG00000024803	2,27776	9,61E-31	3,43E-27
Itih2	ENSMUSG00000037254	2,26978	2,47E-06	1,02E-04
Nppb	ENSMUSG00000029019	2,26408	2,58E-07	1,49E-05
Egr2	ENSMUSG00000037868	2,22931	1,80E-06	7,82E-05
Abra	ENSMUSG00000042895	2,1225	2,15E-06	9,08E-05
St8sia1	ENSMUSG00000030283	2,11481	5,40E-06	1,97E-04
Spp1	ENSMUSG00000029304	2,10629	1,07E-04	0,00214
Slc24a2	ENSMUSG00000037996	2,10329	7,18E-10	8,61E-08
Kcnj14	ENSMUSG00000058743	2,10182	4,38E-07	2,33E-05
Dkk3	ENSMUSG00000030772	2,09981	2,39E-04	0,00405
Postn	ENSMUSG00000027750	2,07345	3,64E-07	1,98E-05
Atf3	ENSMUSG00000026628	2,04378	4,16E-04	0,00646
Pamr1	ENSMUSG00000027188	2,0414	1,51E-08	1,26E-06
Scml4	ENSMUSG00000044770	2,03302	9,56E-18	5,25E-15
5430419D17Rik	ENSMUSG00000006204	2,01228	3,91E-05	9,66E-04
Fhad1	ENSMUSG00000051435	2,01204	1,88E-04	0,00336
Serpine1	ENSMUSG00000037411	2,00359	4,98E-08	3,67E-06
Adamtsl2	ENSMUSG00000036040	1,98889	3,03E-09	3,13E-07
Col12a1	ENSMUSG00000032332	1,98133	3,24E-09	3,33E-07
Fam167a	ENSMUSG00000035095	1,9655	8,36E-05	0,00178
Sfrp2	ENSMUSG00000027996	1,96371	3,37E-11	5,94E-09
Ankrd2	ENSMUSG00000025172	1,96326	2,05E-05	5,77E-04
Krt18	ENSMUSG00000023043	1,91404	5,65E-04	0,00824
Ctgf	ENSMUSG00000019997	1,90195	4,67E-10	5,70E-08
Ngef	ENSMUSG00000026259	1,87303	8,85E-07	4,25E-05
Rcan1	ENSMUSG00000022951	1,85718	1,19E-05	3,73E-04
Gm30873	ENSMUSG00000109341	1,85487	2,49E-05	6,71E-04
Mfap4	ENSMUSG00000042436	1,85207	1,94E-05	5,48E-04
AW551984	ENSMUSG00000038112	1,84168	2,42E-04	0,00409
Col8a1	ENSMUSG00000068196	1,83425	6,75E-21	6,88E-18
Frzb	ENSMUSG00000027004	1,82797	4,66E-14	1,39E-11
Ankrd23	ENSMUSG00000067653	1,80261	3,24E-08	2,53E-06
Gck	ENSMUSG00000041798	1,78592	1,56E-25	4,45E-22
Hbegf	ENSMUSG00000024486	1,78304	6,12E-15	2,13E-12
Nmrk2	ENSMUSG00000004939	1,77616	3,51E-11	6,11E-09
Dio2	ENSMUSG00000007682	1,75712	2,37E-07	1,39E-05
Egr3	ENSMUSG00000033730	1,75385	1,22E-07	7,73E-06
Xirp2	ENSMUSG00000027022	1,732	2,39E-40	1,14E-36
Itgbl1	ENSMUSG00000032925	1,71507	1,80E-17	9,53E-15
Padi4	ENSMUSG00000025330	1,71189	9,17E-04	0,01199
Car9	ENSMUSG00000028463	1,7035	0,00362	0,03361

