

**DISSERTATION**

**STEFANIE FENSKE**



**UNTERSUCHUNG ZUR KARDIALEN FUNKTION  
DES HYPERPOLARISATIONS-AKTIVIERTEN  
KATIONENKANALS HCN3**

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



**UNTERSUCHUNG ZUR KARDIALEN FUNKTION  
DES HYPERPOLARISATIONS-AKTIVIERTEN  
KATIONENKANALS HCN3**

Stefanie Fenske

aus Konstanz

2010



### **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Martin Biel betreut.

### **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 05.07.2010

---

Stefanie Fenske

Dissertation eingereicht am 05.07.2010

1. Gutachter Prof. Dr. M. Biel

2. Gutachter Prof. Dr. C. Wahl-Schott

mündliche Prüfung am 26.07.2010



# INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>10</b>
	<b>3.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer</b>	<b>10</b>
	<b>3.2 Verwendete Mauslinie</b>	<b>10</b>
	<b>3.3 Arbeiten mit DNA</b>	<b>11</b>
	3.3.1 Isolierung genomischer DNA für die Genotypisierung	11
	3.3.2 Amplifikation der DNA - Polymerasekettenreaktion	11
	3.3.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	12
	3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese	13
	3.3.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	14
	3.3.6 Quantifizierung von DNA	14
	<b>3.4 Arbeiten mit RNA</b>	<b>15</b>
	3.4.1 Isolation von Poly-A-RNA aus Gewebe	15
	3.4.2 Quantifizierung von RNA	15
	3.4.3 RT-PCR	16
	<b>3.5 Arbeiten mit Proteinen</b>	<b>17</b>
	3.5.1 Proteinisolation aus Gehirn-Gewebe	17
	3.5.2 Quantifizierung von Proteinen	17
	3.5.3 SDS-PAGE und Western-Blot	17
	<b>3.6 Histochemie</b>	<b>21</b>
	3.6.1 Herstellung von Paraffin-Gewebeschnitten	21
	3.6.2 Herstellung von Cryo-Gewebeschnitten	21
	3.6.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	22
	3.6.4 Immunhistochemie	23
	<b>3.7 Kultur eukaryotischer Zellen</b>	<b>24</b>
	3.7.1 Verwendete Zelllinien	24
	3.7.2 Generierung einer stabilen mHCN2- und hHCN4-Zelllinie - Elektroporation	25
	3.7.3 Generierung einer stabilen mHCN3-Zelllinie - Flp-In™	25
	3.7.4 Vorbereitung der Zellen für die Elektrophysiologie	26
	<b>3.8 EKG-Aufzeichnungen</b>	<b>27</b>
	<b>3.9 Isolation von Kardiomyozyten</b>	<b>28</b>

# INHALTSVERZEICHNIS

---

	<b>3.10 Elektrophysiologie</b>	31
	3.10.1 Experimentelle Durchführung	31
	3.10.2 Patch-Clamp-Protokolle	31
	3.10.3 Lösungen für die Elektrophysiologie	35
	3.10.4 Korrektur des „Liquid Junction Potential“	37
	3.10.5 Datenanalyse	39
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	42
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	58
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	63
<b>7</b>	<b>REFERENZEN</b>	64
<b>8</b>	<b>ANHANG</b>	68
	<b>8.1 Daten-Tabellen</b>	68
	<b>8.2 Verwendete Primer</b>	72
	<b>8.3 RT-PCR Protokolle</b>	73
	<b>8.4 Lebenslauf</b>	75
	<b>8.5 Publikationen</b>	76
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	77

## 1 Einleitung

Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels (HCN-Kanäle) sind Kationenkanäle, die durch Hyperpolarisation aktiviert und durch Zyklonukleotide gesteuert werden. Sie bilden eine kleine Proteinfamilie mit vier Vertretern (HCN1-4), die zur Superfamilie der Pore-Loop Kationenkanäle gehören. Die Kanäle leiten einen Ionenstrom, der in den späten 70er Jahren und Anfang der 80er Jahre in Sinusknotenzellen und Neuronen entdeckt wurde und der in dieser Zeit mehrere Namen erhalten hat:  $I_h$  (hyperpolarization),  $I_f$  (funny),  $I_q$  (queer) (Noma and Irisawa 1976; Fain et al. 1978; Brown et al. 1979; Halliwell and Adams 1982). Heute ist  $I_h$  die gebräuchlichste Bezeichnung. Erst 20 Jahre nach der Entdeckung dieser Ströme konnten die zugrundeliegenden Ionenkanäle identifiziert und kloniert werden (Gauss et al. 1998; Ludwig et al. 1998; Santoro et al. 1998; Ludwig et al. 1999). Sie werden vor allem in Neuronen und in Herzzellen exprimiert und spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Erregbarkeit und anderer elektrischer Eigenschaften dieser Zellen. Eine Funktionsstörungen von HCN-Kanälen wird mit Krankheiten wie Arrhythmien (HCN4) (Stieber et al. 2006), Epilepsie (HCN2) (Ludwig et al. 2003) und neuropathischen Schmerzen (HCN1) (Chaplan et al. 2003) in Verbindung gebracht.

Die HCN-Kanäle sind aus vier Untereinheiten aufgebaut. Es können sich sowohl Homomere als auch Heteromere aus den Untereinheiten HCN1-4 bilden (Abb. 1). Der zentrale Grundbaustein einer Untereinheit besteht aus sechs  $\alpha$ -helikalen Transmembransegmenten (S1-S6). Der Aufbau eines Bausteins folgt einem modularen Bauplan. Das wichtigste Modul ist die poretragende Kerneinheit (S5-S6, Core). Sie enthält an der engsten Stelle den Selektivitätsfilter mit der bei allen Kaliumkanälen hoch konservierten Signatursequenz aus den Aminosäuren Glyzin-Tyrosin-Glyzin (GYG). Dies steht im Einklang damit, dass HCN-Kanäle einen Kaliumstrom leiten. Überraschenderweise ist die Selektivität jedoch nicht so hoch wie bei anderen Kaliumkanälen. HCN-Kanäle besitzen lediglich eine viermal höhere Permeabilität für Kalium als für Natrium. Der Verschluss der Pore wird durch die innere der beiden Helices (S6-Helix) gebildet und als „Gate“ bezeichnet. Im Inneren der S6-Helix besitzt der Ionenkanal ein Glyzin, das als Scharnier fungiert, an dem der Kanal aufgeklappt werden kann. Das Hin- und Herschalten zwischen dem offenen und geschlossenen Zustand wird als „Gating“ bezeichnet.



Dieser Prozess wird durch separate Proteinmodule kontrolliert, die als „Gating-Domänen“ bezeichnet werden (MacKinnon 2004). HCN-Kanäle besitzen zwei wichtige „Gating-Domänen“, die Spannungssensoren (S1-S4, VSD: voltage sensing domain) und die cAMP-Bindungsstellen (CNBD: cyclic nucleotide binding domain) (Zagotta et al. 2003).

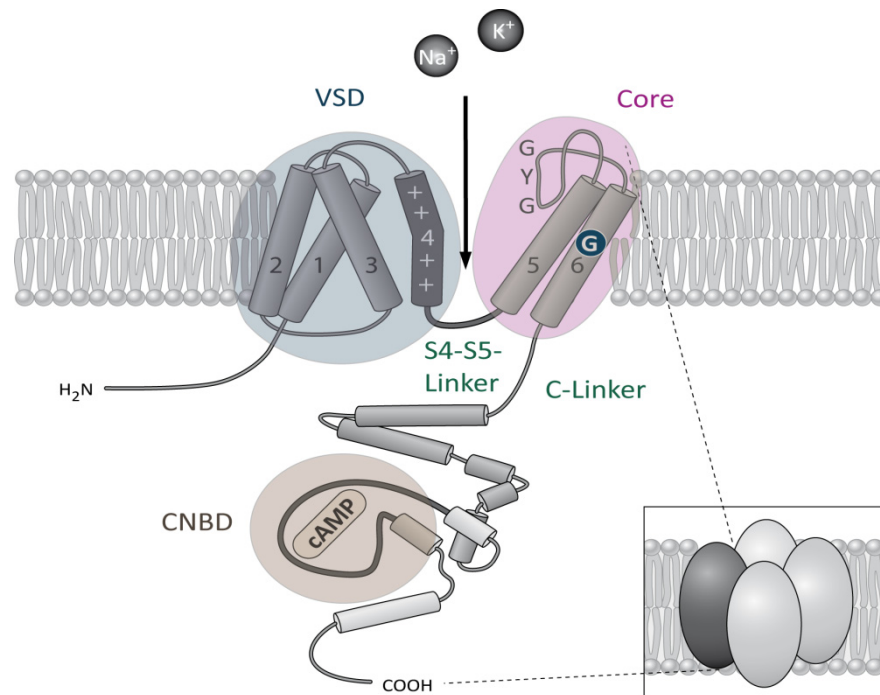


Abb. 1 Schematisches Modell einer HCN-Kanal Untereinheit. Eine Untereinheit besteht aus sechs  $\alpha$ -helikalen Transmembransegmenten die mit 1-6 nummeriert sind und den intrazellulär gelegenen N- und C-Termini. Die Poreneinheit (S5-S6, Core) enthält den Selektivitätsfilter (GYG). Im Inneren der S6-Helix besitzt der Ionenkanal ein Glyzin (G) das als Scharnier fungiert, an dem der Kanal aufgeklappt werden kann („Gate“). Der Spannungssensor befindet sich in S1-S4 (VSD, voltage sensing domain). Über den S4-S5-Linker werden Bewegungen des Spannungssensors auf das „Gate“ übertragen. Der C-Terminus enthält eine Zyklonukleotidbindungsdomäne (CNBD). Bindung von cAMP führt zu einer Konformationsänderung, die über den C-Linker auf das „Gate“ übertragen wird.

Spannungssensoren tragen mehrere positiv geladene Aminosäuren wie Arginin und Lysin (Jiang et al. 2003; Long et al. 2005; Long et al. 2005) und sind Bestandteil aller spannungsabhängigen Kanäle der Pore-Loop Kationenkanal-Superfamilie (Yu and Catterall 2004). Bei Änderung der Membranspannung bewegen sich die Spannungssensoren innerhalb der Membran. Durch Hyperpolarisation bewegen sie sich nach innen, durch Depolarisation nach außen. Diese spannungsabhängigen Bewegungen werden über den S4-S5-Linker auf den Verschluss-Mechanismus in der S6-Helix übertragen und können das „Gate“ auf- und zuziehen.

Hyperpolarisation bewegt den Spannungssensor nach innen und öffnet bei HCN-Kanälen das „Gate“, Depolarisation bewegt ihn nach außen und schließt es. Bei anderen Kationenkanälen ist die Kopplung von spannungsabhängiger Bewegung und Öffnen und Schließen genau umgekehrt. Kv-Kanäle werden beispielsweise durch Hyperpolarisation geschlossen (Mannikko et al. 2002). Die strukturelle Grundlage für diese gegensätzliche Kopplung ist bisher nicht geklärt.

Die cAMP-Bindungsstelle ist im C-Terminus der HCN Kanäle lokalisiert (Zagotta et al. 2003). Die Bindung des Liganden verursacht eine Konformationsänderung, die über den C-Linker auf das „Gate“ übertragen wird. cAMP kann den Kanal jedoch nicht ohne eine zusätzliche Hyperpolarisation öffnen. Es erleichtert lediglich die Kanalöffnung, indem es die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung zu positiveren Potentialen verschiebt (DiFrancesco and Tortora 1991).

Die beiden Gating-Domänen sind verantwortlich für die auffälligste funktionelle Eigenschaft der Schrittmacherkanäle, die duale Aktivierung. Die Aktivierung ist ein kombinierter Prozess, der sich aus einer Spannungs- und einer Liganden (cAMP)-abhängigen Komponente zusammensetzt (DiFrancesco and Tortora 1991; Ludwig et al. 1998; Wainger et al. 2001).

Die Funktion von  $I_h$  ist besonders eingehend im Sinusknoten des Herzens untersucht worden. Gemeinsam mit anderen Strömen ist  $I_h$  an der Generierung des autonomen Herzschlags beteiligt. In Abbildung 2C sind Aktionspotentiale von Schrittmacherzellen gezeigt. Daraus ist ersichtlich, dass das Membranpotential am Ende der Repolarisation nicht konstant bleibt. Es kommt bei negativen Membranpotentialen durch die Aktivierung von  $I_h$  zu einer langsamen diastolischen Depolarisation (Abb. 2C, D). Diese Phase ist die Schlüsselphase für die spontane Entstehung von Aktionspotentialen im Sinusknoten und damit für den autonomen Herzschlag. Wird durch die langsame Depolarisation das Schwellenpotential erreicht, an dem T- und L-Typ Calciumkanäle aktiviert werden, entsteht das nächste Aktionspotential und der Zyklus wiederholt sich.

Durch das autonome Nervensystem kann dieser Prozess moduliert werden, z.B. führt eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation über ein  $G_s$ -Protein zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Dadurch erhöht sich die Aktivierungsgeschwindigkeit der HCN-Kanäle (Abb. 2D), ihre Aktivierungskurve wird zu positiveren Potentialen verschoben (Abb. 2E) und die Geschwindigkeit der langsamen diastolischen Depolarisation nimmt zu. Dies führt zu einer Erhöhung der Herzfrequenz.

Die  $I_h$ -Kanäle sind von großer Bedeutung für die autonome Regulation der Herzfrequenz. Es gibt jedoch Evidenzen, dass sie nicht die einzigen Ionenkanäle sind, die an dieser Regulation beteiligt sind (Stieber et al. 2004).

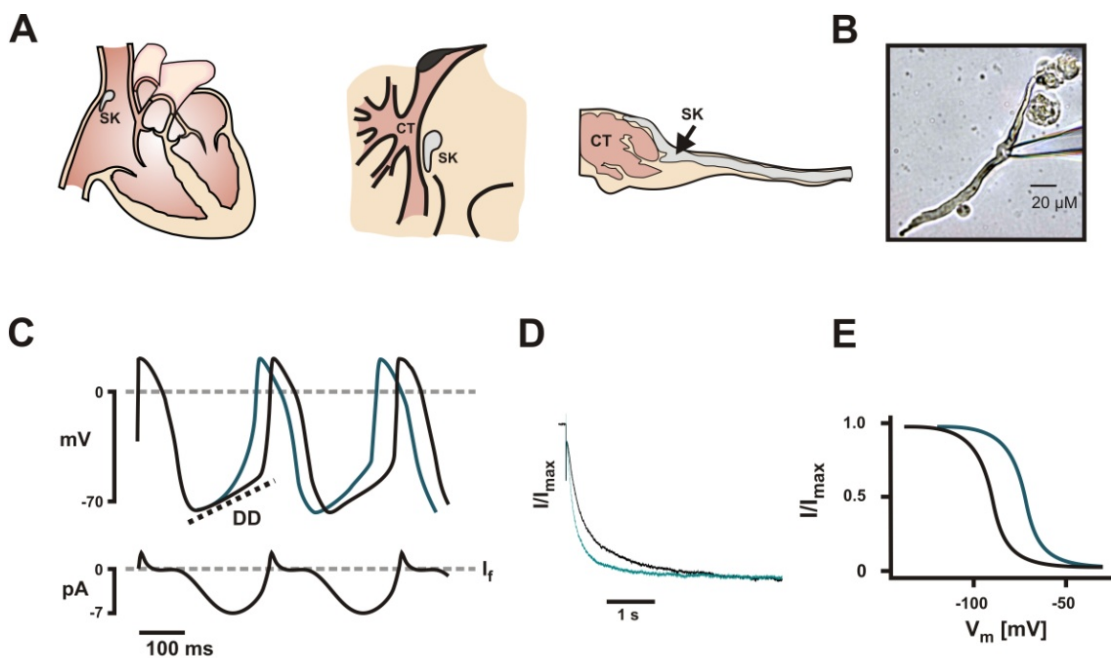


Abb. 2 Rolle von  $I_h$  bei der Generierung von Schrittmacherpotentialen. (A) Anatomie und Lage des Sinusknotens (SK: Sinusknoten, grau; CT: Crista terminalis). (B) Isolierte Sinusknotenzelle mit Patch-Pipette. (C) Oben: Schrittmacherpotentiale von Sinusknotenzellen ohne (schwarz) und mit (grün) adrenerger Stimulation. Die diastolische Depolarisation (DD) wird durch adrenerge Stimulation beschleunigt. Unten: Zeitlicher Verlauf der  $I_h$ -Stromamplitude in Sinusknotenzellen. (D) HCN-Kanäle in Sinusknotenzellen öffnen langsam bei Hyperpolarisation und leiten einen Einwärtsstrom (schwarz). Durch cAMP wird die Aktivierungskinetik beschleunigt (grün). (E) Steady-State Aktivierungskurve (schwarz). Durch cAMP wird die Aktivierungskurve zu positiveren Potentialen verschoben (grün).

Die Funktion von HCN2 und HCN4 im Sinusknoten wurde bereits intensiv unter Verwendung von KO-Modellen beforscht. In allen bis jetzt untersuchten Spezies ist HCN4 die vorherrschende Isoform in Sinusknotenzellen und hat einen Anteil von ungefähr 80% an  $I_h$ . Die restliche Fraktion des Stromes ist stark Spezies-abhängig. In Mäusen und Menschen wird sie hauptsächlich durch HCN2 getragen (Ludwig et al. 2003; Thollon et al. 2007), in Kaninchen von HCN1 (Shi et al. 1999).

Entsprechend der hohen Expression von HCN4 in Sinusknotenzellen, haben HCN4-KO Mäuse einen ausgeprägten kardialen Phänotyp. Sowohl der globale als auch der herzspezifische Knockout des HCN4-Gens sind embryonal letal nach 9-11 Tagen (Stieber et al. 2003). KO-Herzen, die aus Embryonen vor Tag 9 isoliert wurden, waren anatomisch normal entwickelt aber kontrahierten langsamer als Wildtyp-Herzen. Zugabe von cAMP zu den isolierten Herzen bewirkte nur bei Wildtyp-Herzen eine Beschleunigung des Herzschlags. Bei der Isolierung von Kardiomyozyten aus embryonalen KO-Herzen konnten im Gegensatz zu Wildtyp-Herzen keine Zellen gefunden werden, die in der Lage waren Schrittmacherpotentiale zu generieren. Die  $I_h$ -Stromdichte an diesen isolierten HCN4-defizienten Herzzellen war um 85% reduziert.

Ein induzierter Knockout des HCN4-Gens in adulten Mäusen führte im Vergleich zum globalen Knockout zu einem relativ milden Phänotyp. Die Mäuse hatten eine normale basale Herzfrequenz. Jedoch kam es unter Ruhefrequenzen zu Sinuspausen (Abb. 3B). Bei spontaner Aktivität oder pharmakologischer Stimulation mit Isoprenalin (Abb. 3A) verringerte sich die Anzahl der Sinuspausen (Stieber et al. 2006; Herrmann et al. 2007).

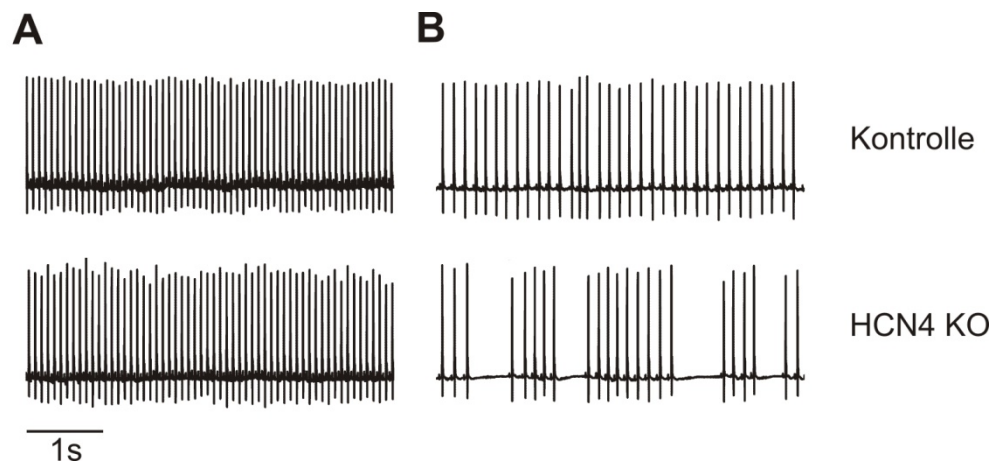


Abb. 3 Sinuspausen und Modulation der Herzfrequenz in adulten HCN4 KO-Mäusen. (A) Repräsentatives EKG einer Kontroll-Maus und einer HCN4 KO-Maus 0,5 h nach Isoprenalin-Injektion. (B) EKG einer Kontroll-Maus und einer HCN4 KO-Maus 1,5 h nach Isoprenalin-Injektion. In KO-Mäusen treten Sinuspausen besonders in der Übergangsphase von stimulierten zu basalen Herzfrequenzen auf.

Bestimmte Mutationen im HCN4-Gen des Menschen führen zu einer erblichen Dysfunktion der Kanäle, die als Channelopathien bezeichnet werden. Vier heterozygote HCN4-Mutationen wurden soweit identifiziert (Abb. 4). Die Mutationen führen zu einem Verlust der cAMP-abhängigen Modulation (573X; (Schulze-Bahr et al. 2003)), einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung zu negativeren Potentialen (S672R und G480R; (Ueda et al. 2004; Milanesi et al. 2006; Nof et al. 2007)) oder zu einer Verringerung der Zelloberflächen-Expression (D553R; (Ueda et al. 2004)). Interessanterweise leiden alle Patienten, die eine der genannten Mutationen tragen, unter einer Bradykardie. Dieser Phänotyp konnte nicht bei adulten HCN4-defizienten Mäusen beobachtet werden.

