

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



**UNTERSUCHUNG ZUR FUNKTION
DES HYPERPOLARISATIONS-AKTIVIERTEN
KATIONENKANALS HCN1 IM SINUSKNOTEN**

Stefanie Charlotte Krause

aus München

2013

Erklärung

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

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 16.09.2013

Stefanie Krause

Dissertation eingereicht am 20.09.2013

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

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Biel

mündliche Prüfung am 15.10.2013

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	12
3	MATERIAL UND METHODEN	13
3.1	Chemikalien, Lösungen und Puffer	13
3.2	Verwendete Mauslinie	13
3.3	RNA Isolation und Mikroarray-Analyse	13
3.4	Proteinisolation und Westernblot	14
3.5	Histochemie	15
3.5.1	Herstellung von Cryoschnitten	15
3.5.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	15
3.5.3	Immunhistochemie von Cryoschnitten	15
3.5.4	Immunhistochemie von Sinusknotenpräparationen	16
3.6	Isolation von Sinusknotenzellen	17
3.7	Elektrophysiologie an isolierten Sinusknotenzellen	19
3.7.1	Experimentelle Durchführung	19
3.7.2	Patch-Clamp Protokolle und Datenanalyse	19
3.7.3	Lösungen für die Elektrophysiologie	21
3.8	Präparation von Sinusknotenpräparationen	22
3.9	Mikroelektrodenmessungen an Sinusknotenpräparationen	23
3.9.1	Experimentelle Durchführung	23
3.9.2	Mikroelektroden Protokolle und Datenanalyse	23
3.9.3	Lösungen für Mikroelektroden Messungen	24
3.10	Langendorff-Herzen	25
3.11	EKG	26
3.11.1	EKG-Messungen	26

3.11.2	Analyse der Herzfrequenzvariabilität	27
3.12	Intrakardiale elektrophysiologische Untersuchung	28
3.12.1	Experimentelle Durchführung	28
3.12.2	Stimulationsprotokolle	30
3.13	Echokardiographie und Messungen des arteriellen Blutdrucks	35
3.14	Statistische Analyse	35
4	ERGEBNISSE	36
5	DISKUSSION	62
6	ZUSAMMENFASSUNG	69
7	REFERENZEN	71
8	ANHANG	76
8.1	Daten-Tabellen	76
8.2	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
8.3	Publikationen	84
9	DANKSAGUNG	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

1 Einleitung

Im Laufe eines Lebens schlägt das menschliche Herz über drei Milliarden Mal und pumpt über 200 Millionen Liter Blut durch den Körper. Erst die regelmäßige Kontraktion des Herzens kann eine ausreichende Versorgung des gesamten Kreislaufs und aller Organe mit Sauerstoff und Nährstoffen gewährleisten. Der Schrittmacher für den Herzschlag ist der Sinusknoten. Er besteht aus einer kleinen Ansammlung von spezialisierten Schrittmacherzellen und befindet sich im rechten Vorhof an der Einmündung der Vena cava superior in den Vorhof (Abb. 1).