Uck2	ENSMUSG00000026558	1,69681	3,08E-19	2,00E-16
Tnfrsf12a	ENSMUSG00000023905	1,6827	3,03E-19	2,00E-16
F2rl1	ENSMUSG00000021678	1,67314	5,75E-07	2,94E-05
Ddias	ENSMUSG00000030641	1,65535	2,65E-04	0,00443
Il21r	ENSMUSG00000030745	1,65028	2,22E-04	0,00383
Tnc	ENSMUSG00000028364	1,63407	7,18E-09	6,66E-07
Klhl34	ENSMUSG00000047485	1,62923	7,26E-16	2,88E-13
Timp1	ENSMUSG00000001131	1,62544	0,00268	0,02673
Pou3f1	ENSMUSG00000090125	1,62285	1,12E-05	3,57E-04
Cnksr1	ENSMUSG00000028841	1,59586	7,11E-22	8,45E-19
Otud1	ENSMUSG00000043415	1,58658	4,69E-05	0,0011
Gm12092	ENSMUSG00000084850	1,58313	3,09E-05	8,04E-04
Etv4	ENSMUSG00000017724	1,58133	1,09E-04	0,00219
Gm13943	ENSMUSG00000085277	1,58088	2,30E-08	1,84E-06
Fbln7	ENSMUSG00000027386	1,58051	8,50E-04	0,01134
Acan	ENSMUSG00000030607	1,56376	1,86E-04	0,00334
Mfap5	ENSMUSG00000030116	1,56364	2,46E-11	4,50E-09
Mgam	ENSMUSG00000068587	1,55471	0,00305	0,02947
Slc1a2	ENSMUSG00000005089	1,55132	6,54E-04	0,00924
Ccl12	ENSMUSG00000035352	1,53213	9,61E-04	0,01242
Cd79a	ENSMUSG00000003379	1,50082	4,83E-05	0,00112
Xirp1	ENSMUSG00000079243	1,49638	1,20E-06	5,51E-05
Enah	ENSMUSG00000022995	1,49579	4,78E-20	4,27E-17
Nox4	ENSMUSG00000030562	1,49312	1,24E-05	3,86E-04
Shisa3	ENSMUSG00000050010	1,4919	1,03E-05	3,32E-04
Adamts8	ENSMUSG00000031994	1,48162	6,63E-07	3,31E-05
Mybpc2	ENSMUSG00000038670	1,47772	6,53E-15	2,22E-12
Cpxm2	ENSMUSG00000030862	1,47278	1,97E-12	4,13E-10
Psma8	ENSMUSG00000036743	1,469	0,00167	0,01894
Gas2l3	ENSMUSG00000074802	1,45943	1,59E-06	6,97E-05
Met	ENSMUSG00000009376	1,44934	1,48E-09	1,65E-07
Jsrp1	ENSMUSG00000020216	1,44054	1,14E-04	0,00226
Meox1	ENSMUSG00000001493	1,43682	1,58E-10	2,19E-08
Clec11a	ENSMUSG00000004473	1,43661	2,80E-04	0,00465
Sox9	ENSMUSG00000000567	1,43332	2,74E-14	8,51E-12
Emp1	ENSMUSG00000030208	1,42845	1,92E-13	5,12E-11
Piezo2	ENSMUSG00000041482	1,42263	7,85E-04	0,01071
Ankrd45	ENSMUSG00000044835	1,39938	2,70E-07	1,55E-05
Nuak1	ENSMUSG00000020032	1,39598	8,11E-14	2,32E-11
Fibin	ENSMUSG00000074971	1,39014	8,73E-08	5,80E-06
Krt80	ENSMUSG00000037185	1,38979	1,02E-09	1,17E-07
Vcan	ENSMUSG00000021614	1,3875	2,40E-25	5,71E-22
Hectd2os	ENSMUSG00000087579	1,38034	7,78E-18	4,44E-15
1500009L16Rik	ENSMUSG00000087651	1,37138	3,10E-08	2,43E-06