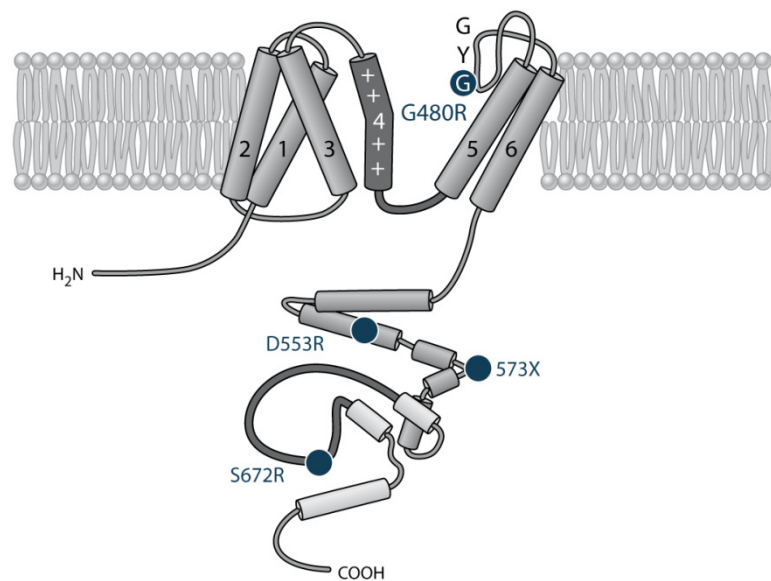


Abb. 4 Mutationen im HCN4-Gen des Menschen. Die Lokalisation der vier Mutationen ist durch grüne Kreise gekennzeichnet. Die Mutationen führen zu einem Verlust der cAMP-abhängigen Modulation (573X), einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung zu negativeren Potentialen (S672R und G480R) oder zu einer Verringerung der Zelloberflächen-Expression (D553R).

Mäuse mit einem globalen oder herzspezifischen Knockout des HCN2-Gens zeigen ein variierendes Zeitintervall zwischen den einzelnen Schlägen, eine sogenannte Sinus-Dysrhythmie (Abb. 5) (Ludwig et al. 2003). Die mittlere Ruhefrequenz und die autonome Regulation der Herzfrequenz sind jedoch nicht beeinträchtigt. In isolierten HCN2 KO-Sinusknotenzellen ist  $I_h$  um ca. 30% reduziert.

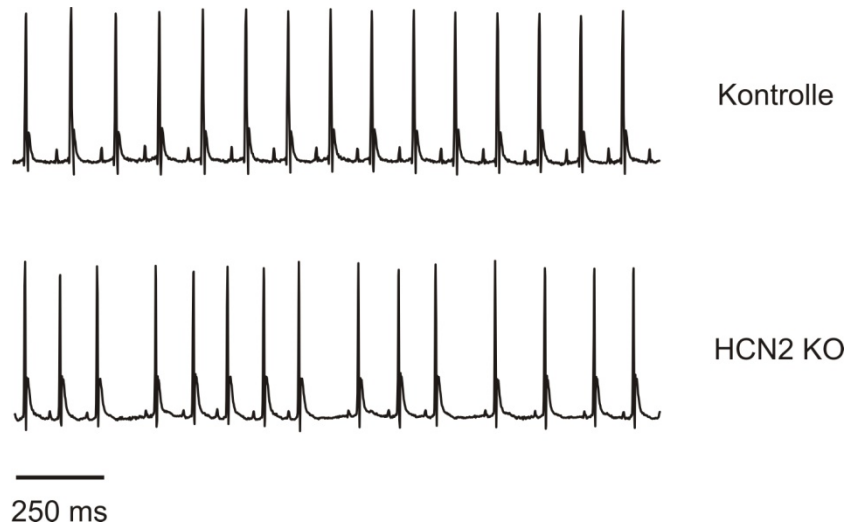


Abb. 5 Sinus-Dysrhythmie HCN2-defizienter Mäuse. Repräsentatives EKG einer Kontroll-Maus und einer HCN2-KO Maus. KO-Mäuse zeigen eine milde Sinus-Dysrhythmie, die durch variierende Zeitintervalle zwischen den einzelnen Schlägen gekennzeichnet ist.

Während die Funktion der HCN-Kanäle im Sinusknoten und Reizleitungssystem des Herzens gut untersucht wurde, ist über ihre physiologische Relevanz im Herzmuskel sehr wenig bekannt. Bis jetzt gibt es nur wenige Studien die sich mit  $I_h$  in Ventrikelzellen befassen. Diese Arbeiten konzentrierten sich meist auf die Bedeutung der Kanäle in Ratten-Modellen für Hypertrophie und Herzinsuffizienz (Hoppe et al. 1998; Hiramatsu et al. 2002; Cerbai and Mugelli 2006; Herrmann et al. 2007). Unter beiden pathologischen Bedingungen kommt es zu einer erhöhten Expression der HCN-Kanäle in ventrikulären Zellen und dadurch zu spontaner Zellaktivität, die zu ventrikulären Arrhythmien und plötzlichem Herztod führen können.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Der HCN3-Kanal wurde gleichzeitig mit den anderen drei Vertretern seiner Familie kloniert. Bisher ist über seine Funktion fast nichts bekannt. Nur zwei Publikationen über seine biophysikalischen Eigenschaften in Expressionssystemen (Mistrik et al. 2005; Stieber et al. 2005) sind erschienen. Auch zu seiner physiologischen Funktion gibt es nur zwei Publikationen die zum Einen zeigen, dass der Kanal für die Generierung von Schrittmacherpotentialen im Ureter der Maus wichtig ist (Hurtado et al. 2010) und zum Anderen bei der Parkinson-Krankheit die Erregbarkeit von Neuronen moduliert (Meurers et al. 2009).

Da in früheren Arbeiten HCN3 auf Transkriptebene (RT-PCR) im Ventrikel der Maus nachgewiesen werden konnte, sollte im Rahmen dieser Arbeit der kardiale Phänotyp einer HCN3-defizienten Mauslinie untersucht werden. Die Expression des Kanals wurde in verschiedenen Arealen des Herzens auf RNA- und Proteinebene untersucht. Um die Funktion im Herzmuskel aufzuklären wurden EKGs an Wildtyp- und HCN3 KO-Mäusen *in vivo* aufgenommen und Aktionspotentiale an isolierten epikardialen und endokardialen Ventrikelzellen gemessen. Da  $I_h$  bisher noch nicht an Arbeitsmyokardzellen von adulten Mäusen gemessen werden konnte wurde eine Methode etabliert um diesen Strom messen zu können. Die Ergebnisse aus Experimenten mit Kardiomyozyten sollten zusätzlich durch die biophysikalische Charakterisierung des HCN3 Kanals in Expressionssystemen untermauert werden. Hierfür wurde eine stabile Zelllinie generiert, die eine starke HCN3-Expression aufweist.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck, Roth, Sigma-Aldrich, Roche und Biorad in den Qualitäten „pro analysi“ oder „für molekularbiologische Zwecke“ bezogen. Zur Herstellung sämtlicher Lösungen wurde hochreines entionisiertes Wasser (Reinstwassersystem Easypure UV/UF, Werner GmbH) verwendet. Lösungen für sehr sensitive Anwendungen (z. B. PCR, Zellkultur, RNA-Methoden) oder Lösungen, die über längere Zeit gelagert werden sollten, wurden autoklaviert.

#### 3.2 Verwendete Mauslinie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mäuse verwendet, bei denen das HCN3-Gen mittels einer Cre/loxP -basierten Strategie deletiert wurde. Zur Deletion wurde das Exon 2 ausgewählt, welches für die Transmembransegmente 1-4 kodiert. Das Spleißen von Exon 1 auf Exon 3 führt zu einer Verschiebung des Leserahmens, der zu einem Stopcodon am Anfang des Exon 3 führt und damit die Translation beendet (Mader et al. 2003). Die Maushaltung erfolgte gemäß den gesetzlichen Richtlinien. Bei den verwendeten Versuchstieren handelte es sich um Tiere, die aus homo- oder heterozygoten Zuchten entstammten. Sie wurden mit einem genetisch gemischtem Hintergrund aus den Stämmen 129SvJ und C57-BI6/N gezüchtet. Die Tiere erhielten Futter (Haltungsfutter: R/M-H; Zuchtfutter: M-Z Extrudat, Ssniff) und Wasser ad libitum und lebten in einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus.

### 3.3 Arbeiten mit DNA

Die angewandten molekularbiologischen Arbeiten richten sich größtenteils nach den Vorschriften aus dem Laborhandbuch Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook und Russell 2001).

#### 3.3.1 Isolierung genomischer DNA für die Genotypisierung

Die Gewebeprobe (Zeh oder Schwanzspitze der Maus) wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäßen in 100 µl Proteinase K-Mix (98 µl Proteinase K-Puffer und 2 µl Proteinase K (20 mg/ml, Roche)) bei 55°C und rpm in einem Thermomixer (Eppendorf) über Nacht inkubiert. Danach wurde eine 20 minütige Denaturierung der Proteinase K bei 99°C durchgeführt. Die Gewebelysate wurden bis zu ihrer Verwendung bei 4°C gelagert.

<b>Proteinase K-Puffer</b>	
Tris	100 mM
EDTA	5 mM
SDS	0,2
NaCl	200,0 mM

#### 3.3.2 Amplifikation der DNA - Polymerasekettenreaktion

Zur Bestimmung des Genotyps der in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien (Wildtyp, HCN3 KO) wurde eine Multiplex-PCR durchgeführt, das heißt, dass in einer Reaktion mehrere Primerpaare gleichzeitig vorliegen. In diesem Fall wurden pro Reaktion 3 Primer benutzt, einer davon konnte mit jedem der beiden anderen ein spezifisches Fragment erzeugen.

PCR-Ansatz		dNTP-Stammlösung 1,25 mM	
Primer 1	2,5 µl	dGTP (100 mM)	10 µl
Primer 2	2,5 µl	dATP (100 mM)	10 µl
Primer 3	2,5 µl	dTTP (100 mM)	10 µl
10x PCR-Puffer (	5 µl	dCTP (100 mM)	10 µl
dNTP-Stammlösung	8 µl	H <sub>2</sub> O	ad 800 µl
TAQ	0.5 µl		
Genomische DNA	4 µl		
H <sub>2</sub> O ad 50 µl			

PCR-Protokoll			
(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	

### 3.3.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Aufgrund der negativen Ladungen der Phosphatreste der Nukleinsäuren lässt sich DNA im elektrischen Feld auf einem Gel der Größe nach auftrennen. Die Porengröße des Gels bestimmt dabei die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen DNA-Fragmente. Größere Fragmente bewegen sich langsamer als kleine. Durch Interkalation des fluoreszierenden Farbstoffes Ethidiumbromid können die aufgetrennten DNA-Banden im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Ein zum Vergleich auf das Gel aufgetragener Standard, der DNA-Fragmente mit bekannter Größe enthält, ermöglicht die Abschätzung der Größe der Banden. Je nach Fragmentgröße wurde entweder die Agarose-Gelelektrophorese oder Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt.

### 3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten die größer als 300 bp waren wurden in der Regel Agarosegele in einer Konzentration von 0,7% bis 2,0% Agarose in TBE eingesetzt, wobei für kleinere Fragmente höherprozentige Gele als für größere Fragmente verwendet wurden. Die Auftrennung erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern bei 135 V, als Laufpuffer diente TBE. Der verwendete Gel-Ladepuffer (6x Dye) enthält die beiden Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol, die auch im Gel migrieren, sodass der Verlauf der Elektrophorese verfolgt werden kann. Mit Ethidiumbromid, das nach dem Aufkochen der Agarose in einer Konzentration von 800 ng/ml zugegeben wurde (Stammlösung 10 mg/ml), konnte die DNA unter UV-Licht (Gel Doc 2000, Biorad) sichtbar gemacht werden. Zum Größenvergleich wurde ein DNA-Standard aufgetragen (1 kb DNA Ladder, Invitrogen).

Gel-Ladepuffer (6x Dye)		10x TBE	
10x TBE	60 %	Tris HCl	0,9 M
Ficoll Typ 400	18 %	Borsäure	0,9 M
EDTA pH 8,0	0,12 mM	EDTA pH 8,0	20 mM
Bromphenolblau	0,15 %		
Xylencyanol FF	0,15 %		

### 3.3.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

DNA-Fragmente die kleiner als 300 bp waren wurden meist mittels 5% PAGE-Gelen aufgetrennt, da diese Gele bei kleinen DNA-Fragmenten eine besonders gute Auftrennung erzielen. Es wurden Gele der Dicke 0,75 mm mit jeweils 15 cm Laufstrecke verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Kammern für 10 min bei 100 V, dann 30-50 min bei 260 V. Als Laufpuffer diente TBE. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 10 min in 800 ng/ml Ethidiumbromidlösung gefärbt und anschließend überschüssiges Ethidiumbromid mit Wasser abgewaschen.

<b>PAGE-Gel 5%</b>	
Rotiphorese Gel 40 (Roth)	3,75 ml
10x TBE	3 ml
H <sub>2</sub> O	ad 30 ml
TEMED	20 µl
APS 20%	70 µl

### 3.3.6 Quantifizierung von DNA

Die Konzentration von wässrigen DNA-Proben wurde photometrisch (BioPhotometer, Eppendorf) bei einer Absorption von 260 nm ermittelt. Die optische Dichte (OD<sub>260</sub>) von 1 entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm einer DNA-Menge von 50 µg/µl (dsDNA).

### 3.4 Arbeiten mit RNA

Eine wichtige Voraussetzung für das Arbeiten mit RNA ist, die Kontamination mit RNasen zu vermeiden. RNasen sind fast überall vorkommende extrem stabile RNA-abbauende Enzyme, die sogar durch Autoklavieren bei 121°C nicht völlig zerstört werden. Um Glaswaren von RNasen zu befreien, wurden diese für 2 h bei 200°C gebacken. Wasser wurde durch die Zugabe von 0,01% DEPC und ca. 16 h Einwirkzeit RNase-frei gemacht. Durch zweimaliges Autoklavieren im Anschluss zersetzte sich das DEPC. Die Arbeitsfläche und sonstige Geräte wurden mit RNaseAWAY (M&P Molecular Bio Products) behandelt. Plastikwaren wie Eppendorfggefäße und Pipettenspitzen wurden aus frischen Packungen entnommen.

#### 3.4.1 Isolation von Poly-A-RNA aus Gewebe

Nach zervikaler Dislokation wurde aus den toten Tieren das entsprechende Gewebe isoliert, in ein Eppendorfggefäß überführt und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Proben wurden innerhalb von 20 Minuten weiter verwendet. Für die Isolation aus Hirngewebe wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Für Herzgewebe wurde das RNeasy Micro Kit (Qiagen) verwendet. Die Homogenisation der Proben erfolgte unter Verwendung eines Ultra-Turrax.

#### 3.4.2 Quantifizierung von RNA

Die Konzentration von wässrigen RNA-Lösungen wurde photometrisch (BioPhotometer, Eppendorf) bei einer Absorption von 260 nm ermittelt. Die optische Dichte (OD260) von 1 entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm einer Konzentration von 40 µg/µl ssRNA. Die Reinheit der RNA wurde anhand des A260/A280-Quotienten eingeschätzt.

### 3.4.3 RT-PCR

Die Synthese der cDNA erfolgte mit dem SuperScript III-One-Step Kit (Invitrogen) nach Vorschrift des Herstellers. Bei diesem System werden die Reverse Transkriptase und die DNA-Polymerase zusammen zugegeben. Die cDNA-Synthese und anschließende Amplifikation der cDNA laufen nacheinander ab, ohne dass weitere Reagenzien zugegeben werden müssen. Die Polymerase ist anfangs durch Antikörper blockiert, die nach der cDNA-Synthese durch Erhitzen denaturiert werden, so dass die Polymerase aktiv werden kann. Eingesetzt wurden immer genspezifische Primer, die sich an verschiedenen Exons anlagerten, um eine Amplifikation genomischer DNA auszuschließen. Der cDNA-Synthese-Schritt bestand aus einer 30-minütigen Inkubation bei 50°C. Die Primeranlagerungstemperatur und Synthesezeit richteten sich nach den eingesetzten Primern bzw. der Länge des Produkts. Die amplifizierte DNA wurde auf PAGE-Gelen aufgetrennt und visualisiert. Die verwendeten Primer und RT-PCR Protokolle befinden sich im Anhang.

### 3.5 Arbeiten mit Proteinen

#### 3.5.1 Proteinisolation aus Gehirn-Gewebe

Das Gehirn wurde in Ethanol/Trockeneis schockgefroren und in einem auf Trockeneis vorgekühlten Mörser zermahlen. Das pulverisierte Gewebe wurde in 1 ml Lysepuffer (2 % SDS, 50 mM TRIS) für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert und das Gewebe anschließend abzentrifugiert (5 min, 16,000 × g). Die Protein-Lysate wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### 3.5.2 Quantifizierung von Proteinen

Der Proteingehalt wurde mittels der Bradford-Methode bestimmt. Hierzu wurde eine Standardreihe von 1-30 µg Protein (BSA, bovines Serum Albumin) in je 100 µl 0,15 M NaCl nach Zugabe von je 1 ml Coomassie Lösung erstellt. Nach einer Minute bei RT wurde die Absorption bei 595 nm vermessen (Eppendorf Bio Photometer). Die Proteinproben wurden vermessen und vom Photometer anhand der Standardreihe quantifiziert.

<b>Coomassie Lösung</b>	
Coomassie brilliant blue G250	50 mg
EtOH 95%	25 ml
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	50 ml
H <sub>2</sub> O	ad 500

#### 3.5.3 SDS-PAGE und Western-Blot

SDS-Polyacrylamid-Gele ermöglichen die Auftrennung denaturierter Proteingemische nach deren Größe und unabhängig von der Ladung. Während der Elektrophorese umgeben die Sulfatgruppen der SDS-Moleküle mit ihrer negativen Ladung die denaturierten Proteine, überkompensieren so die Eigenladung der Proteine und bewirken eine Wanderung der Proteine im elektrischen Feld. Die Denaturierung erfolgt durch eine fünfminütige Inkubation in Lämmli-Probenpuffer mit DTT bei 97°C Die Proteine wurde in einer Elektrophoreseapparatur (Protean 3, Biorad) bei 100 V aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der Benchmark Protein Ladder (Invitrogen) aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Proteine mit einem Tank-Blot-System (Mini Trans Blot,



Biorad) elektrophoretisch vom Gel auf eine mit Methanol äquilibrierte PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) übertragen. Der Transfer wurde in vorgekühltem Transferpuffer für eine Stunde bei 100 V und maximal 300 mA durchgeführt. Die Membran wurde anschließend getrocknet, um die Proteinbindung zu erhöhen, in Methanol wieder äquilibriert und die Proteinbanden mit Ponceau-S-Lösung gefärbt. Die Banden des Standards wurden mit Bleistift markiert. Die Membran wurde für 1 Stunde in Blockierungslösung bei 4 °C geschwenkt. Nach Waschen mit TBST wurde die Membran mit dem primären Antikörper in TBST und 2 % Milchpulver über Nacht bei 4°C inkubiert. Der  $\alpha$ -HCN3 Antikörper (Gramsch Laboratories) wurde in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet, der  $\alpha$ -Tubulin-Antikörper (Dianova) in einer Verdünnung von 1:4000. Auf drei Waschschritten in TBST folgte die Inkubation mit dem entsprechenden sekundären, peroxidasegekoppelten Antikörper für eine Stunde. Nach drei weiteren Waschschrritten wurden die Antikörper mit Hilfe des ECL-Kits (Amersham) durch Chemolumineszenz detektiert. Die Filme zur Detektion der Chemilumineszenz (Hyperfilm ECL, Amersham) wurden mit einer Filmentwicklermaschine (Curix 60, Agfa) entwickelt.

<b>10x TBS</b>		<b>TBST</b>	
Tris	12,1 g	Tween 20	0,1 %
NaCl	80,23 g	in 1x TBS	
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml		
pH 8,0			

<b>6x Probenpuffer (Lämmli) mit DTT</b>		<b>10x Elektrophoresepuffer</b>	
Tris-Cl/SDS pH 6,8	7 ml	Tris	30,2 g
Glycerol	3 ml	Glycin	144 g
SDS	1 g	SDS	10 g
DTT	0,93 g	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
Bromphenolblau	1,2 mg		
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml		

<b>4x Sammelgelpuffer</b>		<b>4 x Trenngelpuffer</b>	
Tris	0,5 M	Tris	1,5 M
SDS	0,4 %	SDS	0,4 %
pH 6,8		pH 8,8	

<b>Sammelgel</b>		<b>Trenngel 7%</b>	
PAGE-Stammlösung	0,65 ml	PAGE-Stammlösung	0,65 ml
4x Sammelgelpuffer	1,25 ml	4x Sammelgelpuffer	1,25 ml
H <sub>2</sub> O	3,05 ml	H <sub>2</sub> O	3,05 ml
20% APS	25 µl	20% APS	25 µl
TEMED	5 µl	TEMED	5 µl

<b>Ponceau-S-Lösung</b>		<b>Blockierungslösung</b>	
Ponceau S	0,5 g	Milchpulver	5 %
Eisessig	1 ml	in 1x TBST	
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml		

---

<b>Transferpuffer</b>		<b>Coomassie-Gelfärbungs-Lösung</b>	
Tris Elektrophorese-	3,03 g	Coomassie brilliant blue	0,006 %
Glycin	14,4	Eisessig	10 %
Methanol	200 ml	H <sub>2</sub> O	90 %
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml		
pH 8,3			

---

---

<b>PAGE-Stammlösung</b>		<b>Fixierlösung</b>	
Rotiphorese Gel 30		Isopropanol	25 %
Acrylamid	30 %	Eisessig	10 %
Bisacrylamid	0,8 %	H <sub>2</sub> O	65 %

---

### 3.6 Histochemie

#### 3.6.1 Herstellung von Paraffin-Gewebeschnitten

Die Herzen von 12 Wochen alten Mäusen wurden über Nacht in 4% Paraformaldehyd (PFA) bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Herzen mit VE-Wasser gespült und über eine Ethanolreihe dehydriert und in 3 aufeinanderfolgenden Paraffinbädern eingebettet. Die eingebetteten Herzen wurden mit einem Microtom (HM 335 E, Microm) in einer Dicke von 6 µm geschnitten und im Wasserbad bei 42°C auf Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden zuerst für 30 Minuten bei Raumtemperatur und dann über Nacht bei 40°C getrocknet.