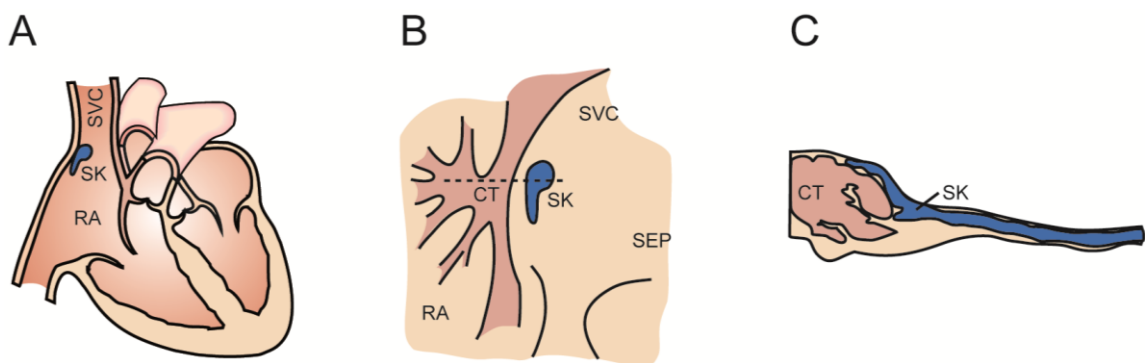


Abb. 1: Lokalisation des Sinusknotens (SK, blau) im Herzen (A) und in einer rechtsatrialen Präparation (B). Gestrichelte Linie zeigt Schnittebenen für die Darstellung der Sinusknotenregion in (C). RA: rechtes Atrium; SVC: Vena cava superior; CT: Crista terminalis; SEP: Septum

Sinusknotenzellen haben die besondere Fähigkeit, spontan Aktionspotentiale zu bilden und müssen im Gegensatz zu Herzmuskelzellen nicht durch die Depolarisation benachbarter Zellen stimuliert werden. So bleibt das Membranpotential zwischen zwei Aktionspotentialen in Schrittmacherzellen nicht konstant (Abb. 2A). Am Ende der Repolarisation bewirkt die Öffnung von spannungsabhängigen Ionenkanälen einen Einstrom von Natriumionen, wodurch das Membranpotential langsam wieder angehoben wird. Diese für das Aktionspotential von Sinusknotenzellen charakteristische Phase wird langsame diastolische Depolarisation (SDD, slow diastolic depolarization) genannt. Die diastolische Depolarisation sorgt nach einem Aktionspotential dafür, dass das Schwellenpotential für die Öffnung von Kalziumkanälen wieder erreicht wird und ein neues Aktionspotential entsteht. Die

Steigung der diastolischen Depolarisation bestimmt somit die Feuerfrequenz der Schrittmacherzellen. Neben dem direkten Einfluss der membranständigen, spannungsabhängigen Ionenkanäle auf das Membranpotential (Voltage-Clock) gibt es noch einen anderen Ansatz, den Schrittmachermechanismus zu erklären (Abb. 2B) (Lakatta et al, 2010; Mangoni & Nargeot, 2008).