Klhl29	ENSMUSG00000020627	1,36967	1,21E-06	5,52E-05
Col4a3	ENSMUSG00000079465	1,36359	3,03E-13	7,33E-11
Gdf6	ENSMUSG00000051279	1,36305	3,28E-05	8,43E-04
Wisp2	ENSMUSG00000027656	1,35769	4,83E-08	3,60E-06
Panx1	ENSMUSG00000031934	1,32501	9,05E-09	8,02E-07
Hspa11	ENSMUSG00000007033	1,32485	6,71E-12	1,33E-09
Fhl1	ENSMUSG00000023092	1,31414	1,13E-14	3,66E-12
Dclk3	ENSMUSG00000032500	1,30213	0,00501	0,0426
Myot	ENSMUSG00000024471	1,29293	7,37E-09	6,79E-07
Ptx3	ENSMUSG00000027832	1,28922	0,00564	0,04662
Inhba	ENSMUSG00000041324	1,28363	6,70E-06	2,35E-04
Socs3	ENSMUSG00000053113	1,27959	1,65E-06	7,20E-05
Ppp1r3c	ENSMUSG00000067279	1,27878	0,00169	0,01907
Bgn	ENSMUSG00000031375	1,27662	4,49E-11	7,63E-09
Arhgdig	ENSMUSG00000073433	1,26794	0,00131	0,01589
Ighd	ENSMUSG00000104213	1,26592	0,00324	0,03099
Adamts20	ENSMUSG00000022449	1,26397	0,00423	0,03774
Gm31678	ENSMUSG00000105427	1,25028	0,00159	0,0183
Gnao1	ENSMUSG00000031748	1,24845	2,47E-18	1,53E-15
Ch25h	ENSMUSG00000050370	1,24259	0,00414	0,03726
Fstl3	ENSMUSG00000020325	1,23888	1,23E-10	1,81E-08
Col14a1	ENSMUSG00000022371	1,23246	1,77E-07	1,07E-05
Fgl2	ENSMUSG00000039899	1,23163	1,03E-10	1,55E-08
Cyr61	ENSMUSG00000028195	1,23019	4,41E-18	2,62E-15
Tgfb2	ENSMUSG00000039239	1,22083	1,27E-11	2,44E-09
Atp8a2	ENSMUSG00000021983	1,21558	1,11E-08	9,57E-07
Svepl	ENSMUSG00000028369	1,21425	9,14E-09	8,05E-07
Sphk1	ENSMUSG00000061878	1,20578	2,21E-06	9,26E-05
Lox	ENSMUSG00000024529	1,20219	8,86E-09	7,98E-07
Apod	ENSMUSG00000022548	1,20072	7,61E-08	5,20E-06
Clenkb	ENSMUSG00000006216	1,1994	1,80E-04	0,00325
Nupr1	ENSMUSG00000030717	1,19889	5,38E-05	0,00123
Bcl2	ENSMUSG00000057329	1,194	1,76E-08	1,43E-06
Spsb4	ENSMUSG00000046997	1,19039	2,03E-16	9,64E-14
Adcy7	ENSMUSG00000031659	1,18467	1,32E-11	2,52E-09
Enpp1	ENSMUSG00000037370	1,1809	1,13E-06	5,21E-05
Hmmr	ENSMUSG00000020330	1,17651	0,00415	0,03733
Mllt11	ENSMUSG00000053192	1,17477	5,92E-16	2,49E-13
Rab27b	ENSMUSG00000024511	1,17089	9,09E-05	0,0019
Pi16	ENSMUSG00000024011	1,17068	1,53E-07	9,40E-06
AI839979	ENSMUSG00000107355	1,16753	2,91E-06	1,18E-04
Csf2rb2	ENSMUSG00000071714	1,16455	6,08E-04	0,00874
Syt12	ENSMUSG00000049303	1,15508	3,34E-06	1,31E-04
Col1a1	ENSMUSG00000001506	1,14302	8,83E-09	7,98E-07

Kif1a	ENSMUSG00000014602	1,13939	7,62E-04	0,01044
Pfkip	ENSMUSG00000021196	1,13732	1,94E-13	5,12E-11
Col22a1	ENSMUSG00000079022	1,13457	0,00149	0,01756
Rasl11b	ENSMUSG00000049907	1,13219	7,88E-04	0,01074
Mmp3	ENSMUSG00000043613	1,12187	1,23E-06	5,57E-05
Ccl2	ENSMUSG00000035385	1,12135	1,80E-05	5,17E-04
Loxl2	ENSMUSG00000034205	1,11012	4,01E-10	4,99E-08
Itga9	ENSMUSG00000039115	1,10761	7,01E-16	2,86E-13
Col5a2	ENSMUSG00000026042	1,10731	4,29E-12	8,88E-10
Cd44	ENSMUSG00000005087	1,10112	4,95E-09	4,77E-07
Napepld	ENSMUSG00000044968	1,09891	2,77E-13	6,91E-11
Lrp11	ENSMUSG00000019796	1,09797	6,43E-06	2,27E-04
Tmem119	ENSMUSG00000054675	1,09251	2,09E-04	0,00365
Tlr4	ENSMUSG00000039005	1,08766	5,79E-09	5,55E-07
Serpinf1	ENSMUSG00000000753	1,08649	2,02E-07	1,21E-05
Mthfd2	ENSMUSG00000005667	1,08314	1,92E-08	1,55E-06
Mapk4	ENSMUSG00000024558	1,08106	3,74E-06	1,44E-04
Pdgfrl	ENSMUSG00000031595	1,06978	2,99E-04	0,0049
Dbn1	ENSMUSG00000034675	1,06856	1,06E-08	9,22E-07
Snai1	ENSMUSG00000042821	1,06773	3,86E-05	9,57E-04
Gm11967	ENSMUSG00000084819	1,06131	2,36E-04	0,00401
Scx	ENSMUSG00000034161	1,06106	1,41E-04	0,00268
Ssc5d	ENSMUSG00000035279	1,06038	6,96E-07	3,45E-05
Fam26e	ENSMUSG00000049872	1,0598	3,43E-07	1,89E-05
Eln	ENSMUSG00000029675	1,05872	0,00221	0,02334
Fstl1	ENSMUSG00000022816	1,05731	5,60E-11	9,19E-09
P3h2	ENSMUSG00000038168	1,0481	9,77E-09	8,55E-07
Kif26b	ENSMUSG00000026494	1,04668	5,69E-05	0,00129
Nr4a1	ENSMUSG00000023034	1,045	0,0013	0,01579
Ccdc136	ENSMUSG00000029769	1,04429	3,22E-06	1,27E-04
Slc1a4	ENSMUSG00000020142	1,04126	1,21E-06	5,51E-05
Flnc	ENSMUSG00000068699	1,03254	1,78E-19	1,30E-16
Sorbs2	ENSMUSG00000031626	1,02782	2,48E-15	9,32E-13
Gpr68	ENSMUSG00000047415	1,02734	0,00579	0,0474
Runx1	ENSMUSG00000022952	1,02645	2,66E-05	7,03E-04
Ptn	ENSMUSG00000029838	1,02258	0,00158	0,01823
Bhlhe40	ENSMUSG00000030103	1,02226	4,00E-06	1,53E-04
Adam12	ENSMUSG00000054555	1,02082	9,89E-04	0,01265
Aldh1a2	ENSMUSG00000013584	1,01957	8,95E-06	2,96E-04
Sh3rf3	ENSMUSG00000037990	1,01012	2,52E-04	0,00424
Nrap	ENSMUSG00000049134	1,00606	5,10E-20	4,28E-17
Esm1	ENSMUSG00000042379	1,00447	6,95E-04	0,00971
Tspan9	ENSMUSG00000030352	1,0038	5,76E-15	2,05E-12
Col3a1	ENSMUSG00000026043	1,00365	2,17E-07	1,28E-05