<b>Ethanolreihe und Paraffinbäder</b>	
Ethanol 50 %	kurz
Ethanol 50 %	3x 20 min
Ethanol 70 %	3x 20 min
Ethanol 95 %	3x 20 min
Ethanol 100 %	3x 20 min
Xylol	kurz
Xylol	3x 10 min
Paraffin I	60 min
Paraffin II	60 min
Paraffin III	60 min

#### 3.6.2 Herstellung von Cryo-Gewebeschnitten

Die isolierten Herzen von 12 Wochen alten Mäusen wurden über Nacht in 30% Sucrose eingelegt und am nächsten Tag auf Trockeneis in Tissue-Tek O.C.T Compound (Sakura Finetech) eingebettet. Die eingebetteten Gewebe wurden mit einem Kryotom, (HM-500, Microm) in einer Dicke von 14 µm geschnitten und auf Glas-Objektträger (SuperFrost Plus, Fa. Menzel) geschmolzen. Die Objektträger wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und bei -20 °C gelagert.

### 3.6.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hämatoxylin färbt alle sauren Strukturen blau, insbesondere Zellkerne mit der darin enthaltenen DNA und das mit Ribosomen angereicherte raue endoplasmatische Retikulum. Eosin ist ein synthetischer saurer Farbstoff und färbt alle basischen (eosinophilen) Strukturen rot, was vor allem die Zellplasmaproteine umfasst. Paraffinschnitte wurden vor der HE-Färbung mit Xylol entparaffinisiert und anschließend mit einer Ethanolreihe rehydriert. Cryoschnitte wurden mit Paraformaldehyd auf Eis fixiert. Die Färbung erfolgte mit Mayers Hämalaunlösung (Merck), welche 1:5 mit Wasser verdünnt wurde. Nach der Färbung wurden die Schnitte mit Entellan Neu Mounting Medium (Merck) und einem Deckglas luftdicht versiegelt.

Parafinschnitte		HE-Färbung	
Xylol I	5 min	Mayer's Hämalaun	3-8 min
Xylol II	5 min	Leitungswasser	spülen
Ethanol 100%	3 min	VE-H <sub>2</sub> O	kurz
Ethanol 100%	3 min	Eosin G 1% in H <sub>2</sub> O	3 min
Ethanol 96%	3 min	VE-H <sub>2</sub> O	kurz
Ethanol 90%	3 min	Ethanol 96%	2 min
Ethanol 80%	3 min	Ethanol 100%	3 min
Ethanol 70%	3 min	Xylol I	5 min
VE-H <sub>2</sub> O	3 min	Xylol II	5 min

Cryoschnitte	
4% PFA in 0,1 M PB	10 min
PBS	5 min
VE-H <sub>2</sub> O	5 min

### 3.6.4 Immunhistochemie

Die Cryo-Gewebeschnitte wurden mit PBS rehydriert und mit Dent's fixative (1 Teil DMSO, 4 Teile MeOH) oder 4% PFA fixiert. Permeabilisierung und Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde mit 0.3% Triton X-100 und 10 % CHEMIBLOCKER (Millipore) in PBS für 1 Stunde durchgeführt. Die Schnitte wurden über Nacht mit  $\alpha$ -HCN3 Antikörper (1:1000 in PBS mit 5% ChemiBlocker, 4 °C) inkubiert. Vor der Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Peroxidase-konjugierter donkey  $\alpha$ -rabbit, 1:1000, Jackson Immunoresearch, USA), in Kombination mit Cy-3 Tyramid-Signal Amplifikation (TSA Plus Cy-3 System, Perkin Elmer), wurde die endogene Peroxidase-Aktivität mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS für 10 Minuten gequenchet. Mit dem wässrigen Einbett-Medium Permafluor (Beckman-Coulter) wurden die Schnitte eingedeckelt und mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop (Axioskop 2; FluoArc, Zeiss), ausgestattet mit einer CCD-Kamera (MRC; Zeiss), untersucht.

### 3.7 Kultur eukaryotischer Zellen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter einer Sicherheitswerkbank (HERAsafe HS18, Heraeus) durchgeführt, um Kontaminationen der Zellkulturen mit Fremdkeimen zu unterbinden. Innerhalb der Sicherheitswerkbank wurde auf steriles Arbeiten geachtet und Handschuhe, Pipetten, Flaschen etc. vor dem Einbringen in die Werkbank mit 80% Ethanol behandelt. Die verwendeten Medien und Lösungen wurden vor der Verwendung auf 37°C erwärmt.

#### 3.7.1 Verwendete Zelllinien

Zur heterologen Expression von Ionenkanälen kamen in dieser Arbeit zwei verschiedene Zelllinien zum Einsatz. Die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293 (ATTC Nr. CRL-1573), die durch Transfektion mit dem humanen Adenovirus Typ 5 immortalisiert wurde (Graham et al. 1977) und das HEK Flp-Zellsystem (Invitrogen). Die Kultur beider Zelllinien erfolgte in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen im Inkubator bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage passagiert, wenn sie etwa 80% Konfluenz erreicht hatten. Dazu wurden die Zellen, nach einem Waschschrift mit PBS, durch EDTA-Trypsin-Lösung vom Boden der Kulturflasche abgelöst, in Medium resuspendiert, vereinzelt und im Verhältnis von etwa 1:10 passagiert. Alle 3 Wochen wurde ein neuer Gefrierstock aufgetaut (Lagerung -196°C, N<sub>2</sub>) und in Kultur genommen.

PBS		EDTA-Trypsin-Lösung	
NaCl	40,0 g	Trypsin	0,5%
KCl	1,0 g	EDTA	0,2%
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	14,5 g	PBS	ad 100 ml
H <sub>2</sub> O ad	5000 ml		
pH 7,4			

### 3.7.2 Generierung einer stabilen mHCN2 und hHCN4-Zelllinie mittels Elektroporation

Die Elektroporation ist eine physikalische Methode, um DNA in Zellen einzubringen. Die Zellmembran agiert wie ein elektrischer Kondensator und ist undurchlässig für Ströme (ausser durch Ionenkanäle). Durch Anlegen eines pulsierenden elektrischen Feldes wird die Membran an einigen Stellen aufgebrochen und die entstehenden Poren im nm Bereich erlaubten die Diffusion von DNA in das Cytoplasma und den Zellkern (Neumann et al. 1982). Der linearisierte Vektor (hHCN4-pcDNA3 oder mHCN2-pcDNA3) wurde mittels Elektroporation in HEK293 Zellen eingebracht. 48 Stunden nach der Elektroporation wurde G418 (Geneticin) als Selektionsmarker zugegeben. Die einzelnen Klone wurden bis auf 25 cm<sup>2</sup> Flaschen passagiert und Gefrierstocks erstellt.

### 3.7.3 Generierung einer stabilen mHCN3-Zelllinie mittels Flp-In™ 293 Complete System (Invitrogen)

Das Flp-In-System nutzt die FLP-Rekombinase aus *S. cerevisiae* und FLP-vermittelte sequenzspezifische Rekombination um die entsprechende cDNA an einer definierten Stelle in das Genom der Zielzelle zu integrieren (Craig 1988; Sauer 1994). Die Zielzelllinie HEK-Flp™, ist gentechnisch so verändert, dass sie im Genom eine singuläre FRT-Stelle (FLP Recombination Target site) (Zhu and Sadowski 1995) in einem Zeocin-Resistenzgen enthält. Der Plasmid-Vektor pcDNA5/FRT des Flp-In-Systems enthält ebenfalls eine FRT-Stelle, verbunden mit einem Hygromycin-Resistenzgen. Außerdem enthält das Plasmid eine multiple Klonierungsstelle, um die cDNA unter Kontrolle des CMV immediate early Promotors zu klonieren. Bei Co-Transfektion mit dem, FLP-Rekombinase-Expressions-Vektor pOG44 kommt es zur FLP-Expression, und daraufhin zur FLP-Rekombinase-vermittelten Rekombination der FRT-Stelle des pcDNA5/FRT-Konstrukts mit der genomischen FRT-Stelle (O'Gorman et al. 1991). Dadurch wird das pcDNA5/FRT-Konstrukt in das Genom integriert und es kommt zu einem Wechsel von Zeocin-Resistenz zu Hygromycin-Resistenz, so dass Zellen in denen die Rekombination stattgefunden hat mit Hygromycin selektiert werden können. In 35 mm Ø Kulturschalen wurden die Zellen ausgesät und über Nacht ohne Selektionsantibiotikum inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 1,5 µg mHCN3-pcDNA5/FRT-Plasmid und 2,5 µg pOG44-Plasmid transfiziert (Fugene6, Roche). Nach 4 Stunden wurde das Transfektionsreagenz entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Medium ohne Antibiotikum zugefügt. Am folgenden Tag wurden die Zellen trypsinisiert und in T25-Flaschen überführt und es wurde mit der Selektion Hygromycin-resistenter Zellen begonnen. Die einzelnen



Klone wurden bis auf 25 cm<sup>2</sup> Flaschen passagiert und Gefrierstocks erstellt.

#### **3.7.4 Vorbereitung der Zellen für die Elektrophysiologie**

Soweit nicht anders vermerkt wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert und auf Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläser in einer 24-Wellplatte in 1 ml Medium ausgesät.

### 3.8 EKG-Aufzeichnungen

Die Versuchstiere wurden in einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus in Einzelkäfigen gehalten mit freiem Zugang zu Futter und Wasser. Für die Aufzeichnungen wurden den männlichen Tieren (9 Wildtyp, 9 KO) in einem Alter von ca. 5 Monaten EKG-Transmitter implantiert. (TA10ETA-F20, Data Sciences International, DSI). Die Elektroden wurden so platziert, dass die aufgenommenen EKGs ungefähr Ableitung II entsprachen (Abb. 6). Die Daten-Akquisition begann vier Wochen nach Implantation der Transmitter, um den Mäusen Zeit zur Erholung von der Operation zu geben. Die telemetrischen EKG-Signale wurden alle 30 Minuten für 20 Sekunden von der Dataquest A.R.T. Software (DSI) aufgenommen. Zusätzlich wurde auch die Aktivität der Tiere (Bewegung im Käfig) registriert. Die Auswertung der Daten erfolgte offline mit Hilfe der Ponemah EKG Analyse Software (DSI) und Origin 6.1 (OriginLab).

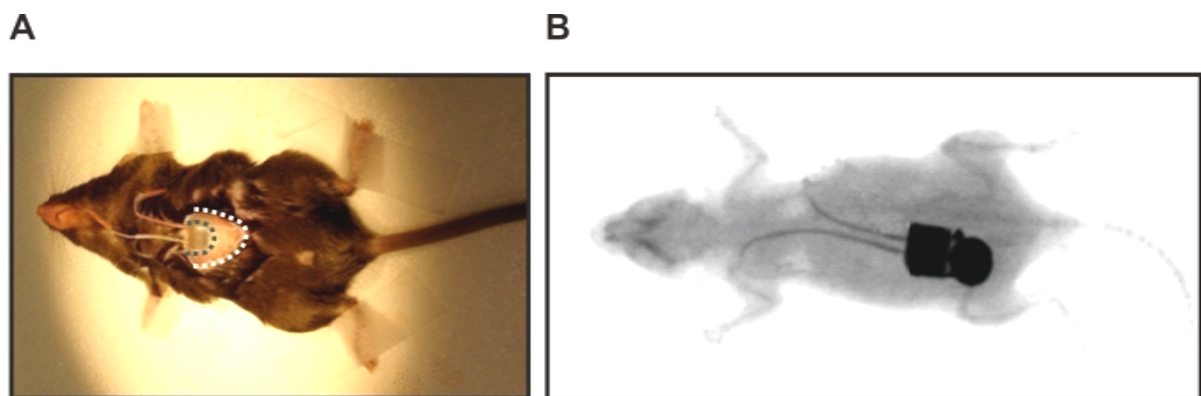


Abb. 6 EKG-Transmitter-Implantation an einer anästhesierten Maus. (A) Durch einen kleinen Schnitt in die Cutis (weiße, gestrichelte Linie) und das Peritoneum (grüne, gestrichelte Linie) wird ein Zugang zur Peritonealhöhle geschaffen. Der EKG-Transmitter wird subperitoneal implantiert. Die Elektroden werden unter der Cutis bis zum Brustmuskel durchgeführt und mit diesem dann vernäht. (B) Röntgenaufnahme einer Maus mit implantiertem EKG-Transmitter. Die Lage der Elektroden entspricht ungefähr Ableitung II.

### 3.9 Isolation von Kardiomyozyten

Verwendet wurden 6-8 Wochen alte, weibliche Versuchstiere aus homozygoten Zuchten. Das Versuchstier wurde durch cervikale Dislokation und anschließendem Durchschneiden der Carotiden getötet. Durch einen Schnitt unterhalb des Sternums wurde das Abdomen bzw. Thorax unter Durchtrennung der Rippen eröffnet. Der Thoraxraum wurde durch laterale Einschnitte unterhalb der Rippenbögen und Einschneiden des Zwerchfells zugänglich gemacht. Das komplette Herz wurde mit einem ca. 3 mm langen Stück Aorta herauspräpariert und in eine mit PBS gefüllte Petrischale überführt (Abb. 7A,C). Die Aorta wurde dann unter einem Mikroskop (Stemi2000, Zeiss) kanüliert (gekürzte 20 gauge-Kanüle, Braun, Abb. 7B) und mit Nahtmaterial fixiert (Seide 5/0 USP, Resorba). Die Kanüle mit dem Herzen wurde an die Langendorff-Apparatur angeschlossen (Abb. 7D). Der erste Perfusionsschritt bestand in einer Spülung des Herzens mit nominell  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Perfusion-Puffer für 4-5 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  (Minipuls3, Gilson; Flußgeschwindigkeit 1,7 ml/min). In einem zweiten Schritt wurde für 25-30 min mit Verdau-Puffer perfundiert (Abb. 7E). Nach dem Verdau hatte das Herz noch seine anatomische Struktur, so dass es möglich war Kardiomyozyten aus definierten Arealen zu isolieren. Zuerst wurde unter einem Mikroskop eine dünne Schicht (~ 200-300  $\mu\text{m}$ , ~ 10-15 Zellschichten; (Brunet et al. 2004)) subepikardialer Zellen des linken Ventrikels isoliert (Abb. 7F). Dann wurde von der Herzbasis in Richtung Herzspitze ein Schnitt entlang des Septums gemacht, der linke Ventrikel vorsichtig geöffnet und eine dünne Schicht subendokardialer Zellen isoliert. Die kleinen Gewebestücke wurden dann in ein 2 ml Eppendorfgesäß mit 1 ml frischem Verdau-Puffer überführt und für weitere 5 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml StopI-Puffer wurde der Verdau gestoppt. Durch auf- und abpipettieren mit einer abgeschnittenen und abgeflamten 1000  $\mu\text{l}$  Pipettenspitze (Eppendorf) wurden die Cardiomyocten mechanisch vereinzelt. Nach 1 min Zentrifugation bei 100g wurde StopI-Puffer entfernt und 2 ml StopII-Puffer zugegeben und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration schrittweise bis zu einer finalen Konzentration von 1 mM erhöht. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in Plating-Medium resuspendiert, auf Laminin-beschichtete Objektträger ausgesät und in einem Brutschrank (HeraCell, Heraeus) bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 2%  $\text{CO}_2$  gelagert. Nach 1 Stunde wurde das Plating-Medium abgesaugt und durch Culture-Medium ersetzt. Die elektrophysiologischen Messungen erfolgten innerhalb von 8 Stunden nach der Isolation.

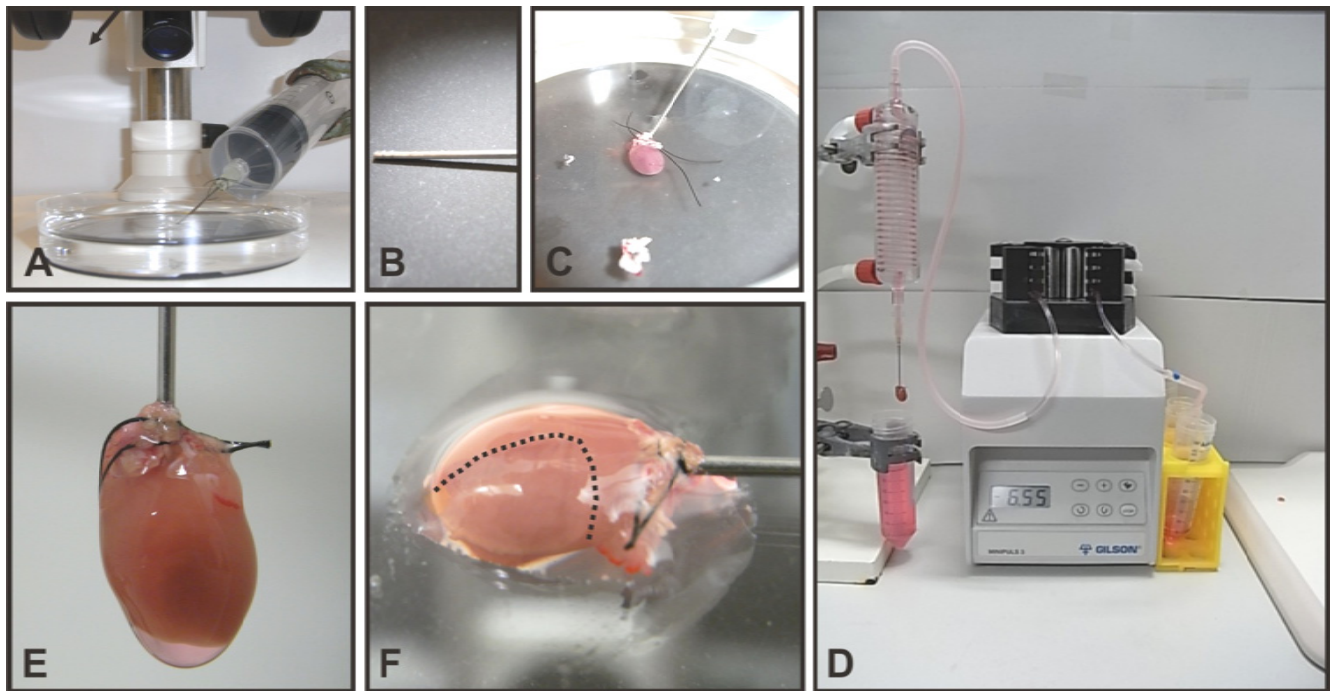


Abb. 7 Aufbau der Apparatur zur Zellisolation und der Langendorff-Perfusion (A) Petrischale mit PBS, platziert unter einem Mikroskop. Eine mit PBS gefüllte Spritze mit Kanüle befestigt an einem Stativ. Die Spitze der Kanüle liegt ungefähr 1 mm unter dem Flüssigkeitsspiegel. (B) Gekürzte 20-gauge-Kanüle aus (A) mit 2 Markierungen im Abstand von 1 mm. (C) Das isolierte Mäuseherz wird in die Schale mit PBS überführt, die Aorta kanüliert und mit Nahtmaterial fixiert. (D) Apparatur zur retrograden Perfusion, bestehend aus einem Reservoir für Perfusions- und Verdauungspuffer, einer Pumpe und einem Schlangenkühler, der auf 37 °C temperiert ist. (E) Retrograde Perfusion des Herzens mit Verdauungspuffer. (F) Herz nach Präparation der epikardialen Zellschicht des linken Ventrikels (schwarze gestrichelte Linie).

Perfusionspuffer		Verdaupuffer	
NaCl	113 mM	Collagenase B (Roche)	0,27 U/ml
KCl	4,7 mM	CaCl <sub>2</sub>	12,5 µM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6 mM	in 1x Perfusionspuffer	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,6 mM		
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mM		
Phenolrot	0,032 mM		
NaHCO <sub>3</sub>	12 mM		
KHCO <sub>3</sub>	10 mM		
HEPES	10 mM		
Taurin	30 mM		
Glukose	5,5 mM		
2,3-	10 mM		
pH 7,46			

StopI-Puffer		StopII-Puffer	
FBS	10%	FBS	5%
CaCl <sub>2</sub>	12,5 µM	CaCl <sub>2</sub>	12,5 µM
in 1x Perfusionspuffer		in 1x Perfusionspuffer	

Plating-Medium		Culture-Medium	
FBS	5%	BSA	0,1 mg/ml
2,3-	10 mM	L-Glutamin	2 mM
L-Glutamin	2 mM	In MEM (GIBCO)	
in MEM (GIBCO)			

## 3.10 Elektrophysiologie

### 3.10.1 Experimentelle Durchführung

Die elektrophysiologischen Messungen erfolgten alle bei Raumtemperatur in der Whole-cell-Konfiguration. Für die Daten-Akquisition wurde ein Axopatch 200B Verstärker und das Computerprogramm Clampex 8.2 (Axon Instruments) benutzt. Die Auswertung der Patch-Clamp-Daten erfolgte mit Clampfit 8.2 / 10.1 und Origin 6.1. Die Pipetten für die Messungen wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren, mit einem äußeren Durchmesser von 1,5 mm und einem inneren Durchmesser von 1,17 mm (GC150TF-8, Harvard Apparatus), hergestellt. Das Ziehen der Pipetten für Messungen an HEK-Zellen erfolgte an einem horizontalen Pipettenziehgerät (DMZ-Universal Puller). Für die Pipetten zur Messung von Kardiomyozyten wurde ein vertikales Pipettenziehgerät verwendet (Patchelektroden-Puller, Hans Ochotzki).