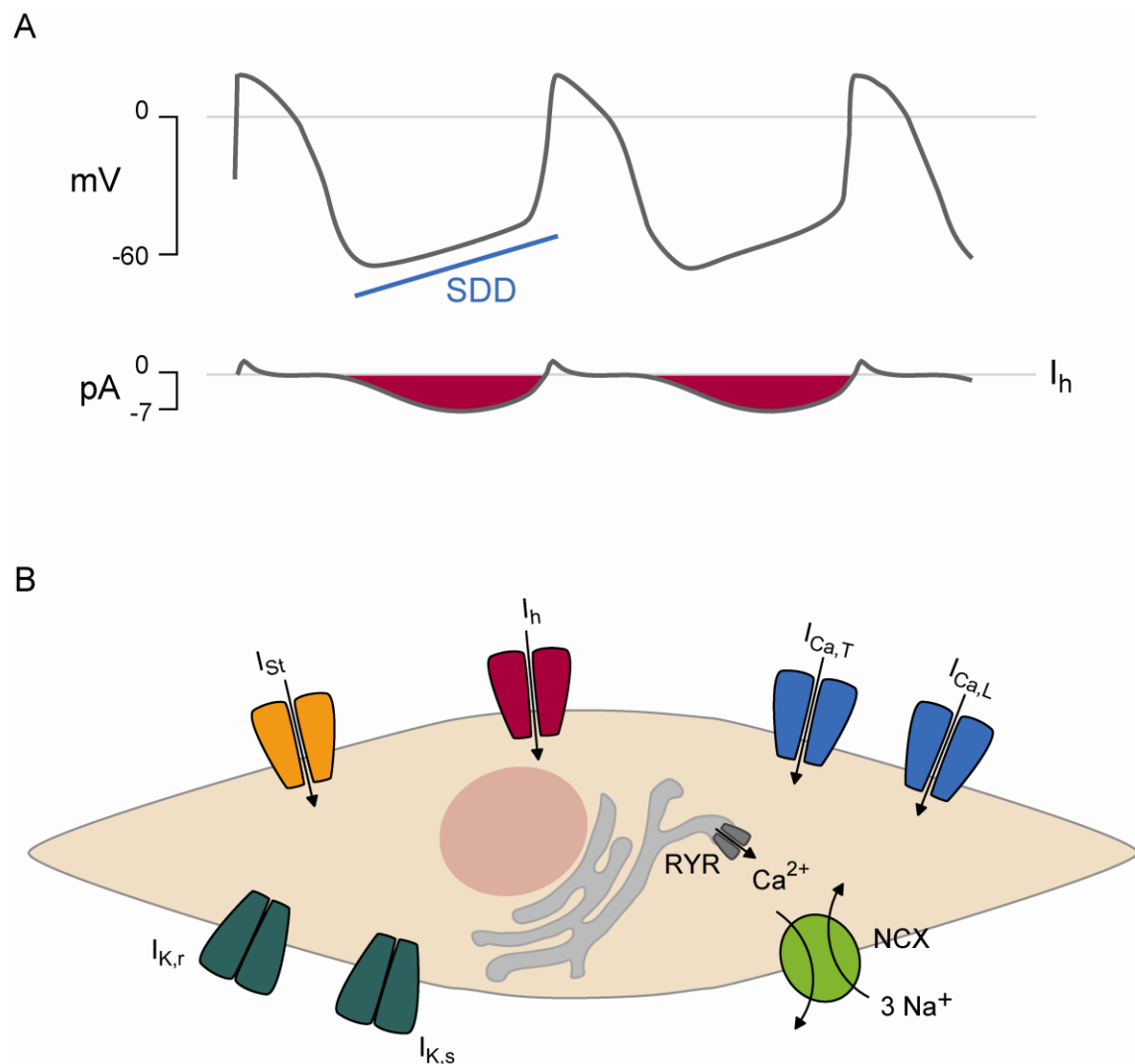


Abb. 2: (A) Schematische Darstellung von Schrittmacherpotentialen des Sinusknotens. Oben: Charakteristisch für die Aktionspotentiale der Sinusknotenzellen ist die langsame diastolische Depolarisation (SDD, slow diastolic depolarization). Unten: Zeitlicher Verlauf der I_f Stromamplitude während eines Aktionspotentials im Sinusknoten. (B) An der diastolischen Depolarisation beteiligte Ionenkanäle und Ca^{2+} -Clock. I_{st} : *sustained inward current*; $I_{Ca,T}$, $I_{Ca,L}$: T-, L-Typ Kalziumstrom; $I_{K,r}$, $I_{K,s}$: spannungsabhängiger auswärtsgerichteter Kaliumstrom; NCX: Natrium-Kalzium-Austauscher

Dieser Mechanismus wird als Ca^{2+} -Clock bezeichnet. Es wird postuliert, dass dem Aktionspotential ein unabhängiger lokaler Kalziumausstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum durch Ryanodin-Rezeptoren vorausgeht. Die Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels aktiviert den Natrium-Kalziumaustauscher ($3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$). Da dieser einen Netto-Einwärtsstrom erzeugt, bewirkt er ebenfalls eine Depolarisation der Zellmembran und kann somit auch ein Aktionspotential auslösen. Eine Stimulation des Sympathikus erhöht die intrazelluläre cAMP Konzentration in Sinusknotenzellen. Zyklisches AMP kann sowohl direkt als auch indirekt über die Stimulation von Proteinkinase A die Offenwahrscheinlichkeit von Ionenkanälen, die an der diastolische Depolarisation beteiligt sind, erhöhen. Dadurch wird die diastolische Depolarisation beschleunigt und die Herzfrequenz gesteigert (Abb. 3). Dagegen bewirkt die Aktivierung des Parasympathikus eine Abnahme des intrazellulären cAMP Spiegels, was sich in einer verringerten Herzfrequenz äußert.