Banf2os	ENSMUSG00000086384	-1,00106	0,00129	0,01577
Slc35f1	ENSMUSG00000038602	-1,00166	0,00232	0,02411
Abca12	ENSMUSG00000050296	-1,00175	6,09E-05	0,00136
Gm37621	ENSMUSG00000103672	-1,00853	0,00408	0,03691
Chrna10	ENSMUSG00000066279	-1,00948	1,89E-04	0,00336
Epb4114b	ENSMUSG00000028434	-1,00989	1,03E-05	3,32E-04
Ptpru	ENSMUSG00000028909	-1,01362	4,21E-06	1,59E-04
Tnip3	ENSMUSG00000044162	-1,01558	0,00146	0,01727
Gstt2	ENSMUSG00000033318	-1,01786	6,07E-04	0,00874
Gnmt	ENSMUSG00000002769	-1,01926	0,00204	0,02193
Tesmin	ENSMUSG00000024905	-1,02089	0,00296	0,02878
Foxo6	ENSMUSG00000052135	-1,02103	1,37E-05	4,16E-04
Gm11816	ENSMUSG00000086233	-1,02877	0,00301	0,0292
Slc6a17	ENSMUSG00000027894	-1,03002	4,42E-06	1,65E-04
Plekhb1	ENSMUSG00000030701	-1,03759	3,07E-06	1,23E-04
Clec18a	ENSMUSG00000033633	-1,03907	0,00443	0,03903
Sox10	ENSMUSG00000033006	-1,0395	0,00102	0,01292
Pla2g5	ENSMUSG00000041193	-1,05172	4,23E-06	1,59E-04
Arrdc2	ENSMUSG00000002910	-1,05615	2,04E-09	2,18E-07
A330023F24Rik	ENSMUSG00000096929	-1,0577	0,00286	0,02801
Ddit4l	ENSMUSG00000046818	-1,05947	0,00233	0,02413
Ramp1	ENSMUSG00000034353	-1,05979	5,92E-07	3,01E-05
Mbp	ENSMUSG00000041607	-1,07497	1,20E-05	3,76E-04
Tmem179	ENSMUSG00000054013	-1,07539	4,85E-05	0,00112
Cryba4	ENSMUSG00000066975	-1,07784	8,30E-05	0,00177
Gpr160	ENSMUSG00000037661	-1,09389	6,45E-05	0,00143
Angptl3	ENSMUSG00000028553	-1,10772	0,00281	0,02757
Frat1	ENSMUSG00000067199	-1,11029	9,31E-07	4,41E-05
Gpr3711	ENSMUSG00000026424	-1,11136	4,09E-04	0,00637
Gal3st2c	ENSMUSG00000073608	-1,11212	1,06E-06	4,93E-05
Stard10	ENSMUSG00000030688	-1,12347	1,66E-10	2,28E-08
Gm43359	ENSMUSG00000105434	-1,12726	9,65E-04	0,01246
Pdp2	ENSMUSG00000048371	-1,13819	2,46E-09	2,59E-07
Plxnb3	ENSMUSG00000031385	-1,13911	2,59E-06	1,06E-04
Adam23	ENSMUSG00000025964	-1,1394	9,97E-05	0,00204
Enpp2	ENSMUSG00000022425	-1,14138	2,63E-05	6,99E-04
Moxd1	ENSMUSG00000020000	-1,14579	9,73E-04	0,01251
Gm37033	ENSMUSG00000104388	-1,148	0,00327	0,03122
Ptgfr	ENSMUSG00000028036	-1,15146	4,20E-04	0,00651
Gm27202	ENSMUSG00000098424	-1,15945	0,00567	0,04676
Abca4	ENSMUSG00000028125	-1,16382	1,88E-06	8,10E-05
Gm28979	ENSMUSG00000101941	-1,18163	0,0014	0,01669
Stum	ENSMUSG00000053963	-1,18253	2,29E-04	0,00394
Aldh112	ENSMUSG00000020256	-1,19818	6,99E-05	0,00152