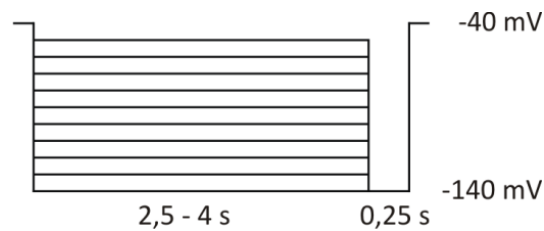
### 3.10.2 Patch-Clamp-Protokolle

#### Protokoll zur Messung von Aktionspotentialen an Kardiomyozyten

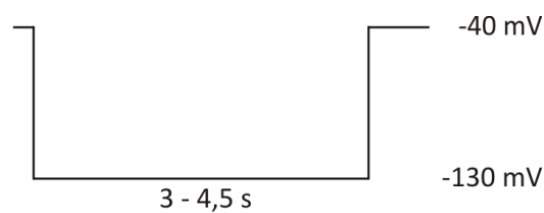
Aktionspotentiale an Kardiomyozyten wurden in der Current-Clamp-Konfiguration gemessen. In dieser Konfiguration wird das Membranpotential gemessen und durch kurze Strominjektionen (1,5 nA; 2 ms; 0,5 Hz) die Zellmembran bis zum Schwellenpotential depolarisiert, so dass Aktionspotentiale ausgelöst werden.

**Protokoll zur Bestimmung der halbmaximalen Aktivierung von  $I_h$** 

Ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV wurde das Membranpotential auf Werte zwischen -140 mV und -50 mV geklemmt. Die Dauer dieses Vorpulses richtete sich nach dem gemessenen Kanal (HCN3: 4 s; HCN2: 2,25 s, HCN4: 4 s; Kardiomyozyten: 4 s). Anschließend wurde ein 250 ms-langer Testpuls von -140 mV appliziert.

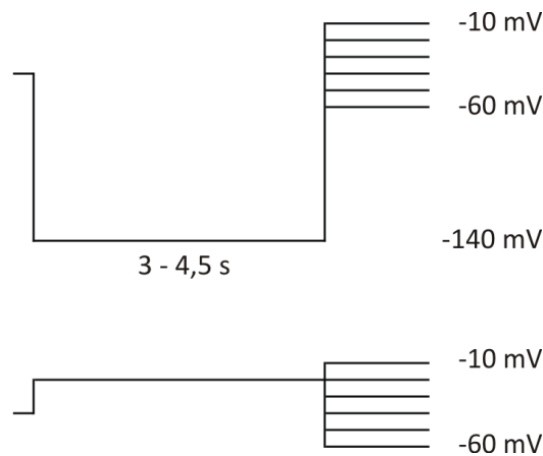
**Protokoll zur Bestimmung der  $I_h$ -Amplitude/ -stromdichte**

Ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV wurde alle 10 s ein Spannungspuls zu -130 mV gegeben. (HCN3: 4 s; HCN2: 3 s; HCN4: 4,5 s; Kardiomyozyten: 4 s). Durch Applikation von 2 mM extrazellulärem Cäsium wurde  $I_h$  geblockt.



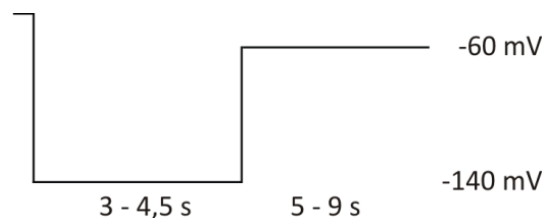
### Protokolle zur Bestimmung des Umkehrpotentials

Die Kanäle wurden zuerst mit einem Vorpuls auf  $-140$  mV (HCN3: 4,5 s; HCN2: 3 s; HCN4: 3,5 s) voll aktiviert und anschließend wurden Testpotentiale von  $-60$  mV bis  $-10$  mV appliziert. Im Anschluss an diese Messung, wurde an der gleichen Zelle ein zweites Protokoll gemessen. Es wurde ein Vorpuls von  $-20$  mV appliziert und dann ebenfalls die Testpotentiale von  $-60$  mV bis  $-10$  mV appliziert.



### Protokoll zur Bestimmung der Deaktivierungsgeschwindigkeit

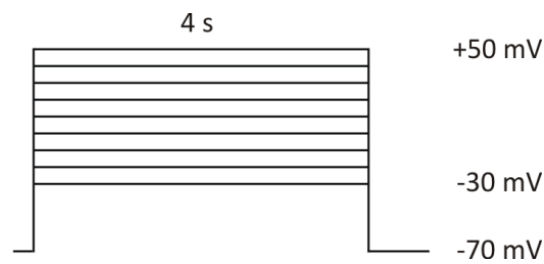
Die Kanäle wurden von einem Haltepotential von  $-40$  mV durch einen Vorpuls auf  $-140$  mV vollständig aktiviert (HCN3: 4,5 s; HCN2: 3 s; HCN4 3,75 s) und die Deaktivierungsgeschwindigkeit durch einen Puls zu  $-60$  mV (HCN3: 9 s; HCN2 5 s; HCN4: 9 s) gemessen.



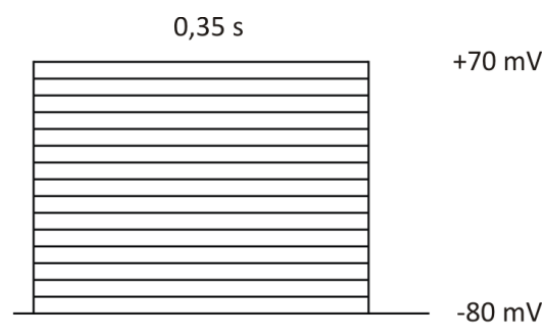


**Protokoll zur Messung von  $I_{to}$** 

Spannungsabhängige, auswärtsgerichtete Kaliumströme wurden von einem Haltepotential von -70 mV durch 4 s lange Spannungsschritte zu Potentialen zwischen -30 mV bis +50 mV mit 10 mV Spannungsdifferenz zwischen den einzelnen Pulsen aktiviert.

**Protokoll zur Messung von  $I_{Ca}$** 

Das Protokoll bestand aus Spannungssprüngen von 350 ms Länge zwischen -80 und +70 mV mit 10 mV Spannungsdifferenz zwischen den einzelnen Pulsen. Das Haltepotential betrug -80 mV.



## 3.10.3 Lösungen für die Elektrophysiologie

AP extrazellulär (Tyrode)		AP intrazellulär	
NaCl	138 mM	Kalium-DL-Aspartat	120 mM
KCl	4 mM	KCl	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM	NaCl	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM	MgCl <sub>2</sub>	2 mM
EGTA	5 mM	EGTA	5 mM
HEPES	10 mM	HEPES	10 mM
Glukose	10 mM	pH 7,2	
pH 7,4			

I <sub>h</sub> Cardios extrazellulär			I <sub>h</sub> Cardios intrazellulär	
KCl	25 mM	100 mM	Kalium-DL-Aspartat	130 mM
NaCl	75 mM	50 mM	Na <sub>2</sub> ATP	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM	1,8 mM	CaCl <sub>2</sub>	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM	1 mM	MgCl <sub>2</sub>	2 mM
BaCl <sub>2</sub>	8 mM	8 mM	EGTA	11 mM
4-AP	0,5 mM	0,5 mM	HEPES	10 mM
CdCl <sub>2</sub>	0,2 mM	0,2 mM	pH 7,2	
TEA-Cl	20 mM	20 mM		
HEPES	5 mM	5 mM		
Glukose	5 mM	5 mM		
pH 7,4				

<b>I<sub>to</sub> extrazellulär</b>		<b>I<sub>to</sub> intrazellulär</b>	
NMDG	138 mM	KCl	130 mM
KCl	4 mM	NaCl	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM	MgCl <sub>2</sub>	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	MgATP	2 mM
CoCl <sub>2</sub>	5 mM	EGTA	10 mM
HEPES	10 mM	HEPES	10 mM
Glukose	10 mM	pH 7,2	
pH 7,3			

<b>I<sub>ca</sub> extrazellulär</b>		<b>I<sub>ca</sub> intrazellulär</b>	
NMDG	102 mM	CsCl	110 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM	TEA-Cl	20 mM
CsCl	5,4 mM	NaCl	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM	MgATP	2 mM
TEA	20 mM	MgCl <sub>2</sub>	1 mM
HEPES	5 mM	EGTA	10 mM
Glukose	10 mM	HEPES	10 mM
pH (CsOH) 7,4		pH (CsOH) 7,4	

<b>I<sub>h</sub> HEK293 extrazellulär</b>			
KCl	5 mM	30 mM	100 mM
NaCl	135 mM	110 mM	40 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM	1,8 mM	1,8 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM
HEPES	5 mM	5 mM	5 mM
pH 7,4			

<b>I<sub>h</sub> HEK293 intrazellulär</b>	
KCl	130 mM
NaCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM
MgATP	3 mM
Na <sub>2</sub> GTP	0,5 mM
EGTA	1 mM
HEPES	5 mM
pH 7,4	

### 3.10.4 Korrektur des „Liquid Junction Potential“

Die Zusammensetzung der extrazellulären Lösung (Badlösung) und der intrazellulären Lösung (Pipettenlösung) unterscheidet sich bei Whole-Cell-Patch-Clamp Experimenten erheblich. Aufgrund der unterschiedlichen Beweglichkeiten der vorhandenen Ionen kommt es an der Grenzfläche zwischen verschiedenen Lösungen zur Ausbildung von Grenzflächenpotentialen (Liquid Junction Potential (LJP,  $V_{LJP}$ )). Die Größe einer solchen Potentialdifferenz ist abhängig von der Beweglichkeit, der Konzentration und der Ladung der beteiligten Ionen. Beispielsweise ist die Beweglichkeit von Kalium- und Chloridionen relativ hoch und in etwa gleich groß, während Natrium- und Aspartationen eine deutlich geringere Beweglichkeit aufweisen. Kommen Bad- und Pipettenlösung beim Eintauchen der Elektrode in die Badlösung in Kontakt, so bewegen sich die Ionen entlang ihrer Konzentrationsgradienten und es entsteht ein Offsetpotential, das durch den Patch-Clamp-Verstärker auf Null gesetzt wird, so dass kein Strom durch die Pipette fließt. Beim Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration ist fällt dieses Offsetpotential weg, da die

Ionenkonzentrationen von Cytoplasma und Pipettenlösung sich relativ ähnlich sind. Die Kommandospannung  $V_{cmd}$ , die während des Ablaufs eines Experiments mit dem Verstärker eingestellt wird ist daher um den Betrag des Offsetpotentials zu groß und muss nach der Messung korrigiert werden. Die LJP wurden mit Hilfe der JPCalc software (Dr. P. Barry, University of South Wales, Sydney, Australia (Barry 1994)) berechnet und a posteori korrigiert. Bei der Auswertung der Kalium- und Calciumströme wurde auf die Korrektur des LJP verzichtet.

$$V_m = V_{cmd} - V_{LJP}$$

$V_m$  = Membranpotential

$V_{cmd}$  = Kommandospannung

$V_{LJP}$  = Liquid Junction Potential

Messung / Zelltyp	Kaliumkonzentration in der extrazellulären Lösung	LJP
AP / Kardiomyozyten	4 mM	14,5 mV
$I_h$ / Kardiomyozyten	25 mM	13,6 mV
$I_h$ / Kardiomyozyten	100 mM	11,4 mV
$I_h$ / HEK293	5 mM	4,0 mV
$I_h$ / HEK293	30 mM	3,3 mV
$I_h$ / HEK293	100 mM	1,2 mV

### 3.10.5 Datenanalyse

Alle Ergebniswerte wurden, sofern nicht anders vermerkt, als Mittelwert  $\pm$ SEM angegeben; n steht für die Anzahl der Experimente. Bei der statistischen Auswertung wurden zwei Gruppen anhand des t-Tests für gepaarte Stichproben nach Student miteinander verglichen. Zum Vergleich mehrerer Gruppen wurde der ANOVA-Test (F-Test), gefolgt vom Dunnett-Test, durchgeführt. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant angesehen.

#### Aktionspotentiale

Aus den Messungen wurde die Aktionspotentialdauer bis zu 10% (APD10), 25% (APD25), 50% (APD50), 75% (APD75) and 90% (APD90) Repolarisation ermittelt. Diese wurde vom Peak des schnellen Aktionspotential-Aufstrichs aus gemessen. Auch das Ruhemembranpotential wurde aus diesen Messungen bestimmt.

#### Stromdichte $I_h$ /Stromamplitude

Zur Berechnung der Stromdichte wurde die Stromamplitude bei der maximalen Aktivierung ( $I_{\max}$ ) auf die Kapazität ( $C_m$ ) der Zelle normiert. Die Kapazität ist ein Maß für die Zelloberfläche.

$$CD = \frac{I_{\max}}{C_m}$$

CD = Current density, Stromdichte

$C_m$  = Membrankapazität

$I_{\max}$  = maximale Stromamplitude

### Halbmaximale Aktivierung $I_h$

Zur Bestimmung der Aktivierungskurven und des Potentials der halbmaximalen Aktivierung  $V_{1/2}$  wurden die „Tailcurrents“, sofort nach dem Schritt zu -140 mV (siehe Pfeil Abb.) gemessen, auf die maximale Stromstärke  $I_{\max}$  der Zelle normalisiert und graphisch als Funktion des vorangegangenen Membranpotentials aufgetragen. Die Kurven wurden anschließend mit einer Boltzmann-Funktion gefittet:

$$\frac{I - I_{\min}}{I_{\max} - I_{\min}} = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\left(\frac{V - V_{1/2}}{k}\right)}} + A_2$$

$I$  = Stromamplitude bei gegebenem Testpotential

$I_{\max}$  = maximale Stromamplitude der Zelle bei einer Spannung von -140 mV

$I_{\min}$  = Offsetstrom, der durch einen Haltestrom ungleich Null verursacht wird, aber nicht in die Stromamplitude mit eingeht

$V$  = Testpotential

$k$  = Neigungsfaktor der Kurve

### Deaktivierung der HCN-Kanäle

Um das Ausmaß der zeitabhängigen Deaktivierung der HCN-Kanäle zu bestimmen wurde die verbleibende Fraktion des Peak-Stromes nach 50 ms, 1000 ms oder 3000 ms Depolarisation bestimmt.

### Umkehrpotential der HCN-Kanäle

Zur Bestimmung des Umkehrpotentials ( $E_{rev}$ ) wurden die Tail-Currents direkt nach den zwei verschiedenen Vorpulsen gemessen und voneinander abgezogen. Die resultierenden Stöme wurden gegen das Testpotential aufgetragen und das Umkehrpotential aus dem Schnittpunkt der I/V-Kurve mit der Spannungsachse bestimmt (Wahl-Schott et al. 2005). Die Permeabilitätsrate für Natrium und Kalium ( $p_{Na}/p_K$ ) wurde mit Hilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung berechnet:

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \left( \frac{p_K [K]_o + p_{Na} [Na]_o + p_{Cl} [Cl]_i}{p_K [K]_i + p_{Na} [Na]_i + p_{Cl} [Cl]_o} \right)$$

$V_m$  = Membranpotential

$R$  = Gaskonstante (8,314 J/(K\* mol))

$T$  = Temperatur in Kelvin ( $K = ^\circ C + 273,15$ )

$F$  = Faraday-Konstante (96485 C /mol)

$p_K$  = Membranpermeabilität für  $K^+$

$p_{Na}$  = Membranpermeabilität für  $Na^+$

$p_{Cl}$  = Membranpermeabilität für  $Cl^-$

$[K]_o$  = extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration

$[K]_i$  = intrazelluläre  $K^+$ -Konzentration

$[Na]_o$  = extrazelluläre  $Na^+$ -Konzentration

$[Na]_i$  = intrazelluläre  $Na^+$ -Konzentration

$[Cl]_o$  = extrazelluläre  $Cl^-$ -Konzentration

$[Cl]_i$  = intrazelluläre  $Cl^-$ -Konzentration

### Kalium-Auswärtsströme

Zur Bestimmung der I/V-Kurve wurde die maximale Stromamplitude oder die Stromamplitude nach Erreichen des steady-state durch die Zellkapazität geteilt und gegen das Testpotential aufgetragen.

### Calcium-Einwärtsströme

Zur Bestimmung der I/V-Kurve wurde die maximale Stromamplitude durch die Zellkapazität geteilt und gegen das Testpotential aufgetragen.



## 4 Ergebnisse

Die HCN3-KO Maus, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, ist mittels einer Cre/LoxP-basierten Strategie generiert worden. Zur Deletion wurde das Exon 2 ausgewählt, welches für die Transmembransegmente 1-4 kodiert (Abb. 8A). Das Spleißen von Exon 1 auf Exon 3 führt zu einer Verschiebung des Leserahmens und zu einem Stopcodon am Anfang des Exon 3, wodurch die Translation beendet wird. HCN3-defiziente Mäuse sind fruchtbar, vermehren sich im erwarteten Mendel'schen Verhältnis und zeigen keine offensichtlichen körperlichen Defizite.

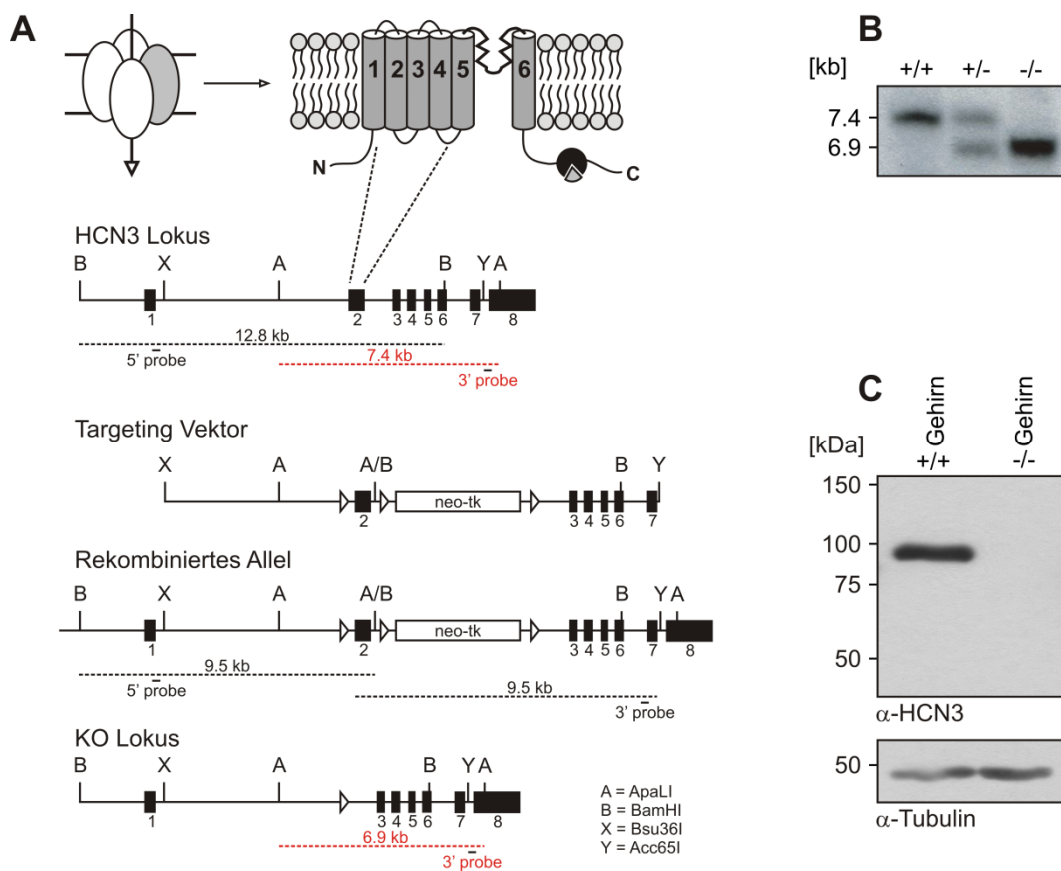


Abb. 8 Deletion des HCN3 Gens. (A) Oben: HCN3 Kanal Tetramer (links) und eine einzelne Untereinheit (rechts). Die sechs putativen Transmembransegmente sind nummeriert. Unten: HCN3 Targeting-Strategie. Exons 1-8 sind durch schwarze Boxen dargestellt. Der Targetingvektor enthält eine LoxP-Seite (offenes Dreieck) in Intron 1 und eine Neo/tk-Kassette in Intron 2, die von zwei LoxP-Seiten flankiert ist. Homolog rekombiniertes Allel und KO-Lokus nach Cre-vermittelter Deletion des Exon 2. (B) Analyse genomischer DNA von Wildtyp-, heterozygoten und KO-Mäusen. Southern-Blot von ApaLI-verdauter DNA, die mit der in (A) gezeigten Sonde hybridisiert wurde (rote, gestrichelte Linie). (C) Western-Blot aus Gewebslysaten des Nucleus paraventricularis von Wildtyp- und KO-Mäusen. Tubulin diente als Ladekontrolle.

Die erfolgreiche Deletion des HCN3-Gens wurde, auf der Ebene genomischer DNA, durch Southern-Blots bestätigt (Abb. 8B). Für das Wildtyp-Allel liegt die Bande bei 7,4 kb, für das KO-Allel bei 6,9 kb. Auch auf Proteinebene wurde die erfolgreiche Deletion von HCN3 nachgewiesen (Abb. 8C). In Western-Blots aus Lysaten von Wildtyp-Gehirnen wurde eine spezifische Bande detektiert, die der voll glykosylierten Form des Kanals entspricht (92 kDa), dahingegen war keine Bande im KO zu sehen. Mittels RT-PCR wurde das Expressionsmuster von HCN3-Kanälen im Herzen untersucht. Es zeigte sich, dass HCN3 im Ventrikel und im Atrium, jedoch nicht im Sinusknoten exprimiert wird (Abb. 9A). Geringe Mengen des HCN3-Proteins wurden immunhistochemisch in Schnitten von Wildtyp-Herzen nachgewiesen wohingegen kein Protein in KO-Herzen zu finden war (Abb. 9B). Die Deletion des HCN3-Kanals im Herzen führte nicht zu strukturellen Veränderungen des Herzmuskels (Abb. 9C, D).

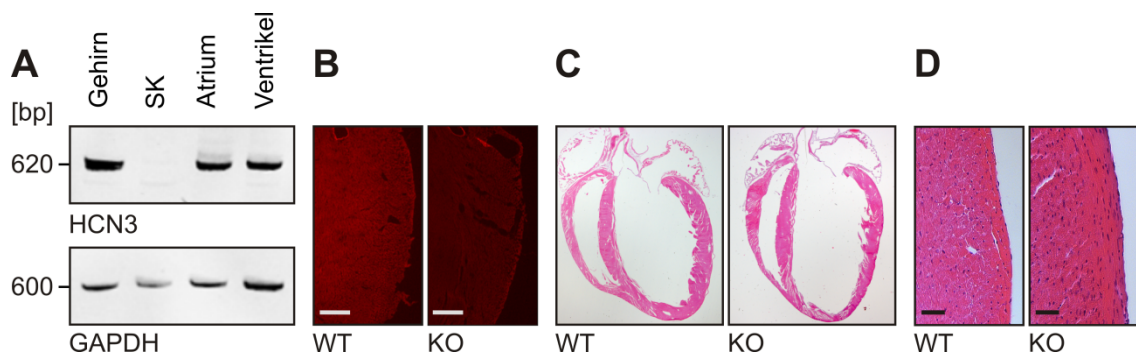


Abb. 9 (A) RT-PCR: HCN3 wird in Ventrikel und Atrium exprimiert. Hirngewebe diente als Positivkontrolle und GAPDH als Ladekontrolle. (B) Immunhistochemische Detektion von HCN3 in transversalen Schnitten des Herzmuskels (Maßstabsbalken: 200  $\mu$ m). (C, D) HE-Färbung transversaler Herzschnitte von Wildtyp- und KO-Mäusen (Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m).

Die Beobachtung, dass HCN3 im Ventrikel vorkommt, wirft die Frage nach seiner physiologischen Funktion in diesem Gewebe auf. Eine Methode, die sich sehr gut zur Überprüfung der Herzfunktion *in vivo* eignet, ist die telemetrische EKG-Messung. Ein besonderer Vorteil dieser telemetrischen Messungen ist, dass die Mäuse bei den EKG-Aufnahmen bei Bewusstsein sind und sich frei in ihren Käfigen bewegen können. Den Tieren wurden hierfür EKG-Transmitter implantiert und nach einer Erholungsphase von 4 Wochen EKGs gemessen (Abb. 10).

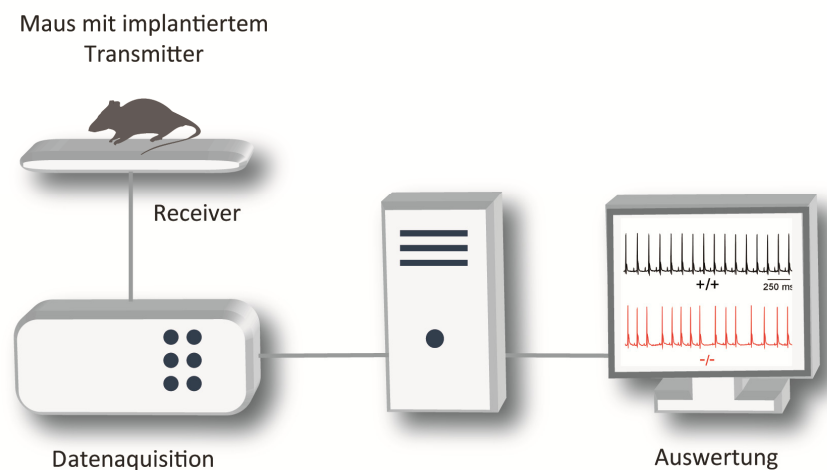


Abb. 10 Versuchsaufbau für EKG Messungen. Die Mäuse mit implantiertem EKG-Transmitter werden mit ihrem Käfig auf einer Empfänger-Platte positioniert. Die EKG Daten werden an einen Computer gesendet und können anschließend ausgewertet werden.

In kontinuierlichen Messungen über einen Zeitraum von zwei Wochen zeigte sich, dass HCN3-defiziente Mäuse einen normalen Sinusrhythmus und keine Anzeichen spontaner Arrhythmien hatten (Abb. 11A). Die mittlere Herzfrequenz beider Genotypen wies ebenfalls keine Unterschiede auf (Wildtyp:  $534 \pm 9$ ;  $n=9$ ; KO:  $532 \pm 10$ ;  $n=9$ ). Um herzfrequenzabhängige EKG-Parameter miteinander zu vergleichen, wurden diese bei einer definierten hohen ( $600 \pm 10$  bpm) und niedrigen ( $460 \pm 12$  bpm) Herzfrequenz untersucht. Bei hohen Frequenzen waren die EKG-Parameter der KO-Mäuse völlig normal und nicht von Wildtyp-EKGs zu unterscheiden (Abb. 11C). Im Gegensatz hierzu war bei niedrigen Herzfrequenzen das QT-Intervall signifikant verlängert (12 %,  $n=9$ ). Auch das  $T_{\text{peak}}-T_{\text{end}}$ -Intervall ( $T_{\text{pe}}$ ) war bei KO-Tieren verlängert (15 %,  $n=9$ ) (Abb. 11D).

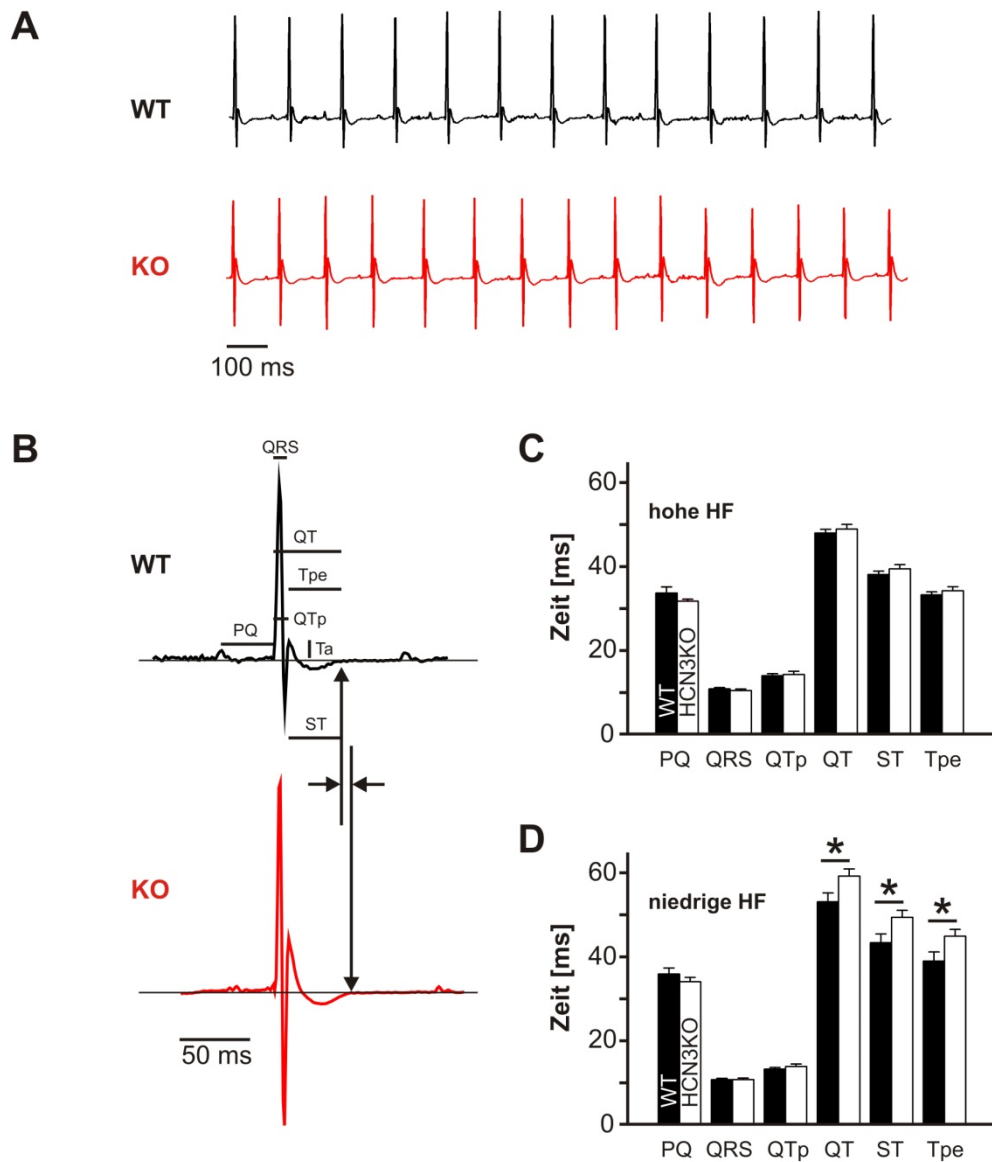


Abb. 11 Analyse der EKG-Parameter von Wildtyp- und KO-Mäusen. (A) Telemetrische EKG-Messungen (Ableitung II) in der Ruhephase. Wildtyp- und KO-Mäuse haben einen regelmäßigen Sinusrhythmus. (B) Repräsentative EKG-Komplexe einer Wildtyp und einer KO-Maus. Die EKG-Parameter sind eingezeichnet (PQ, QRS, QTp, QT, ST, Tpe, Ta) wie in Material und Methoden erläutert. (C, D) Statistik der EKG-Parameter von KO (weiße Balken) und Wildtyp (schwarze Balken) bei hohen Herzfrequenzen (C) und niedrigen Herzfrequenzen (D). Bei niedrigen Frequenzen sind QT-, ST- und Tpe-Intervall der KO-Tiere signifikant verlängert. Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. \* $p < 0.05$ ;  $n = 9$  in beiden Gruppen.

Neben der moderaten Verlängerung des QT-, ST- und Tpe-Intervalls führte die Deletion von HCN3 zu einer ausgeprägten Veränderung der T-Wellen Morphologie (Abb. 12A). Besonders bemerkenswert war die Erhöhung ihrer Amplitude um 63,5% im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Bei hohen Frequenzen war immer noch ein Trend zu höheren Amplituden in KO-Tieren zu erkennen (Abb. 12B).

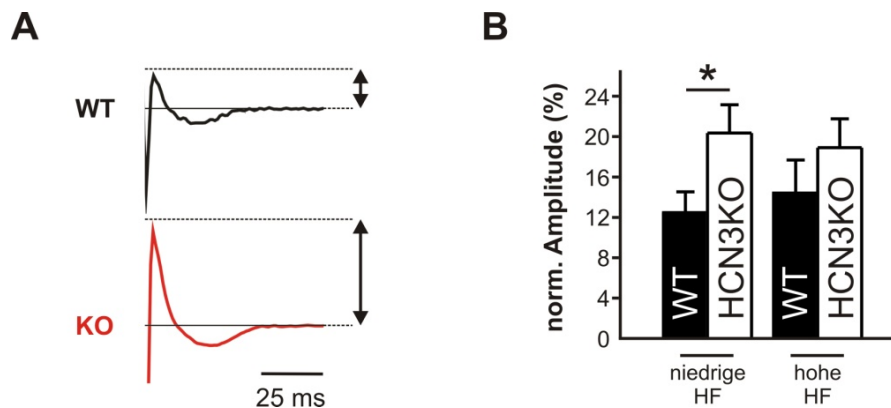


Abb. 12 Morphologie der T-Welle. (A) Vergrößerung eines repräsentativen  $T_{peak-T_{end}}$ -Intervalls ( $T_{pe}$ ) einer Wildtyp-Maus (oben) und einer KO-Maus (unten) zeigt, dass die T-Wellen Amplitude in KO-Tieren erhöht ist. (B) Statistik der relativen T-Wellen Amplituden von Wildtyp- und KO-Mäusen bei niedrigen Herzfrequenzen ( $460 \pm 12$  bpm,  $n=9$ ) und hohen Herzfrequenzen ( $600 \pm 10$  bpm,  $n=9$ ).

Die T-Welle im EKG entsteht dadurch, dass epikardiale Zellen ein kürzeres Aktionspotential haben als endokardiale Zellen und deshalb vor endokardialen Zellen repolarisieren (Yan and Antzelevitch 1998). Die dadurch resultierende transmurale Potentialdifferenz führt zur Ausbildung der T-Welle (Abb. 13). Die veränderten T-Wellen Parameter der HCN3 KO-Maus geben einen deutlichen Hinweis darauf, dass der Repolarisationsprozess auf zellulärer Ebene verändert ist.

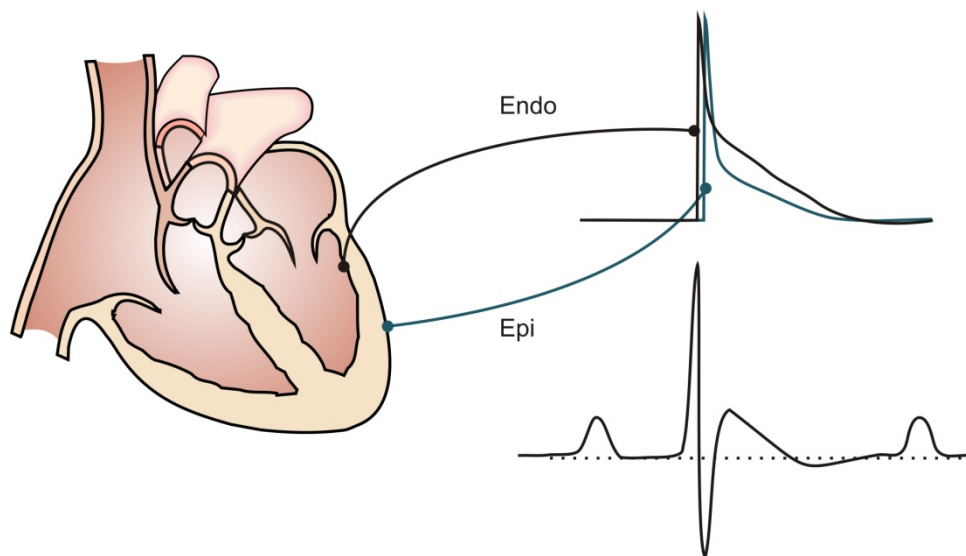


Abb. 13 Entstehung der EKG-Wellen im Mäuseherz. Schema eines Herzens (links). Aktionspotential von endokardialen (Endo, schwarz) und epikardialen (Epi, grün) Myozyten. Die EKG-Wellen (rechts, unten) entstehen durch das zeitlich versetzte Auftreten und die unterschiedliche Aktionspotentialdauer von endokardialen und epikardialen Myozyten.

In weiteren Versuchen sollte der Repolarisationsprozess in isolierten Kardiomyozyten untersucht werden. Hierfür wurde eine Methode zur Isolation von endokardialen und epikardialen Kardiomyozyten aus Mäuseherzen etabliert. Die Schwierigkeit der Zellisolation liegt darin, dass die epikardiale und die endokardiale Schicht nur aus ungefähr 15 Zellschichten ( $\sim 200\text{-}300\ \mu\text{m}$ ) (Brunet et al. 2004) besteht. Eine Verunreinigung der Präparation mit tieferliegenden Zellschichten wurde durch elektrophysiologische Messungen von  $I_{\text{to}}$  ausgeschlossen (Abb. 14). Dieser Strom wird von Kaliumkanälen geleitet, die nur epikardial exprimiert werden (Xu et al. 1999). Durch diese Messungen konnte auch gezeigt werden, dass die Expression anderer repolarisierender Kaliumströme in Kardiomyozyten von Wildtyp- und KO-Mäusen nicht unterschiedlich ist, die Deletion des HCN3-Kanals also keinen Einfluss auf diese Ströme hat.

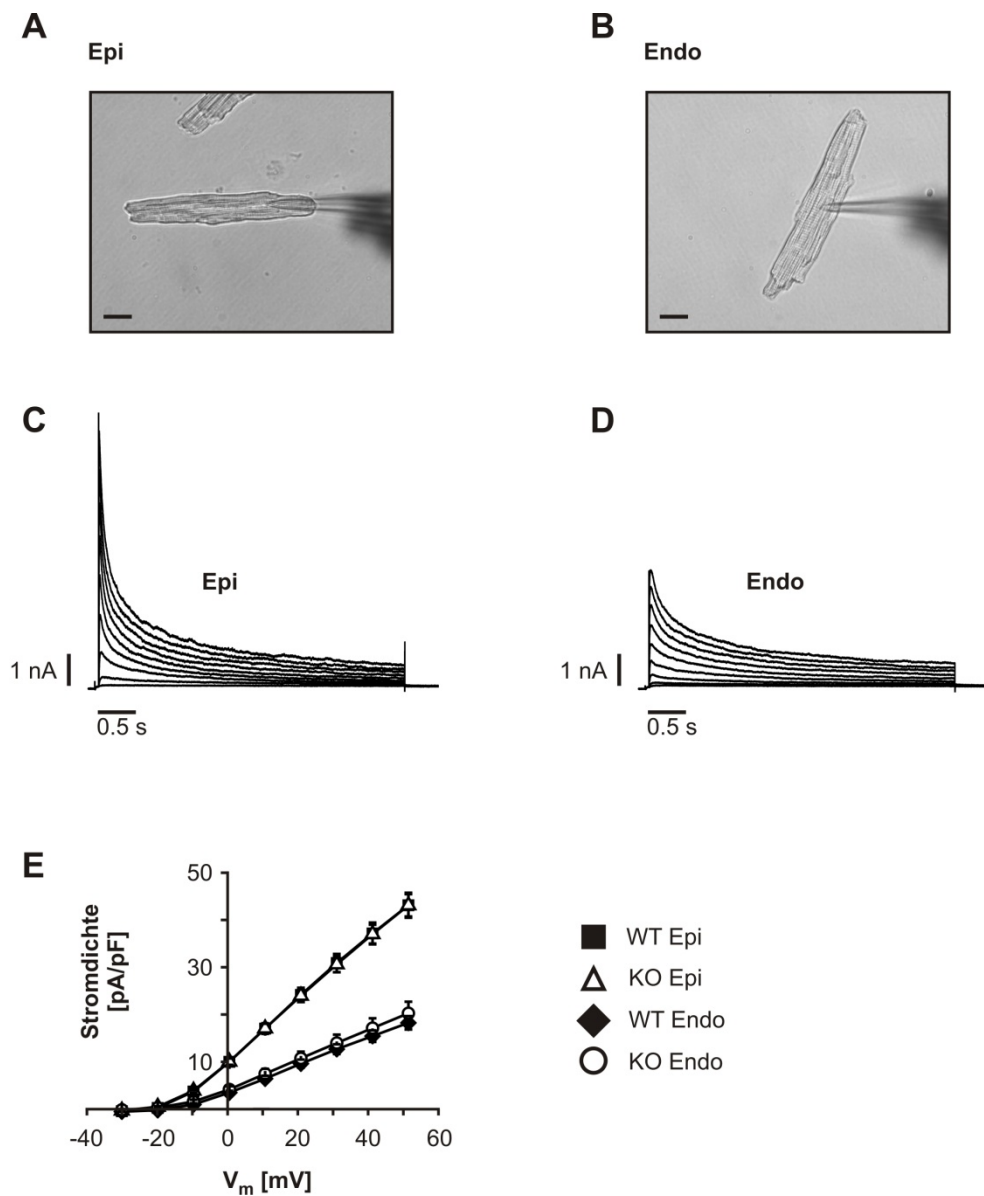


Abb. 14 Validierung der Zellpräparation und Messung von Kalium-Auswärtsströmen. (A, B) Morphologie epikardialer (Epi) und endokardialer (Endo) Myozyten einer Wildtyp-Maus. (C, D) Kalium-Auswärtsströme gemessen an epikardialen und endokardialen Zellen einer Wildtyp-Maus. In epikardialen Myozyten wird der schnell inaktivierende  $I_{to}$  exprimiert (C), in endokardialen Zellen hingegen (D) nicht. (E) I/V-Kurve und Stromdichte von  $I_{to}$  und Steady-State Current von epikardialen und endokardialen Wildtyp- und KO-Zellen.