Foxd3	ENSMUSG00000067261	-1,20149	1,65E-04	0,00303
Gfra4	ENSMUSG00000027316	-1,20897	1,01E-09	1,16E-07
Tnni2	ENSMUSG00000031097	-1,21245	0,00106	0,01339
Ctla4	ENSMUSG00000026011	-1,22243	0,0035	0,03295
Lvrn	ENSMUSG00000024481	-1,2305	9,94E-05	0,00204
Gm10435	ENSMUSG00000072902	-1,23896	1,48E-07	9,12E-06
Hnmt	ENSMUSG00000026986	-1,24088	3,88E-11	6,67E-09
Cfap74	ENSMUSG00000078490	-1,24222	0,00117	0,01466
Scara5	ENSMUSG00000022032	-1,24243	4,46E-08	3,37E-06
Kcna6	ENSMUSG00000038077	-1,24436	0,0013	0,01585
Adcy8	ENSMUSG00000022376	-1,24917	0,00316	0,03029
Celsr3	ENSMUSG00000023473	-1,25134	1,67E-05	4,87E-04
Gm42517	ENSMUSG00000105867	-1,25434	8,80E-04	0,01167
Chl1	ENSMUSG00000030077	-1,25485	7,01E-04	0,00977
Sorcs2	ENSMUSG00000029093	-1,25752	3,12E-16	1,44E-13
Osr1	ENSMUSG00000048387	-1,25886	5,46E-05	0,00125
Phkg1	ENSMUSG00000025537	-1,25983	1,15E-07	7,34E-06
Gata3	ENSMUSG00000015619	-1,26658	0,00456	0,0398
Epop	ENSMUSG00000043439	-1,2675	4,29E-04	0,0066
mt-Tt	ENSMUSG00000064371	-1,27417	5,66E-08	4,02E-06
Gm37320	ENSMUSG00000104324	-1,27531	0,00398	0,03624
Snai3	ENSMUSG00000006587	-1,27825	1,65E-04	0,00303
Dbh	ENSMUSG00000000889	-1,28071	0,00283	0,02779
2210407C18Rik	ENSMUSG00000037145	-1,28544	4,15E-06	1,58E-04
Col6a6	ENSMUSG00000043719	-1,28835	6,05E-06	2,16E-04
Opn4	ENSMUSG00000021799	-1,2975	7,97E-08	5,41E-06
Lncpint	ENSMUSG00000044471	-1,3124	0,00203	0,02185
Chrna2	ENSMUSG00000022041	-1,32045	2,15E-04	0,00374
Gm12519	ENSMUSG00000085643	-1,32581	6,85E-04	0,00962
NA	ENSMUSG00000109908	-1,3273	0,00114	0,01424
Lypd2	ENSMUSG00000022595	-1,33095	0,00549	0,04558
A530016L24Rik	ENSMUSG00000043122	-1,3329	9,53E-15	3,16E-12
Cenpf	ENSMUSG00000026605	-1,33871	6,35E-13	1,51E-10
Ccbe1	ENSMUSG00000046318	-1,35052	2,04E-06	8,67E-05
Mir208b	ENSMUSG00000077928	-1,3559	5,19E-05	0,00119
Iglon5	ENSMUSG00000013367	-1,3587	0,00127	0,01553
Ly75	ENSMUSG00000026980	-1,36995	2,53E-05	6,81E-04
Cngb3	ENSMUSG00000056494	-1,37391	5,72E-04	0,0083
Clen1	ENSMUSG00000029862	-1,38094	6,89E-05	0,00151
Cma1	ENSMUSG00000022225	-1,3841	0,001	0,01277
Scarna17	ENSMUSG00000088689	-1,4187	4,60E-04	0,00695
Plp1	ENSMUSG00000031425	-1,42224	7,70E-07	3,78E-05
Cnmd	ENSMUSG00000022025	-1,42751	0,00473	0,04085
Drd2	ENSMUSG00000032259	-1,42784	5,04E-05	0,00116

Gm2115	ENSMUSG00000097789	-1,45254	0,00478	0,04108
Ano10	ENSMUSG00000037949	-1,46272	1,20E-22	1,91E-19
Slc22a1	ENSMUSG00000023829	-1,47471	1,95E-05	5,50E-04
Hrk	ENSMUSG00000046607	-1,47589	0,00146	0,01728
Sema4f	ENSMUSG00000000627	-1,47877	0,0036	0,03349
Scn10a	ENSMUSG00000034533	-1,4946	1,70E-04	0,0031
Gm33543	ENSMUSG00000110353	-1,49956	4,51E-06	1,68E-04
Tmprss4	ENSMUSG00000032091	-1,50153	8,55E-05	0,00181
Cfap61	ENSMUSG00000037143	-1,52585	0,00211	0,02254
Cdh22	ENSMUSG00000053166	-1,53522	1,02E-04	0,00208
Gm4956	ENSMUSG00000025936	-1,53906	6,48E-04	0,00917
Kcna1	ENSMUSG00000047976	-1,53934	4,60E-05	0,00109
Acot3	ENSMUSG00000021228	-1,54237	0,0011	0,01384
S1pr5	ENSMUSG00000045087	-1,54376	8,28E-04	0,01115
Lgals4	ENSMUSG00000053964	-1,55171	1,88E-10	2,55E-08
Ces1d	ENSMUSG00000056973	-1,55236	4,05E-05	9,89E-04
Gm44022	ENSMUSG00000107706	-1,56704	0,00301	0,02916
Gfra3	ENSMUSG00000024366	-1,57333	1,44E-05	4,31E-04
Nmb	ENSMUSG00000025723	-1,58529	9,90E-08	6,39E-06
Acsn5	ENSMUSG00000030972	-1,62226	1,64E-07	1,00E-05
Gm42639	ENSMUSG00000104871	-1,62874	0,00406	0,03672
2010001K21Rik	ENSMUSG00000051606	-1,63621	0,00311	0,02991
Tbc1d10c	ENSMUSG00000040247	-1,65125	3,12E-14	9,48E-12
Sbk2	ENSMUSG00000030433	-1,65504	1,74E-06	7,59E-05
Ano5	ENSMUSG00000055489	-1,66383	0,00126	0,01546
Kcna2	ENSMUSG00000040724	-1,67434	9,02E-09	8,02E-07
Rp1	ENSMUSG00000025900	-1,68179	0,00404	0,03659
Ucp3	ENSMUSG00000032942	-1,70834	2,06E-07	1,22E-05
Ankrd63	ENSMUSG00000078137	-1,72267	0,00199	0,02154
Rasef	ENSMUSG00000043003	-1,72808	0,00118	0,01467
Shisa6	ENSMUSG00000053930	-1,73801	0,00134	0,0162
Efemp1	ENSMUSG00000020467	-1,79069	2,01E-16	9,64E-14
Kcnv2	ENSMUSG00000047298	-1,84132	3,01E-10	3,90E-08
Klhl33	ENSMUSG00000090799	-1,8481	1,37E-13	3,75E-11
Sfrp5	ENSMUSG00000018822	-1,89377	2,08E-05	5,84E-04
Penk	ENSMUSG00000045573	-1,93268	9,50E-05	0,00196
Gm10635	ENSMUSG00000111765	-1,95823	2,89E-08	2,28E-06
Retnla	ENSMUSG00000061100	-1,95896	1,90E-12	4,06E-10
Acot1	ENSMUSG00000072949	-2,02293	5,50E-04	0,00809
Sbk3	ENSMUSG00000085272	-2,05686	3,03E-07	1,71E-05
Uckl1os	ENSMUSG00000010492	-2,0688	2,21E-09	2,34E-07
Alkal2	ENSMUSG00000054204	-2,09591	9,82E-06	3,21E-04
Inmt	ENSMUSG00000003477	-2,22303	1,32E-05	4,03E-04
Aldob	ENSMUSG00000028307	-2,71191	3,96E-22	5,14E-19