Durch Messung von Aktionspotentialen an endokardialen und epikardialen Zellen von Wildtyp- und KO-Mäusen wurde nun auf zellulärer Ebene die potentielle Rolle des HCN3-Kanals bei der ventrikulären Repolarisation untersucht. In endokardialen Zellen war kein Unterschied zwischen den Aktionspotential-Parametern von Wildtyp- und KO-Zellen zu sehen. Im Gegensatz dazu war in epikardialen Myozyten von KO-Tieren die Aktionspotentialdauer signifikant verkürzt (Abb. 15). Die Verkürzung der Aktionspotentiale wurde durch Veränderungen der späten Repolarisation verursacht (APD50, APD75 und APD90), wohingegen die frühe Repolarisation in beiden Populationen gleich war (APD10 und APD25). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der unveränderten Stromdichte von Ionenkanälen, die hauptsächlich die frühe Repolarisationsphase tragen (Abb. 14, Abb. 16). Das Ruhemembranpotential war in beiden Gruppen gleich (Wildtyp:  $-81,8 \pm 0,5$  mV (n=18); KO:  $-82,5 \pm 0,4$  mV (n=32))

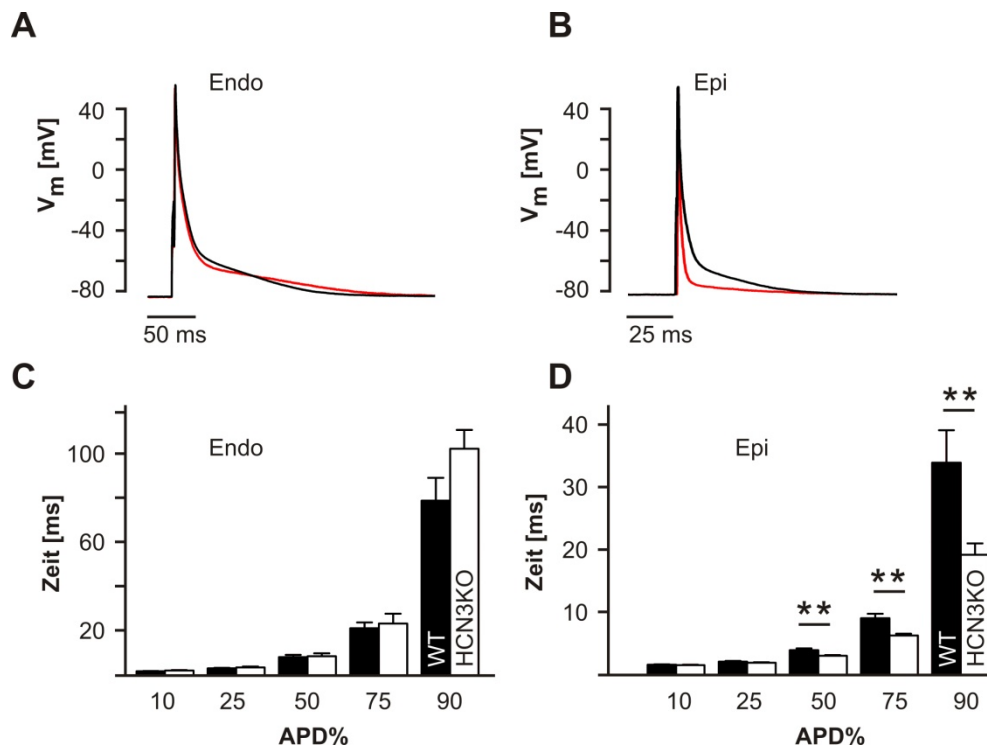


Abb. 15 Aktionspotential-Messungen an Kardiomyozyten. (A, B) Repräsentative Aktionspotentiale von endokardialen und epikardialen Myozyten von Wildtyp- (schwarz) und KO-Mäusen (rot). (C) Aktionspotentialdauer (APD) bei 10%, 25%, 50%, 75% und 90% Repolarisation in endokardialen Wildtyp-Zellen (schwarze Balken, n=12) und KO-Zellen (weisse Balken, n=6). (D) APDs epikardialer Zellen von Wildtyp-Mäusen (schwarze Balken, n=18) und KO-Mäusen (weisse Balken, n=32).



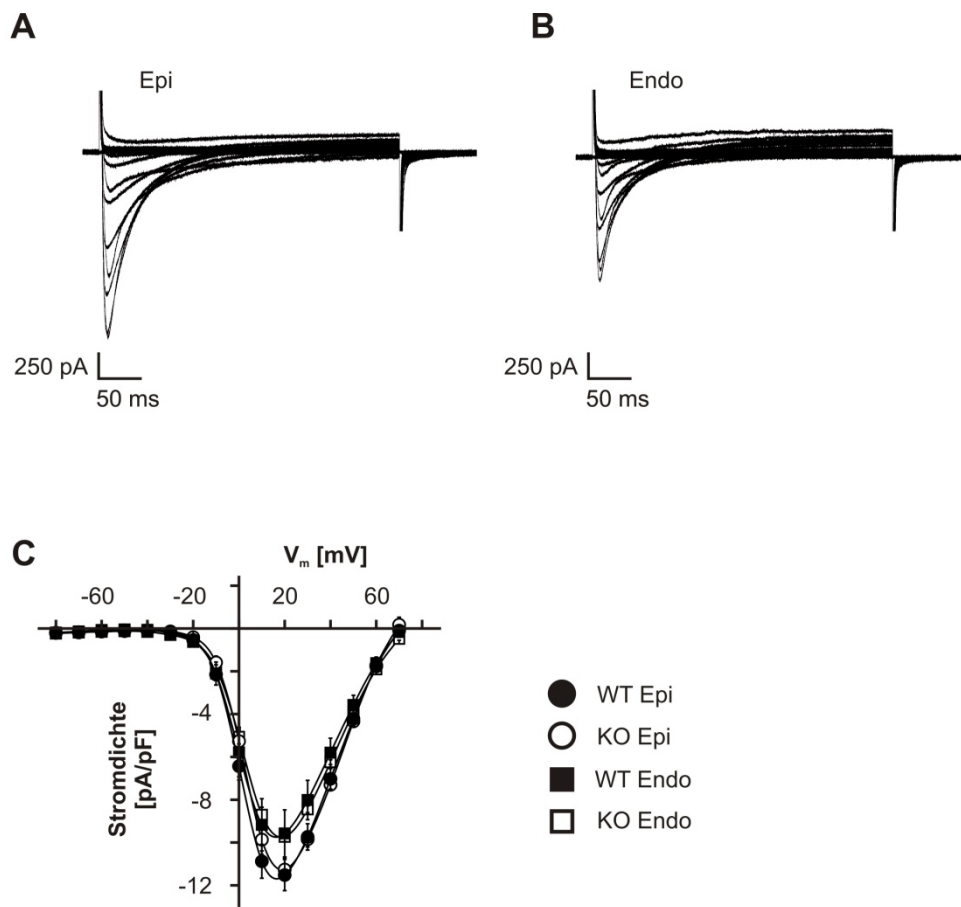


Abb. 16 Messung von Calciumströmen an isolierten epikardialen (Epi) und endokardialen (Endo) Myozyten (A, B) Calcium-Einwärtsströme in epikardialen und endokardialen Kardiomyozyten einer Wildtyp-Maus (C) I/V-Kurve und Stromdichte von  $I_{Ca}$  in endokardialen und epikardialen Wildtyp- und KO-Kardiomyozyten.

Um zu prüfen, ob die Verkürzung des Aktionspotentials in epikardialen Zellen von KO-Tieren durch die Deletion von HCN3 in ventrikulären Zellen begründet ist, wurde  $I_h$  an diesen Zellen gemessen. Aufgrund der relativ geringen Expression von HCN-Kanälen im Ventrikel, ist es unmöglich diese Ströme bei einer physiologischen, extrazellulären Kaliumkonzentration (5 mM) zu messen. Deshalb wurde zuerst versucht, die Stromamplitude durch Erhöhung der Kaliumkonzentration auf 25 mM zu erhöhen. Unter diesen Bedingungen konnte bereits in einigen Zellen ein relativ kleiner Strom detektiert werden, der die charakteristischen Eigenschaften von  $I_h$  hatte (Abb. 17). Die Kanäle öffneten sich langsam bei Hyperpolarisation, inaktivierten nicht und leiteten einen Einwärtsstrom, der durch Zugabe von 2 mM Cäsium zur extrazellulären Lösung geblockt wurde. Intrazelluläre Applikation von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) beschleunigte die Aktivierungsgeschwindigkeit. Allerdings war bei den meisten Messungen die Stromamplitude relativ klein und das Signal-Rausch-Verhältnis zu schlecht, um die Ströme genauer zu charakterisieren.

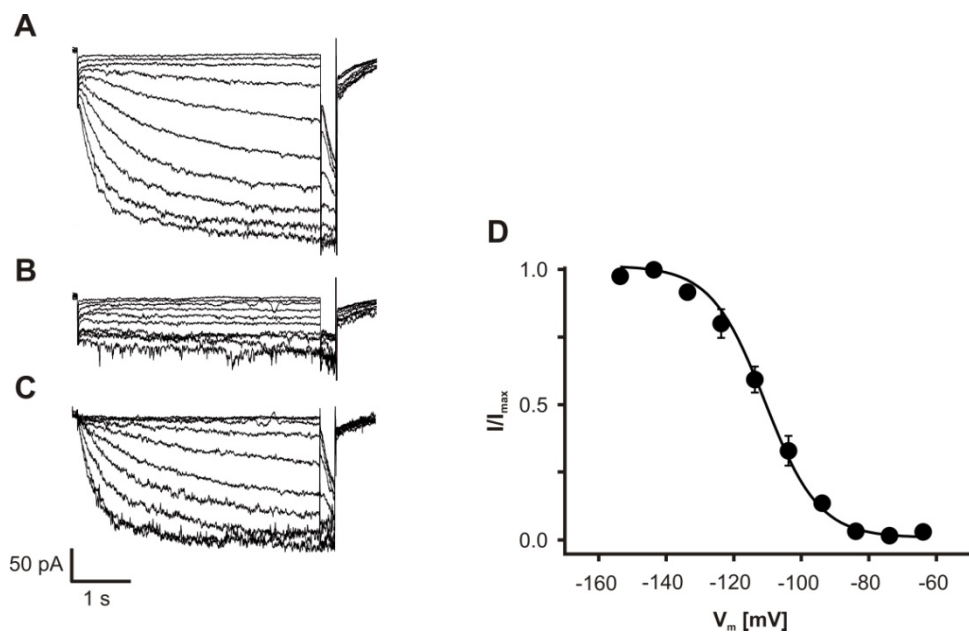


Abb. 17 (A)  $I_h$ -Messung an einer epikardialen Zelle einer Wildtyp-Maus mit 25 mM  $K^+$  in der extrazellulären Lösung. (B) Blockade von  $I_h$  durch Applikation von 2 mM  $Cs^+$  in der extrazellulären Lösung. (C) Cäsiumsensitiver Strom gebildet aus der Differenz von (A) und (B). (D) Steady-State Aktivierungskurve von  $I_h$  mit 25 mM  $K^+$ .

Für eine detaillierte biophysikalische Charakterisierung von  $I_h$  wurde die Kaliumkonzentration auf 100 mM erhöht. Es zeigte sich, dass in KO-Zellen die Stromdichte gegenüber Wildtyp-Zellen um ca. 30% reduziert war. Der verbleibende  $I_h$  in KO -Zellen wird wahrscheinlich durch HCN2- und HCN4-Kanäle getragen, die auch im Ventrikel exprimiert werden (Abb. 19). Durch cAMP wurde die Stromdichte von Wildtyp- und KO-Zellen auf das gleiche Niveau angehoben. Die Spannung der halbmaximalen Aktivierung ( $V_{1/2}$ ) war in Wildtyp-Zellen etwas negativer im Vergleich zu KO-Zellen (Wildtyp:  $-114,0 \pm 1,2$  mV,  $n=8$ ; KO:  $-108,5 \pm 1,8$ ,  $n=6$ ;  $p<0.05$ ). Auch hier war der Unterschied zwischen Wildtyp und KO nach cAMP Applikation nicht mehr signifikant (Wildtyp:  $-105,4 \pm 1,4$  mV,  $n=11$ ,  $p<0.01$ ; KO:  $-103,9 \pm 1,3$ ,  $n=10$ ,  $p<0.05$ ).

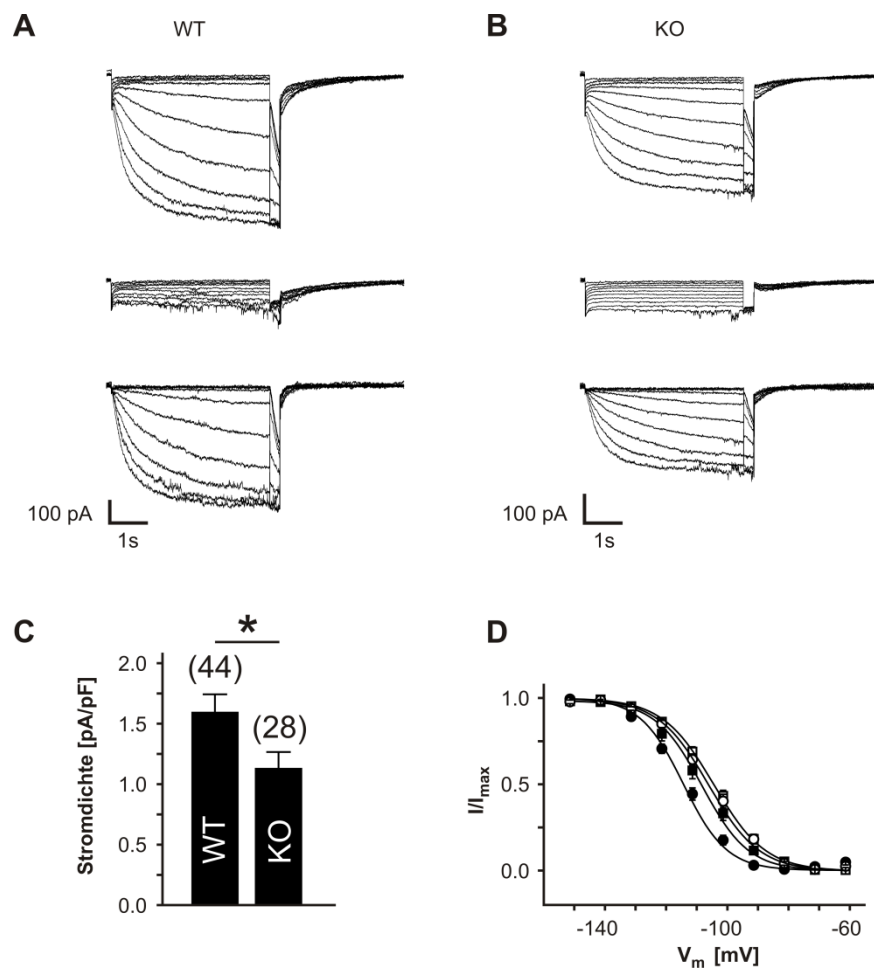


Abb. 18  $I_h$ -Messungen an epikardialen Zellen. (A, B)  $I_h$ -Stromspuren mit 100 mM  $K^+$  in der extrazellulären Lösung vor (oben) und nach (Mitte) Blockade der Kanäle mit 2 mM  $Cs^+$  und Cäsiumsensitiver Strom (unten) für Wildtyp-Zellen (A) und KO-Zellen (B). (C) Stromdichte des Cäsiumsensitiven Stroms bei einem Potential von -130 mV. (D)  $I_h$  Steady-State Aktivierungskurve von Wildtyp- (Kreise) und KO-Zellen (Quadrate) aus Messungen ohne cAMP (gefüllte Symbole) und mit cAMP (offene Symbole).

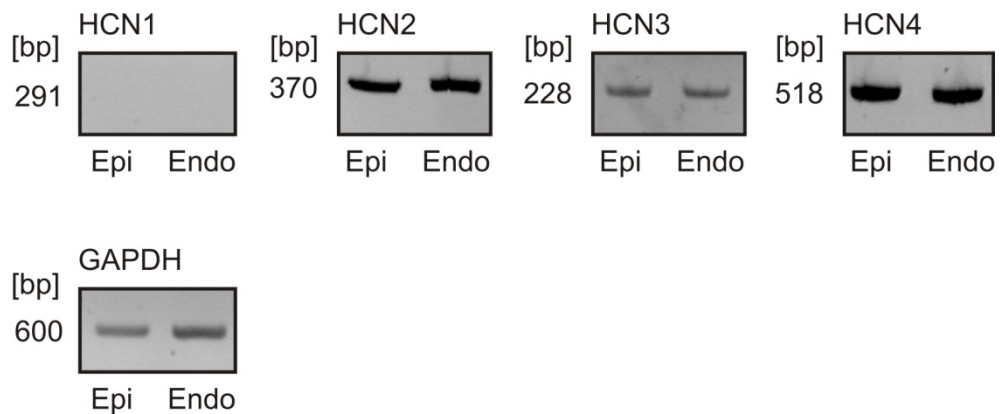


Abb. 19 RT-PCR aus epikardialen (Epi) und endokardialen (Endo) Myozyten. Oben: HCN3, HCN2 und HCN4 werden in epikardialem und endokardialem Gewebe exprimiert. Unten: GAPDH als Ladekontrolle

Wie kann nun das längere Aktionspotential in Wildtyp-Kardiomyozyten durch die Anwesenheit des HCN3-Kanals erklärt werden? Hierfür müssten im Wildtyp drei Voraussetzungen erfüllt sein:

- 1) HCN3 muss beim RMP offen sein.
- 2) HCN3 muss in der späten Repolarisationsphase einen depolarisierenden Strom generieren.
- 3) HCN3 darf während des Aktionspotentials nicht schließen.

In den folgenden Experimenten wurde durch Messung der biophysikalischen Eigenschaften exprimierter Kanäle in HEK293-Zellen getestet, ob diese Voraussetzungen durch HCN-Kanäle erfüllt werden.

Der Anteil an HCN-Kanälen, die beim RMP im offenen Zustand vorliegen, kann anhand ihrer Aktivierungskurve bestimmt werden. Die ermittelte Aktivierungskurve und die Werte der halbmaximalen Aktivierungsspannung ( $V_{1/2}$ ) in Kardiomyozyten sind im Vergleich zu bereits publizierten Werten in Nativ-Zellen relativ negativ. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration sein, bei der die Ströme gemessen wurden. Hohe Kaliumkonzentrationen können die Eigenschaften der HCN-Ströme verändern und ihre Aktivierungskurve zu negativeren Werten verschieben (Azene et al. 2003). Es ist also gut möglich, dass die relativ negativen  $V_{1/2}$ -Werte in epikardialen Myozyten durch dieses Phänomen erklärt werden können. Um dies zu prüfen, wurden HCN-Ströme mit verschiedenen Kaliumkonzentrationen an HEK293 Zellen, die stabil HCN2, HCN3 oder HCN4 exprimierten, gemessen. Eine Erhöhung der Kaliumkonzentration führte in allen Zelllinien zu einer Erhöhung der Stromamplitude (Abb. 20A) und auch zu einer ausgeprägten Verschiebung der Aktivierungskurve zu negativeren Potentialen (Abb. 20C, D). Es ist sehr wahrscheinlich, dass eine vergleichbare Verschiebung auch in Kardiomyozyten auftritt und dass unter physiologischen Messbedingungen die Spannung der halbmaximalen Aktivierung soweit zu positiveren Potentialen verschoben wäre, dass zumindest ein Teil der HCN-Kanäle beim Ruhemembranpotential im geöffneten Zustand vorliegen würde. Anhand der Aktivierungskurve des HCN3-Kanals mit 5 mM Kalium kann man erkennen, dass ungefähr 20% der Kanäle bei einem Potential von -80 mV (RMP von Kardiomyozyten) im geöffneten Zustand vorliegen (grüne Box in Abb. 20).

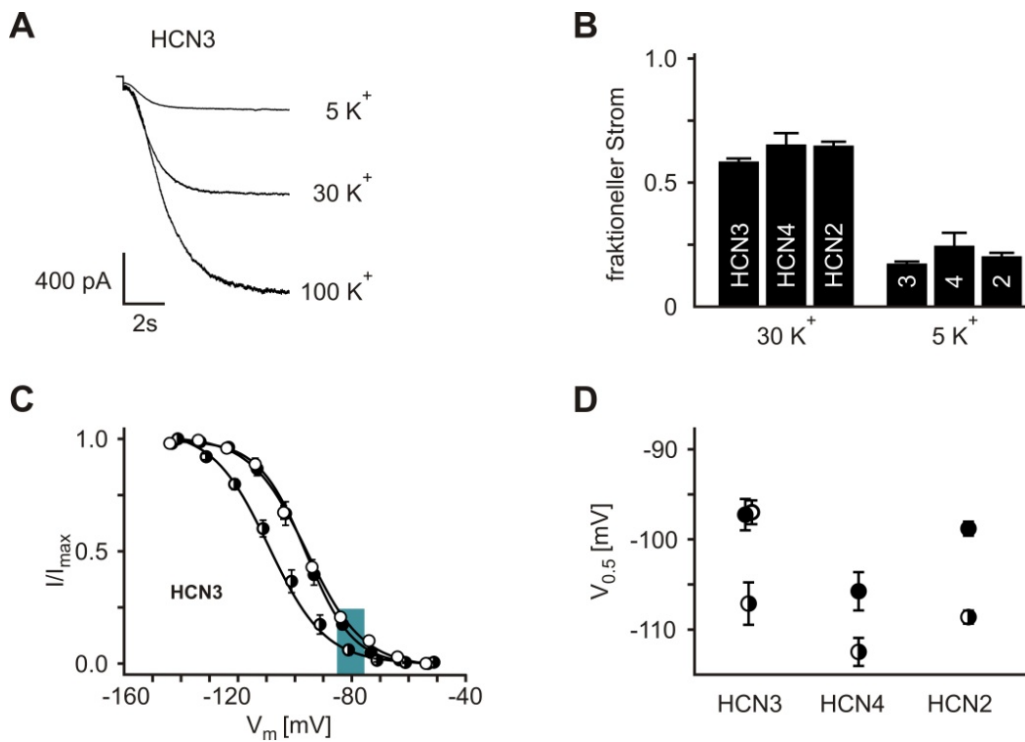


Abb. 20 Biophysikalische Eigenschaften von HCN-Strömen in HEK293 Zellen mit unterschiedlichen K<sup>+</sup>-Konzentrationen in der extrazellulären Lösung. **(A)** Abhängigkeit der Stromamplitude des HCN3-Stromes von der K<sup>+</sup>-Konzentration bei einem Potential von -130 mV. **(B)** Statistik der fraktionellen Ströme von HCN3, HCN2 und HCN4 aus Messungen wie sie in (A) gezeigt sind. Die Werte wurden erhalten durch Normalisierung der Stromamplitude bei der jeweiligen K<sup>+</sup>-Konzentration auf die Stromamplitude mit 100 mM K<sup>+</sup>. **(C)** Steady-State Aktivierungskurven für HCN3 mit 5 mM (offener Kreis), 30 mM (geschlossener Kreis) und 100 mM K<sup>+</sup> (halboffener Kreis). **(D)** Statistik der halbmaximalen Aktivierungsspannung ( $V_{0.5}$ ) für HCN3, HCN2 und HCN4 ermittelt aus Messungen wie sie in (C) gezeigt sind.

Um zu klären, ob HCN3 in den Potentialbereichen die während der späten Repolarisationsphase durchlaufen werden, einen depolarisierenden Strom leitet, wurde das Umkehrpotential der HCN-Kanäle in stabilen Zelllinien bestimmt (Abb. 21A). Das Umkehrpotential lag bei allen Kanal-Subtypen bei ungefähr -35 mV (HCN3:  $-33,08 \pm 1,19$  mV,  $n=8$ ; HCN2:  $-34,28 \pm 1,36$  mV,  $n=4$ ; HCN4:  $-35,3 \pm 0,69$  mV,  $n=8$ ). Bei Potentialen die negativer sind als -35 mV, leiten die Kanäle also einen Einwärtsstrom und könnten somit unter physiologischen Bedingungen in Kardiomyozyten repolarisierenden Kaliumströmen entgegenwirken.

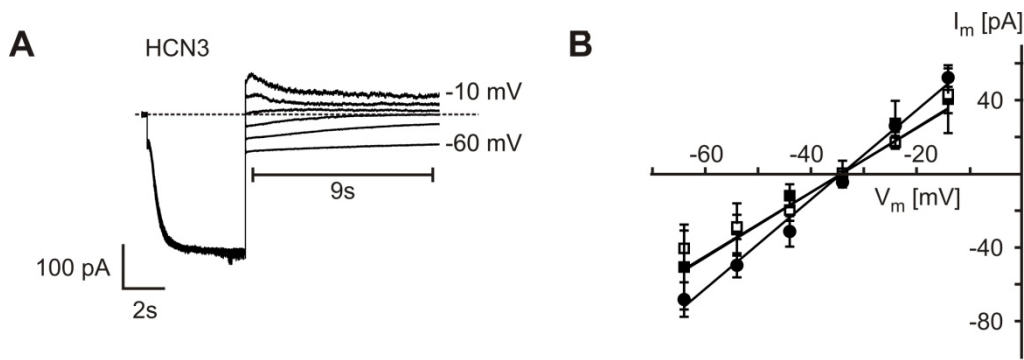


Abb. 21 Bestimmung des Umkehrpotentials (RP; reversal potential) von HCN-Strömen in HEK293-Zellen. (A) Repräsentative HCN3-Stromspur zur Bestimmung der Strom-Spannungs-Kurve. Nach vollständiger Aktivierung der Kanäle durch Hyperpolarisation und anschließenden Testpulsen zu verschiedenen Potentialen kann die Strom-Spannungskurve aus den Tail-Currents bestimmt werden. (B) Strom-Spannungs-Kurven zur Bestimmung des Umkehrpotentials aus Messungen wie in (A). Das Umkehrpotential ist der Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse.

Durch Messungen des zeitlichen Verlaufs der HCN-Kanal Deaktivierung an stabilen Zelllinien sollte überprüft werden ob HCN-Kanäle während eines Aktionspotentials offen bleiben (Abb. 22). Nach vollständiger Aktivierung der Kanäle durch einen hyperpolarisierenden Vorpuls wurde ein Spannungsschritt zu -60 mV gemacht und die Deaktivierung beobachtet. Alle drei HCN-Kanal-Isoformen, die im Mausventrikel exprimiert werden, hatten eine sehr langsame Deaktivierungskinetik, wobei HCN3 bei weitem die langsamste zeigte. Ein Großteil der Kanäle lag selbst nach einer Sekunde noch im geöffneten Zustand vor (HCN3:  $88,89 \pm 2,17\%$ ,  $n=8$ ; HCN2:  $52,32 \pm 8,33\%$ ,  $n=4$ ; HCN4:  $77,32 \pm 1,64\%$ ,  $n=8$ ). Da HCN3 Kanäle nicht inaktivieren und eine sehr langsame Deaktivierung haben, kann man davon ausgehen, dass die Kanäle während eines gesamten Aktionspotentials im offenen Zustand bleiben und nicht bei positiven Potentialen, die beim Aktionspotential auftreten, schließen.

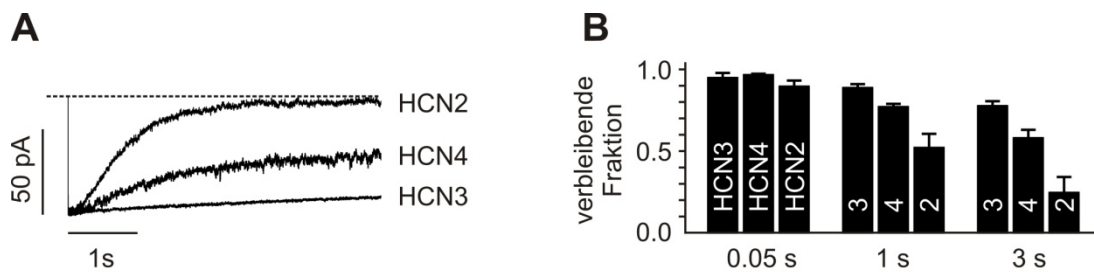


Abb. 22 Zeitlicher Verlauf der Deaktivierung von HCN-Kanälen in HEK293-Zellen. (A) Tail-currents bei -60 mV aus von mHCN3, mHCN2 und hHCN4. Alle drei Subtypen zeigen eine sehr langsame Deaktivierungskinetik. (B) Fraktion des verbleibenden Stromes nach 50 ms, 1000 ms und 3000 ms für die verschiedenen Kanäle.



## 5 Diskussion

HCN-Kanäle sind äußerst wichtig für die Regulation der Erregbarkeit von Zellen und haben eine entscheidende Bedeutung für die Kontrolle von kardialer und neuronaler Schrittmacheraktivität. Eine Funktionsstörung von HCN-Kanälen wird mit Krankheiten wie Arrhythmien (HCN4) (Stieber et al. 2006), Epilepsie (HCN2) (Ludwig et al. 2003) und neuropathischen Schmerzen (HCN1) (Chaplan et al. 2003) in Verbindung gebracht. Von den vier Vertretern der HCN-Kanal Familie ist HCN3 bei weitem am wenigsten untersucht worden. Der Kanal wurde in Neuronen und in Herzen von Mäusen (Mistik et al. 2005) nachgewiesen, aber über seine physiologische Funktion ist wenig bekannt. Auch seine biophysikalischen Eigenschaften in heterologen Expressionssystemen sind wenig untersucht worden, aufgrund seiner schlechten Expression und seiner hauptsächlich intrazellulären Lokalisation.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der kardiale Phänotyp einer HCN3-defizienten Mauslinie untersucht. HCN3 wird im Ventrikel und im Atrium, jedoch nicht im Sinusknoten und Reizleitungssystem exprimiert. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Beobachtung, dass KO-Mäuse einen normalen Sinusrhythmus und keine Anzeichen von Arrhythmien haben. Im Ventrikel führt die Deletion des Kanals zu einer schnelleren Repolarisation von epikardialen Herzmuskelzellen und damit zu einer Verkürzung des Aktionspotentials in diesen Zellen (Abb. 23, oben). Bei Wildtyp-Zellen ist, durch die Anwesenheit des HCN3-Kanals, das Aktionspotential länger und die Repolarisation langsamer. Die Repolarisation wird durch Kaliumausstrom aus der Zelle durch verschiedene Kaliumkanäle verursacht (Nerbonne and Kass 2005). HCN3 scheint ein funktioneller Antagonist dieser repolarisierenden Ströme zu sein. Es wäre gut möglich, dass auch HCN2 und HCN4 die Repolarisation antagonisieren. Sie werden auch in Ventrikelzellen exprimiert und haben ähnliche biophysikalische Eigenschaften wie HCN3, zum Beispiel die sehr langsame Deaktivierung und ein Umkehrpotential von etwa -35 mV. Übereinstimmend mit dieser Hypothese konnten wir zeigen, dass durch HCN3 nur etwa 30% des ventrikulären  $I_h$  ausgemacht werden. Die verbleibenden 70% könnten also durch HCN2 und HCN4 getragen werden.

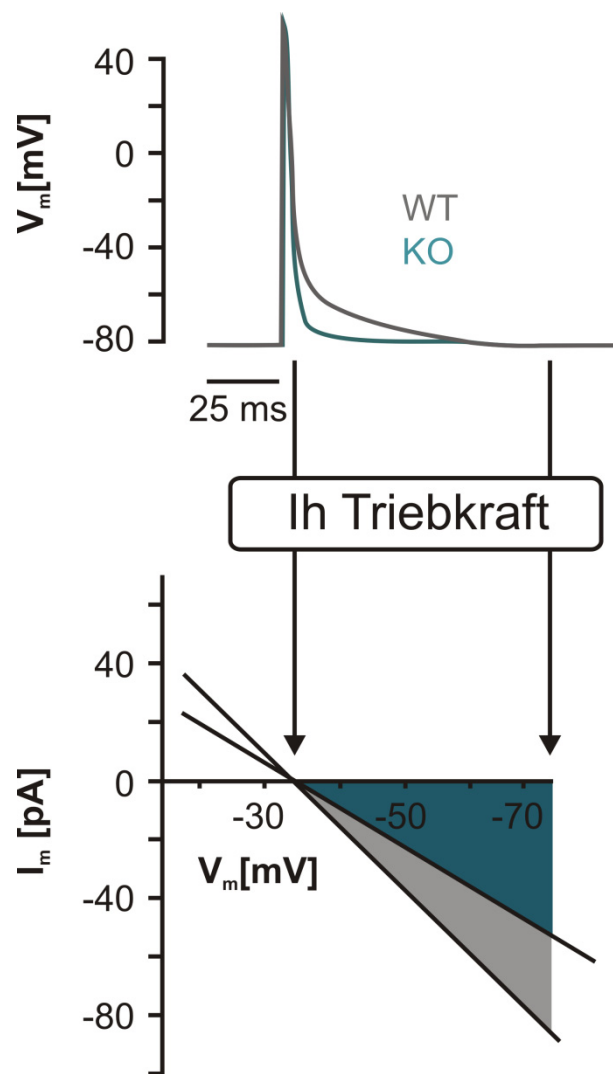


Abb. 23 HCN3 als funktioneller Antagonist der ventrikulären Repolarisation. Oben: Aktionspotentiale von epikardialen WT- (grau) und KO-Kardiomyozyten (grün). Unten: Umkehrpotential und Stromamplitude von  $I_h$  in Kardiomyozyten. Während des eingezeichneten Potentialfensters (Pfeile) besitzt  $I_h$  eine einwärts gerichtete Triebkraft und leitet einen depolarisierenden Strom (graue Fläche). Durch den Knockout des HCN3-Kanals ist die Amplitude von  $I_h$  reduziert (grüne Fläche) und das Aktionspotential (oben, grün) verkürzt.

Es gibt einige Aspekte, die bei unserer Modellvorstellung, dass HCN-Kanäle als funktionelle Antagonisten der repolarisierenden Kaliumströme wirken, noch erläutert werden müssen.

Es besteht ein scheinbarer Widerspruch darin, dass der Kanal während des gesamten Aktionspotentials offen ist, jedoch nur die späte Repolarisationsphase beeinflusst. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die frühe Repolarisation vor allem durch  $I_{to}$  dominiert wird, der durch seine wesentlich größeren Ströme den kleineren  $I_h$  maskiert (Xu et al. 1999). Zusätzlich würde HCN3 aufgrund seines Umkehrpotentials, das bei ungefähr  $-35$  mV liegt, während der frühen Repolarisation eher einen hyperpolarisierenden als einen depolarisierenden Strom leiten. Während der späten Repolarisation ist  $I_{to}$  inaktiviert und seine Offenwahrscheinlichkeit und Triebkraft reduziert, so dass  $I_h$  seinen vollen Effekt entfalten kann (Kass 1997; Bondarenko et al. 2004; Wang and Sobie 2008).

Ein weiterer wichtiger Aspekt der diskutiert werden muss ist, wie HCN3 einen so ausgeprägten Einfluss auf das Aktionspotential haben kann, obwohl er einen relativ geringen Anteil am ventrikulären  $I_h$  (ca. 30%) hat, und eine kleine Stromdichte von ca.  $0,5$  pA/pF besitzt. Die Stromdichte von HCN3 ist in der gleichen Größenordnung wie die der ventrikulären Kaliumströme  $I_{Kss}$  (Xu et al. 1999; Bondarenko et al. 2004) und  $I_{Ks}$  (Drici et al. 1998). Trotz ihrer kleinen Amplitude können diese Ströme die ventrikuläre Repolarisation modulieren. Prinzipiell können kleine Ströme die späte Repolarisation beeinflussen, da hier der hauptrepolarisierende Strom  $I_{to}$  bereits inaktiviert und der Membranwiderstand hoch ist. Dadurch kann auch ein sehr kleiner Strom einen ausgeprägten Einfluss auf die Aktionspotentialdauer haben (Drici et al. 1998; Thorneloe et al. 2001). Da HCN3 konstitutiv offen bleibt übt er einen kumulativen depolarisierenden Effekt aus, der die späte Repolarisation signifikant verlängert, wobei die Triebkraft des Stromes stetig zunimmt.

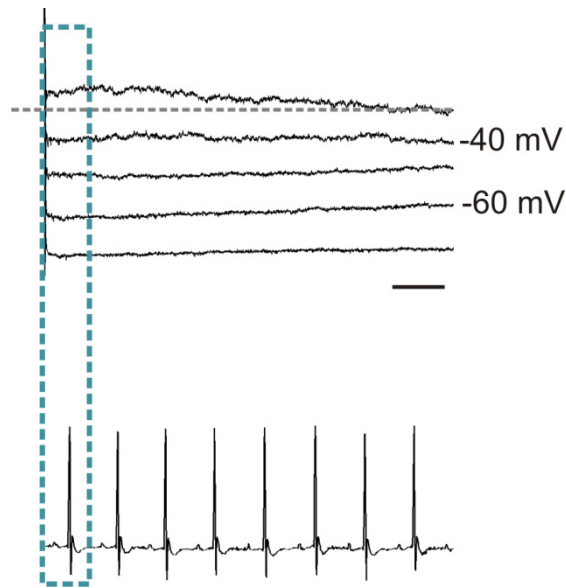


Abb. 24 Oben: Zeitlicher Verlauf der HCN3-Kanal Deaktivierung bei verschiedenen Potentialen nach maximaler Aktivierung. Unten: EKG einer Wildtyp-Maus, das die schnelle Herzfrequenz im Vergleich zur Deaktivierungsgeschwindigkeit des HCN3-Kanals veranschaulicht (Zeitskala: 50 ms).

Geringfügige transmurale Unterschiede in der Aktionspotentialdauer führen zu einem Spannungsgradienten im Herzmuskel durch den die T-Welle im EKG entsteht (Patel et al. 2009). Die Verkürzung des epikardialen Aktionspotentials bei unveränderter endokardialer Aktionspotentialdauer erhöht diesen Spannungsgradienten wodurch die ausgeprägte Erhöhung der T-Wellen Amplitude erklärt werden kann (Yan and Antzelevitch 1998). Die Ursache für die gleichzeitige Verlängerung des QT-Intervalls ist soweit noch unklar. Es ist wichtig zu erwähnen, dass die EKG-Veränderungen in KO-Mäusen bei niedrigen Herzfrequenzen sehr ausgeprägt waren und bei hohen Frequenzen weniger ausgeprägt. Dies könnte durch die Amplitudenerhöhung von  $I_h$  durch cAMP bei hohen Frequenzen erklärt werden. Dies würde im Einklang stehen mit unseren Beobachtungen an isolierten Kardiomyozyten. Hier führte die intrazelluläre Applikation von cAMP zu einer Erhöhung der  $I_h$ -Stromdichte in KO-Zellen auf das Niveau von Wildtyp-Zellen.

Repolarisationsgradienten existieren in Herzen aller Säugetiere und spielen eine wichtige Rolle in der Funktion des Herzens (Patel et al. 2009). Eine erhöhte sowie eine erniedrigte transmurale Heterogenität der Repolarisation machen das Herz anfälliger für ventrikuläre Arrhythmien (Costantini et al. 2005). Wir zeigen, dass  $I_h$  in Wildtyp-Herzen die Aktionspotential-Dispersion vermindert und dass die Deletion des HCN3-Kanals zu ihrer Erhöhung führt. Das Fehlen spontaner Arrhythmien bei KO-Mäusen lässt vermuten, dass der Verlust des HCN3-Kanals alleine die transmurale Dispersion nicht ausreichend erhöht um Arrhythmien auszulösen. Zukünftige Experimente werden zeigen, ob die Deletion von HCN2 oder HCN4, welche zusammen mit HCN3 den ventrikulären  $I_h$  generieren, eine Arrhythmie auslösen kann.

Die Rolle von HCN-Kanälen als funktionelle Antagonisten der späten Repolarisation könnte auch unter pathophysiologischen Bedingungen relevant sein. Es gibt mehrere Arbeiten die berichten, dass HCN-Kanäle bei ventrikulärer Hypertrophie und Herzinsuffizienz überexprimiert werden (Hoppe et al. 1998; Hiramatsu et al. 2002; Cerbai and Mugelli 2006; Herrmann et al. 2007). In diesen Studien wird angenommen, dass die erhöhte  $I_h$ -Expression hauptverantwortlich ist für spontane Zellaktivität und ektopische Rhythmusbildung (Stillitano et al. 2008). Auch eine ausgeprägte Aktionspotentialverlängerung wurde in einigen dieser Studien beobachtet (Cerbai et al. 2000; Cerbai et al. 2003), die jedoch vollständig einer gleichzeitigen Verringerung der  $I_{to}$  Expression zugeschrieben wurde. Unsere Ergebnisse implizieren, dass die Aktionspotentialverlängerung auch direkt durch eine Hochregulation von  $I_h$  entstehen kann.

## 6 Zusammenfassung

HCN-Kanäle sind eine kleine Ionenkanalfamilie mit 4 Subtypen (HCN1-4), die durch Hyperpolarisation aktiviert und durch Zyklonukleotide gesteuert werden. Im Sinusknoten und Reizleitungssystem des Herzens spielen sie eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der Erregbarkeit dieser Zellen und sind gemeinsam mit anderen Strömen an der Generierung des autonomen Herzschlags beteiligt. Im Gegensatz zu der gut untersuchten Funktion der Kanäle im Sinusknoten ist sehr wenig bekannt über ihre Relevanz in Herzmuskelzellen. Bei ventrikulärer Hypertrophie und Herzinsuffizienz werden HCN-Kanäle überexprimiert und sind für spontane Zellaktivität und ektopische Rhythmusbildung verantwortlich. Es ist jedoch nicht untersucht worden, welche Funktion HCN-Kanäle in Herzmuskelzellen unter physiologischen Bedingungen haben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der kardiale Phänotyp einer HCN3-defizienten Mauslinie untersucht. HCN3 wird im Ventrikel und im Atrium exprimiert, jedoch nicht im Sinusknoten und Reizleitungssystem. Dies wurde auf Transkript- und auch auf Proteinebene gezeigt. Die Deletion des Kanals führte nicht zu strukturellen Veränderungen des Herzens. In telemetrischen EKG-Messungen hatten HCN3 KO-Mäuse einen normalen Sinusrhythmus und keine Anzeichen spontaner Arrhythmien. Die mittlere Herzfrequenz war im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nicht verändert. Dahingegen hatten HCN3-defiziente Mäuse eine pathologische Veränderung des EKGs, mit einer Erhöhung der T-Wellen Amplitude und einer Verlängerung des QT-Intervalls. Aktionspotential-Messungen an isolierten Kardiomyozyten zeigten ein verkürztes epikardiales Aktionspotential und weisen darauf hin, dass die Veränderungen der EKG-Parameter durch eine Beschleunigung der späten Repolarisationsphase in epikardialen Kardiomyozyten bedingt sind.  $I_h$ -Messungen an isolierten Kardiomyozyten zeigten, dass die Stromdichte in KO-Zellen um ca. 30% reduziert ist. Da HCN3 unter physiologischen Bedingungen ein Umkehrpotential von ca. -35 mV und eine sehr langsame Deaktivierungskinetik besitzt, kann davon ausgegangen werden, dass der Kanal einen depolarisierenden „Background-Strom“ leitet, der die Geschwindigkeit der Repolarisation verlangsamt. HCN3 ist also ein Gegenspieler von repolarisierenden Kaliumströmen und hat eine Schlüsselrolle bei der Balance des ventrikulären Aktionspotentials.