Pfkfb1	ENSMUSG00000025271	-2,77659	9,77E-20	7,75E-17
Car3	ENSMUSG00000027559	-2,81698	2,39E-04	0,00406
Ccl11	ENSMUSG00000020676	-2,87303	3,82E-09	3,87E-07
Cacng6	ENSMUSG00000078815	-3,05245	2,39E-05	6,49E-04
Aqp4	ENSMUSG00000024411	-3,20318	1,79E-04	0,00325

Differenziell exprimierte Gene im linken Ventrikel WT-TAC vs. HCN4F-TAC

Die Expressionsanalyse zeigte im linken Ventrikel 64 signifikant differenziell exprimierte Gene.

Gen Symbol	Gen ID	log2FoldChange	p-value	Padj
Vgll2	ENSMUSG00000049641	2,8013	5,29E-06	0,00244
Gm29773	ENSMUSG00000110547	2,43177	2,85E-06	0,00165
Has1	ENSMUSG00000003665	2,21234	5,69E-04	0,04764
Crlf1	ENSMUSG00000007888	2,11645	2,01E-04	0,02546
Itih2	ENSMUSG00000037254	1,99304	1,54E-05	0,00444
Frem1	ENSMUSG00000059049	1,94828	1,15E-04	0,01689
Col8a2	ENSMUSG00000056174	1,9112	1,93E-04	0,02533
Serpinb1c	ENSMUSG00000079049	1,90622	5,78E-06	0,00246
Ccl12	ENSMUSG00000035352	1,87335	3,75E-04	0,03703
Gdf15	ENSMUSG00000038508	1,86738	2,16E-08	2,48E-05
Gm13054	ENSMUSG00000086806	1,77535	1,75E-06	0,00121
Syndig1	ENSMUSG00000074736	1,68834	1,46E-05	0,00429
Etv4	ENSMUSG00000017724	1,6338	8,73E-05	0,01443
Atp6v0a4	ENSMUSG00000038600	1,62941	2,51E-04	0,02885
Grip1	ENSMUSG00000034813	1,61599	1,31E-04	0,01885
Ptgs2	ENSMUSG00000032487	1,58665	1,06E-05	0,0035
Lockd	ENSMUSG00000098318	1,5312	1,43E-04	0,01993
Ccl2	ENSMUSG00000035385	1,47876	1,26E-04	0,01837
Timp1	ENSMUSG00000001131	1,46867	8,02E-05	0,01386
Col12a1	ENSMUSG00000032332	1,46576	1,35E-05	0,00406
Acta1	ENSMUSG00000031972	1,41463	3,16E-07	2,55E-04
Ngef	ENSMUSG00000026259	1,36558	2,25E-04	0,02691
Thbs1	ENSMUSG00000040152	1,36277	3,29E-04	0,03439
Lrp8	ENSMUSG00000028613	1,35986	3,52E-04	0,03549
Gdf6	ENSMUSG00000051279	1,35935	2,09E-05	0,00526
Itih4	ENSMUSG00000021922	1,30475	6,47E-06	0,00253
AI593442	ENSMUSG00000078307	1,26995	2,34E-07	2,02E-04
Ccl7	ENSMUSG00000035373	1,26531	1,66E-05	0,00445
Egr3	ENSMUSG00000033730	1,26333	9,35E-05	0,01505
Nrg1	ENSMUSG00000062991	1,25701	5,04E-05	0,00994
Tbx15	ENSMUSG00000027868	1,2542	2,34E-06	0,00154
Nlrc3	ENSMUSG00000049871	1,24252	3,40E-04	0,03459

Sox9	ENSMUSG00000000567	1,23417	3,23E-09	5,58E-06
Frzb	ENSMUSG00000027004	1,22257	1,01E-05	0,00339
Col8a1	ENSMUSG00000068196	1,19426	3,55E-10	7,01E-07
Foxs1	ENSMUSG00000074676	1,13274	6,45E-05	0,01143
Itgbl1	ENSMUSG00000032925	1,12478	2,94E-06	0,00165
Ankrd1	ENSMUSG00000024803	1,10822	6,09E-07	4,43E-04
Pstpip1	ENSMUSG00000032322	1,08898	2,73E-04	0,02959
Mfap5	ENSMUSG00000030116	1,08378	6,05E-06	0,00246
Aqp8	ENSMUSG00000030762	1,07598	1,66E-05	0,00445
Tnc	ENSMUSG00000028364	1,07394	1,99E-04	0,0254
Edn3	ENSMUSG00000027524	1,04487	4,40E-05	0,00916
Vcan	ENSMUSG00000021614	1,02894	4,29E-12	1,19E-08
Meox1	ENSMUSG00000001493	1,02232	2,67E-05	0,00625
Scml4	ENSMUSG00000044770	1,01871	6,02E-06	0,00246
Apod	ENSMUSG00000022548	1,00637	6,06E-06	0,00246
Cenpf	ENSMUSG00000026605	-1,01599	3,98E-04	0,03854
Abca4	ENSMUSG00000028125	-1,0295	3,38E-04	0,03456
Nnmt	ENSMUSG00000032271	-1,03504	1,11E-04	0,01689
Kcnv2	ENSMUSG00000047298	-1,11774	4,16E-04	0,03994
Klhl33	ENSMUSG00000090799	-1,15522	6,75E-05	0,01181
Acsm5	ENSMUSG00000030972	-1,24714	2,54E-05	0,00611
Pts	ENSMUSG00000032067	-1,31677	2,28E-29	1,05E-25
Pfkfb1	ENSMUSG00000025271	-1,42027	2,78E-06	0,00165
Uckl1os	ENSMUSG00000010492	-1,47493	4,60E-04	0,04204
Dixdc1	ENSMUSG00000032064	-1,59791	6,46E-15	2,23E-11
Nxpe2	ENSMUSG00000032028	-1,85166	3,33E-07	2,55E-04
Aqp4	ENSMUSG00000024411	-2,40798	1,82E-05	0,00466
Nrg4	ENSMUSG00000032311	-2,6601	3,37E-10	7,01E-07
Pdzd3	ENSMUSG00000032105	-2,78249	5,01E-06	0,00239
Gm11942	ENSMUSG00000094344	-3,91622	6,63E-06	0,00253
Nxpe4	ENSMUSG00000044229	-4,91515	1,29E-52	1,79E-48
Plet1os	ENSMUSG00000101304	-5,66574	1,60E-35	1,11E-31

Publikation:

Hennis K, Rötzer RD, **Rilling J**, Wu Y, Thalhammer SB, Biel M, Wahl-Schott C, Fenske S. In vivo and ex vivo electrophysiological study of the mouse heart to characterize the cardiac conduction system, including atrial and ventricular vulnerability. **Nat Protoc.** 2022 May;17(5):1189-1222. doi: 10.1038/s41596-021-00678-z. Epub 2022 Mar 21. PMID: 35314849.

Danksagung

Ein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Biel für die Aufnahme in den Arbeitskreis und die Unterstützung meines Promotionsvorhabens sowie für die stets offene Tür bei Fragen.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Frau PD Dr. Stefanie Fenske bedanken. Vielen Dank für die intensive wissenschaftliche Betreuung, konstruktive Diskussionen, das gute Arbeitsklima und die Unterstützung während der gesamten Zeit.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ammer für die Hilfestellung bei tiermedizinischen Fragen und die Möglichkeit, die Dissertation zu verwirklichen, bedanken.

Ein weiterer Dank gilt für Prof. Dr. Wahl-Schott. Danke für die tatkräftige Unterstützung und die anregenden Diskussionen bei dem HCN4F-Projekt, die zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Ganz besondere Anerkennung gilt meinen Kollegen aus der Herz-Gruppe Dr. Konstantin Hennis und Dr. René Rötzer. Lieber Konsti und lieber René, bei euch möchte ich mich ganz herzlich bedanken für die tolle Einarbeitung, wertvolle Ratschläge, unbegrenzte Hilfsbereitschaft, hervorragende wissenschaftliche Diskussionen, technischen Support und für die schöne gemeinsame Zeit. Ebenso bedanke ich mich bei Stefan. Danke für deine tadellose Qualitätsarbeit und Hilfestellung bei molekularbiologischen Fragen. Bei Nina und Vivi möchte ich mich für aufmunternde Worte bedanken.

Mein Dank gilt auch Frau Katharina Heimberger für anregende Diskussionen und die enorme Hilfsbereitschaft.

Ein weiterer Dank geht an Julia Kerler (TU München), Manuela Ritzal und Dr. Juan E. Camacho Londoño (Universität Heidelberg). Vielen Dank für die wertvollen Tipps bei der Etablierung der TAC-OP.

Auch bei den Tierpflegern Marielle und Selina bedanke ich mich ganz herzlich für die sehr gute Zusammenarbeit.

Außerdem danke ich dem gesamten Arbeitskreis für die tolle gemeinsame Zeit im Labor.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Ehemann Martin bedanken. Vielen Dank für deine Geduld, unendliche Unterstützung und Motivation. Danke, dass ich mich immer auf dich verlassen kann!