## 7 Referenzen

- Azene, E. M., et al. (2003). "Molecular basis of the effect of potassium on heterologously expressed pacemaker (HCN) channels." *J Physiol* 547(Pt 2): 349-356.
- Barry, P. H. (1994). "JPCalc, a software package for calculating liquid junction potential corrections in patch-clamp, intracellular, epithelial and bilayer measurements and for correcting junction potential measurements." *J Neurosci Methods* 51(1): 107-116.
- Bondarenko, V. E., et al. (2004). "Computer model of action potential of mouse ventricular myocytes." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287(3): H1378-1403.
- Brown, H. F., et al. (1979). "Adrenaline action on rabbit sino-atrial node [proceedings]." *J Physiol* 290(2): 31P-32P.
- Brunet, S., et al. (2004). "Heterogeneous expression of repolarizing, voltage-gated K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricles." *J Physiol* 559(Pt 1): 103-120.
- Cerbai, E., et al. (2000). "Long-term treatment of spontaneously hypertensive rats with losartan and electrophysiological remodeling of cardiac myocytes." *Cardiovasc Res* 45(2): 388-396.
- Cerbai, E., et al. (2003). "Treatment with irbesartan counteracts the functional remodeling of ventricular myocytes from hypertensive rats." *J Cardiovasc Pharmacol* 41(5): 804-812.
- Cerbai, E., et al. (2006). "I(f) in non-pacemaker cells: role and pharmacological implications." *Pharmacol Res* 53(5): 416-423.
- Chaplan, S. R., et al. (2003). "Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain." *J Neurosci* 23(4): 1169-1178.
- Costantini, D. L., et al. (2005). "The homeodomain transcription factor *Irx5* establishes the mouse cardiac ventricular repolarization gradient." *Cell* 123(2): 347-358.
- Craig, N. L. (1988). "The mechanism of conservative site-specific recombination." *Annu Rev Genet* 22: 77-105.
- DiFrancesco, D., et al. (1991). "Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP." *Nature* 351(6322): 145-147.
- Drici, M. D., et al. (1998). "Involvement of *Isk*-associated K<sup>+</sup> channel in heart rate control of repolarization in a murine engineered model of Jervell and Lange-Nielsen syndrome." *Circ Res* 83(1): 95-102.
- Fain, G. L., et al. (1978). "Contribution of a caesium-sensitive conductance increase to the rod photoresponse." *Nature* 272(5652): 466-469.
- Gauss, R., et al. (1998). "Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm." *Nature* 393(6685): 583-587.
- Graham, F. L., et al. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." *J Gen Virol* 36(1): 59-74.
- Halliwell, J. V., et al. (1982). "Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons." *Brain Res* 250(1): 71-92.
- Herrmann, S., et al. (2007). "Pathophysiology of HCN channels." *Pflugers Arch* 454(4): 517-522.
- Herrmann, S., et al. (2007). "HCN4 provides a 'depolarization reserve' and is not required for heart rate acceleration in mice." *Embo J* 26(21): 4423-4432.
- Hiramatsu, M., et al. (2002). "Ion channel remodeling in cardiac hypertrophy is prevented by blood pressure reduction without affecting heart weight increase in rats with abdominal aortic banding." *J Cardiovasc Pharmacol* 39(6): 866-874.
- Hoppe, U. C., et al. (1998). "Hyperpolarization-activated inward current in ventricular myocytes from normal and failing human hearts." *Circulation* 97(1): 55-65.
- Hurtado, R., et al. (2010). "The pelvis-kidney junction contains HCN3, a hyperpolarization-activated cation channel that triggers ureter peristalsis." *Kidney Int* 77(6): 500-508.
- Jiang, Y., et al. (2003). "X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel." *Nature* 423(6935): 33-

- 41.
- Kass, R. S. (1997). "Genetically induced reduction in small currents has major impact." *Circulation* 96(6): 1720-1721.
- Long, S. B., et al. (2005). "Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel." *Science* 309(5736): 897-903.
- Long, S. B., et al. (2005). "Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling." *Science* 309(5736): 903-908.
- Ludwig, A., et al. (2003). "Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2." *Embo J* 22(2): 216-224.
- Ludwig, A., et al. (1998). "A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels." *Nature* 393(6685): 587-591.
- Ludwig, A., et al. (1999). "Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics." *Embo J* 18(9): 2323-2329.
- Mackinnon, R. (2004). "Nobel Lecture. Potassium channels and the atomic basis of selective ion conduction." *Biosci Rep* 24(2): 75-100.
- Mader, R., et al. (2003). Genetic deletion of the HCN3 Pacemaker channel in mice.
- Mannikko, R., et al. (2002). "Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages." *Nature* 419(6909): 837-841.
- Meurers, B. H., et al. (2009). "Dopamine depletion induced up-regulation of HCN3 enhances rebound excitability of basal ganglia output neurons." *Neurobiol Dis* 34(1): 178-188.
- Milanesi, R., et al. (2006). "Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel." *N Engl J Med* 354(2): 151-157.
- Mistrik, P., et al. (2005). "The murine HCN3 gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides." *J Biol Chem* 280(29): 27056-27061.
- Nerbonne, J. M., et al. (2005). "Molecular physiology of cardiac repolarization." *Physiol Rev* 85(4): 1205-1253.
- Neumann, E., et al. (1982). "Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields." *EMBO J* 1(7): 841-845.
- Nof, E., et al. (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.
- Noma, A., et al. (1976). "A time- and voltage-dependent potassium current in the rabbit sinoatrial node cell." *Pflugers Arch* 366(2-3): 251-258.
- O'Gorman, S., et al. (1991). "Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells." *Science* 251(4999): 1351-1355.
- Patel, C., et al. (2009). "Is there a significant transmural gradient in repolarization time in the intact heart? Cellular basis of the T wave: a century of controversy." *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2(1): 80-88.
- Santoro, B., et al. (1998). "Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain." *Cell* 93(5): 717-729.
- Sauer, B. (1994). "Site-specific recombination: developments and applications." *Curr Opin Biotechnol* 5(5): 521-527.
- Schulze-Bahr, E., et al. (2003). "Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease." *J Clin Invest* 111(10): 1537-1545.
- Shi, W., et al. (1999). "Distribution and Prevalence of Hyperpolarization-Activated Cation Channel (HCN) mRNA Expression in Cardiac Tissues." *Circ Res* 85(1): e1-6.
- Stieber, J., et al. (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(12): 7253-7258.



- A 100(25): 15235-15240.
- Stieber, J., et al. (2006). "Deletion of the cardiac pacemaker channel HCN4 in adult mice results in sinus node dysfunction with arrhythmia and repetitive asystolic phases." *Acta Physiologica* 186,supplement1: 62.
- Stieber, J., et al. (2004). "Pacemaker channels and sinus node arrhythmia." *Trends Cardiovasc Med* 14(1): 23-28.
- Stieber, J., et al. (2005). "Functional expression of the human HCN3 channel." *J Biol Chem* 280(41): 34635-34643.
- Stillitano, F., et al. (2008). "Molecular basis of funny current (If) in normal and failing human heart." *J Mol Cell Cardiol* 45(2): 289-299.
- Thollon, C., et al. (2007). "Use-dependent inhibition of hHCN4 by ivabradine and relationship with reduction in pacemaker activity." *Br J Pharmacol* 150(1): 37-46.
- Thorneloe, K. S., et al. (2001). "Transmural differences in rat ventricular protein kinase C epsilon correlate with its functional regulation of a transient cardiac K<sup>+</sup> current." *J Physiol* 533(Pt 1): 145-154.
- Ueda, K., et al. (2004). "Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia." *J Biol Chem* 279(26): 27194-27198.
- Wahl-Schott, C., et al. (2005). "An arginine residue in the pore region is a key determinant of chloride dependence in cardiac pacemaker channels." *J Biol Chem* 280(14): 13694-13700.
- Wainger, B. J., et al. (2001). "Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels." *Nature* 411(6839): 805-810.
- Wang, L. J., et al. (2008). "Mathematical model of the neonatal mouse ventricular action potential." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(6): H2565-2575.
- Xu, H., et al. (1999). "Attenuation of the slow component of delayed rectification, action potential prolongation, and triggered activity in mice expressing a dominant-negative Kv2 alpha subunit." *Circ Res* 85(7): 623-633.
- Xu, H., et al. (1999). "Four kinetically distinct depolarization-activated K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricular myocytes." *J Gen Physiol* 113(5): 661-678.
- Xu, H., et al. (1999). "Elimination of the transient outward current and action potential prolongation in mouse atrial myocytes expressing a dominant negative Kv4 alpha subunit." *J Physiol* 519 Pt 1: 11-21.
- Yan, G. X., et al. (1998). "Cellular basis for the normal T wave and the electrocardiographic manifestations of the long-QT syndrome." *Circulation* 98(18): 1928-1936.
- Yu, F. H., et al. (2004). "The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis." *Sci STKE* 2004(253): re15.
- Zagotta, W. N., et al. (2003). "Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels." *Nature* 425(6954): 200-205.
- Zhu, X. D., et al. (1995). "Cleavage-dependent ligation by the FLP recombinase. Characterization of a mutant FLP protein with an alteration in a catalytic amino acid." *J Biol Chem* 270(39): 23044-23054.

## 8 Anhang

### 8.1 Daten-Tabellen

**Tabelle 1: EKG-Parameter bei hohen Herzfrequenzen ( $600 \pm 10$  bpm)**

	Wildtyp	KO
PQ	$33,71 \pm 1,46$	$31,79 \pm 0,48$
QRS	$10,89 \pm 0,31$	$10,48 \pm 0,37$
QTp	$18,11 \pm 0,50,$	$14,32 \pm 0,76$
QT	$48,02 \pm 0,86$	$48,95 \pm 1,11$
ST	$38,14 \pm 0,78$	$39,48 \pm 1,01$
Tpe	$33,29 \pm 0,72$	$34,27 \pm 0,95$

**Tabelle 2: EKG-Parameter bei niedrigen Herzfrequenzen ( $460 \pm 12$  bpm)**

	Wildtyp	KO
PQ	$35,91 \pm 1,43$	$34,10 \pm 1,01$
QRS	$10,76 \pm 0,36$	$10,80 \pm 0,36$
QTp	$13,28 \pm 0,38$	$13,92 \pm 0,59$
QT	$53,10 \pm 2,11$	$59,20 \pm 1,70$
ST	$43,36 \pm 2,09$	$49,41 \pm 1,65$
Tpe	$38,99 \pm 2,15$	$44,90 \pm 1,62$

**Tabelle 3: Normalisierte T-Wellen-Amplitude bei hohen und niedrigen Herzfrequenzen**

	Wildtyp	KO
$600 \pm 10$ bpm	$0,14 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,03$
$460 \pm 12$ bpm	$0,12 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,03$

Tabelle 4: Aktionspotentialdauer epikardialer Zellen

	Wildtyp (n=18)	KO (n=32)
APD10	1,57 ± 0,06 ms	1,51 ± 0,06ms
APD25	2,09 ± 0,08 ms	1,89 ± 0,07 ms
APD50	3,91 ± 0,28 ms	3,00 ± 0,13 ms
APD75	9,03 ± 0,73 ms	6,27 ± 0,31 ms
APD90	33,95 ± 5,18 ms	19,19 ± 1,84 ms

Tabelle 5: Aktionspotentialdauer endokardialer Zellen

	Wildtyp (n=12)	KO (n=6)
APD10	1,67 ± 0,08 ms	1,94 ± 0,19 ms
APD25	2,92 ± 0,27 ms	3,34 ± 0,40 ms
APD50	8,05 ± 0,94 ms	8,47 ± 1,27 ms
APD75	21,07 ± 2,70 ms	23,24 ± 4,42 ms
APD90	78,68 ± 10,31 ms	102,14 ± 8,53 ms

Tabelle 6: Spannung der halbmaximalen Aktivierung von  $I_h$  in Kardiomyozyten

	Wildtyp		KO	
25 mM $K^+$	-110,71 ± 2,36 mV	5		
100 mM $K^+P$	-114,04 ± 1,25 mV	8	-108,52 ± 1,81 mV	6
100 mM $K^+$ (cAMP)	-105,38 ± 1,00 mV	11	-103,89 ± 1,25 mV	10

Tabelle 7: Stromdichte von  $I_h$  in Kardiomyozyten

	Wildtyp		KO	
100 mM $K^+$	-1,59 ± 0,15 pA/pF	45	-1,13 ± 0,14 pA/pF	28
100 mM $K^+$ (cAMP)	-1,42 ± 0,17 pA/pF	40	-1,45 ± 0,20 pA/pF	39

Tabelle 8: Normalisierte Stromamplitude von mHCN3, mHCN2 und hHCN4 in HEK293-Zellen

	mHCN3 (n=11)	mHCN2 (n=9)	hHCN4 (n=5)
100 mM K <sup>+</sup>	100 %	100 %	100 %
30 mM K <sup>+</sup>	58,37 ± 1,35 %	64,80 ± 1,70 %	65,27 ± 5,29 %
5 mM K <sup>+</sup>	17,22 ± 1,00 %	20,17 ± 1,50 %	24,47 ± 4,66 %

Tabelle 9: Spannung der halbmaximalen Aktivierung von mHCN3 in HEK293-Zellen

	mHCN3		mHCN3, 1mM cAMP	
5 mM K <sup>+</sup>	-96,98 ± 1,32185 mV	7		
30 mM K <sup>+</sup>	-97,23 ± 1,73634 mV	10	-98,27 ± 1,280 mV	6
100 mM K <sup>+</sup>	-107,11 ± 2,35475 mV	6		

Tabelle 10: Spannung der halbmaximalen Aktivierung von mHCN2 in HEK293-Zellen

	mHCN2		mHCN2, 1mM cAMP	
30 mM K <sup>+</sup>	-98,79 ± 0,79 mV	9	-92,11 ± 1,23 mV	9
100 mM K <sup>+</sup>	-108,61 ± 0,73 mV	4		

Tabelle 11: Spannung der halbmaximalen Aktivierung von hHCN4 in HEK293-Zellen

	hHCN4	
30 mM K <sup>+</sup>	-105,74 ± 2,13 mV	6
100 mM K <sup>+</sup>	-112,47 ± 1,56 mV	7

Tabelle 12: Umkehrpotential von mHCN3, mHCN2 und hHCN4 in HEK293-Zellen

	mHCN3 (n=8)	mHCN2 (n=4)	hHCN4 (n=8)
5 mM K <sup>+</sup>	-33.08 ± 1.19 mV	-34.28 ± 1.36 mV	-35.3 ± 0.69 mV

**Tabelle 13: Fraktion des verbleibenden Stromes nach Deaktivierung von mHCN3, mHCN2 und hHCN4 in HEK293-Zellen**

	<b>mHCN3 (n=8)</b>	<b>mHCN2 (n=4)</b>	<b>hHCN4 (n=8)</b>
<b>0,05 s</b>	95,064 ± 2,83 %	89,76 ± 3,49 %	96,79 ± 0,58
<b>1 s</b>	88,89 ± 2,17 %	52,32 ± 8,34 %	77,32 ± 1,64
<b>5 s</b>	77,84 ± 2,76 %	24,79 ± 9,51 %	58,26 ± 4,86

## 8.2 Verwendete Primer

### Genotypisierung der Mäuse

<b>A66F</b>	for	GAG CCA CGA CTA GAT GCT GAG	Wildtyp-Allel
<b>RM15F</b>	for	GCT CTA GAT TTG CCC AAC CTA	KO-Allel
<b>RM13R</b>	rev	ACA CCG TCT GAA CTG ATA AGA	Wildtyp- und KO-Allel

### RT-PCR mHCN1

<b>HCN1f6</b>	for	CTC TTT TTG CTA ACG CCG AT
<b>HCN1r7</b>	rev	CAT TGA AAT TGT CCA CCG AA

### RT-PCR mHCN2

<b>HCN2f4</b>	for	GTG GAG CGA GCT CTA CTC GT
<b>HCN2r5/6</b>	rev	GTT CAC AAT CTC CTC ACG CA

### RT-PCR mHCN3

<b>HCN3f6</b>	for	GAC ACC CGC CTC ACT GAT GGA T
<b>HCN3r8</b>	rev	GTT TCC GCT GCA GTA TCG AAT TC

### RT-PCR mHCN4

<b>HCN4f3</b>	for	GTA CGC ATC GTG AAC CTC ATT G
<b>HCN4r6</b>	rev	TTT CGG CAG TTA AAG TTG ATG

### RT-PCR GAPDH

<b>GAPDHf</b>	for	GGC AAA TTC AAC GGC ACA GTC
<b>GAPDhr</b>	rev	GTT TCT CCA GGC GGC ACG TCA

### 8.3 RT-PCR Protokolle

---

**RT-PCR-Protokoll mHCN1**

---

(1) cDNA-Synthese	55°C	30 min	
(2) Denaturierung	94°C	30 s	
(3) Primeranlagerung	52°C	30 s	40 Zyklen
(4) Elongation	68°C	30 s	
(5) finale Polymerisation	68°C	5 min	

---

---

**RT-PCR-Protokoll mHCN2**

---

(1) cDNA-Synthese	55°C	30 min	
(2) Denaturierung	94°C	30 s	
(3) Primeranlagerung	58°C	30 s	40 Zyklen
(4) Elongation	68°C	30 s	
(5) finale Polymerisation	68°C	5 min	

---

---

**RT-PCR-Protokoll mHCN3**

---

(1) cDNA-Synthese	55°C	30 min	
(2) Denaturierung	94°C	30 s	
(3) Primeranlagerung	61°C	30 s	40 Zyklen
(4) Elongation	68°C	30 s	
(5) finale Polymerisation	72°C	5 min	

---

---

**RT-PCR-Protokoll mHCN4**

---

(1) cDNA-Synthese	55°C	30 min	
(2) Denaturierung	94°C	30 s	
(3) Primeranlagerung	54°C	30 s	40 Zyklen
(4) Elongation	68°C	30 s	
(5) finale Polymerisation	68°C	5 min	

---

---

**RT-PCR-Protokoll GAPDH**

---

(1) cDNA-Synthese	55°C	30 min	
(2) Denaturierung	94°C	30 s	
(3) Primeranlagerung	55°C	30 s	21 Zyklen
(4) Elongation	68°C	30 s	
(5) finale Polymerisation	72°C	5 min	

---



## 8.4 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

---

Name	Stefanie Fenske geb. Worch
Adresse	Department Pharmazie Pharmakologie für Naturwissenschaften Ludwig-Maximilians-Universität München Butenandtstr. 5-13 81377 München Tel: +49 89 2180 77324 Mail: stefanie.fenske@cup.uni-muenchen.de
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Geburtsdatum	30. November 1978
Familienstand	Verheiratet

### Ausbildung

---

Seit 10/2006	Doktorandin im Labor von Prof. Martin Biel Pharmakologie für Naturwissenschaften Ludwig-Maximilians-Universität München
12/2005	Approbation als Apotheker
10/1999 - 10/2004	Pharmaziestudium, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
08/1989 - 06/1998	Gymnasium, Geschwister-Scholl-Schule, Konstanz

### Berufserfahrung

---

06/2005 - 11/2005	Praktisches Jahr: Bayer Health Care AG Institute for Cardiovascular Research, Dr. Felix Oehme Wuppertal
12/2004 - 05/2005	Praktisches Jahr: Birken-Apotheke, Köln
03/2003 - 05/2003	Studentische Hilfskraft im Labor von Prof. Klaus Aktories Department für Pharmakologie und Toxikologie Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

### Soziale Aktivitäten

---

09/1998 - 08/1999	Freiwilliges Ökologisches Jahr, Mainau GmbH, Insel Mainau
-------------------	---

## 8.5 Publikationen

**Fenske S**, Mader R., Scharr A, Pappas C, Cao-Ehlker X, Stylianou S, Shaltiel L, Weidinger M, Stieber J, Feil S, Feil R, Schneider A, Hofmann F, Wahl-Schott C, Biel M. HCN3 contributes to the ventricular action potential waveform in the murine heart. *Circulation* (eingereicht)

Zong X, Schieder M, Cuny H, **Fenske S**, Gruner C, Rötzer K, Griesbeck O, Harz H, Biel M, Wahl-Schott C. The two-pore channel TPCN2 mediates NAADP-dependent  $Ca^{2+}$ -release from lysosomal stores. *Pflugers Arch.* 2009 Sep; 458(5):891-9

**Fenske S**, Stieber J, Hofmann F, Biel M, Wahl-Schott C.A. HCN3 contributes to the ventricular repolarization in the mouse heart. *Naunyn-Smiedebergs-Archives of Pharmacology* 2010 Volume: 381 Suppl. 1. 51st Annual Meeting, German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, Mainz. Meeting Abstract: 214.

**Worch S**, Mader R, Michalakis S, Stieber J, Hofmann F, Wahl-Schott C, Biel M. HCN3 contributes to the ventricular action potential waveform in the mouse heart. *Naunyn-Smiedebergs-Archives of Pharmacology* 2008 Volume: 377 Suppl. 1. 49th Annual Meeting, German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, Mainz. Meeting Abstract: 259.

## 9 Danksagung

Diese Arbeit möchte ich meinem Mann und meinen Eltern widmen. Ohne ihre Unterstützung und Liebe wäre diese Arbeit kaum möglich gewesen.

Bei Herrn Prof. Dr. Martin Biel bedanke ich mich herzlich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die stets offene Tür für Probleme und Fragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Christian Wahl-Schott für die beste Betreuung die man sich vorstellen kann, die Einarbeitung in die Elektrophysiologie und die zahlreichen anregenden Diskussionen. Christian, wir hatten viele schöne Bastelstunden am Setup und ich hoffe, dass das weiterhin so sein wird, auch wenn ich niemals deine Vorliebe für Pernod teilen werde.

Bei Stelios möchte ich mich für das erste Jahr bedanken, auch wenn ich dann auf „Abwege“ geraten bin.

Christos, unserem Mäuseflüsterer und Andi, dem EKG-Mann, danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Suche nach HCN3.

Das gute Arbeitsklima, der lustige Laboralltag und auch die vielen privaten Unternehmungen haben immer mein Durchhaltevermögen gestärkt. Dafür möchte ich allen meinen Kollegen danken. Ohne Euch hätte ich wahrscheinlich schon lange den Kopf in den Sand gesteckt.

Verena, Katrin und Krissy, ich hoffe dass ich noch viele feucht-fröhliche SingStar-Abende mit euch verbringen kann, gerne auch in Bielefeld. Vielen Dank auch dafür, dass ihr mein etwas launenhaftes Wesen immer ertragen habt.

Elvirovici, dir danke ich für einen wunderschönen Urlaub. Und auch wenn ich dich nicht eingestellt hätte, bin ich wahnsinnig froh, dass du jetzt da bist.

Die wichtigsten werden immer zuletzt genannt... Prakti, Danke dass du dir immer mein Genörgel und Gemecker angehört hast und immer in der Lage warst mich wieder aufzumuntern.