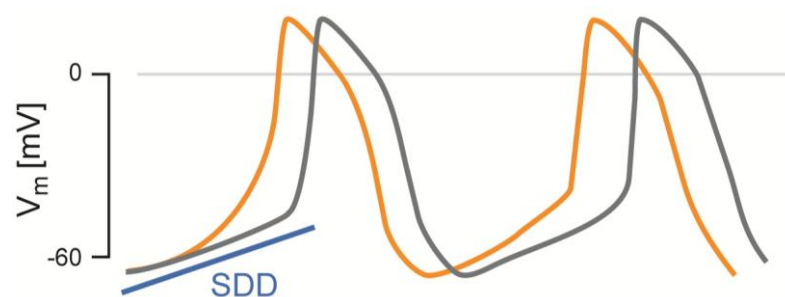


Abb. 3: Beta-adrenerge Stimulation (orange) führt durch die Aktivierung von Ionenkanälen zu einer schnelleren diastolischen Depolarisation (SDD) und damit zu einem Anstieg der Herzfrequenz.

Eine besondere Rolle unter den spannungsabhängigen Ionenströmen spielt der Hyperpolarisations-aktivierte Strom I_h , weil der für diesen Strom verantwortliche Ionenkanal am Ende der Repolarisationsphase durch Hyperpolarisation der Zellmembran aktiviert wird und einen depolarisierenden Strom leitet (Abb. 2A). Bei diesem Strom handelt es sich um einen von Natrium- und Kaliumionen getragenen Kationenstrom, der durch zyklische Nukleotide moduliert wird (DiFrancesco, 1986; DiFrancesco & Tortora, 1991; Ludwig et al, 1998). Auf Grund seiner ungewöhnlichen Eigenschaften wird der hyperpolarisations-aktivierte Strom auch als „funny current (I_f)“

bezeichnet. Die Ionenkanäle, die diesen Strom leiten, werden entsprechend Hyperpolarisations-aktivierte Zyklonukleotid-regulierte Kationenkanäle (HCN, hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated cation channel) genannt. Innerhalb der HCN Familie gibt es vier verschiedene Isoformen (HCN1-4). Jeder HCN-Kanal besteht aus vier Untereinheiten, die zusammen eine zentrale Pore bilden. HCN-Kanäle können *in vitro* entweder als Homomere oder Heteromere vorliegen (Much et al, 2003). Es ist allerdings unklar, ob HCN Kanäle auch *in vivo* Heteromere bilden und wie diese stöchiometrisch zusammengesetzt sind. Der membranständige Teil einer Untereinheit besteht aus sechs α -helikalen Transmembransegmenten (Abb. 4). Sowohl der N- als auch der C-Terminus sind intrazellulär lokalisiert. Der C-Terminus von HCN-Kanälen enthält eine Bindungsstelle für zyklische Nukleotide (CNBD, cyclic nucleotide binding domain), welche über einen C-Linker mit dem sechsten Transmembransegment verbunden ist (Zagotta et al, 2003). Der Spannungssensor von HCN-Kanäle enthält, wie der aller spannungsabhängigen Ionenkanäle der Pore-Loop Kationenkanal-Superfamilie, positiv geladene Arginin- und Lysinreste (Yu & Catterall, 2004). Diese neun positiv geladenen Aminosäurereste befinden sich im vierten Transmembransegment jeweils in einem Abstand von drei Aminosäuren. Die Pore der HCN-Kanäle befindet sich zwischen dem fünften und sechsten Transmembransegment und enthält einen für Kaliumkanäle typischen Selektivitätsfilter mit der Signalsequenz aus den Aminosäuren Glyzin-Tyrosin-Glyzin (GYG) (Doyle et al, 1998). Überraschenderweise ist die Permeabilität für Kalium im Gegensatz zu anderen Kaliumkanälen aber nur viermal höher als die für Natrium.

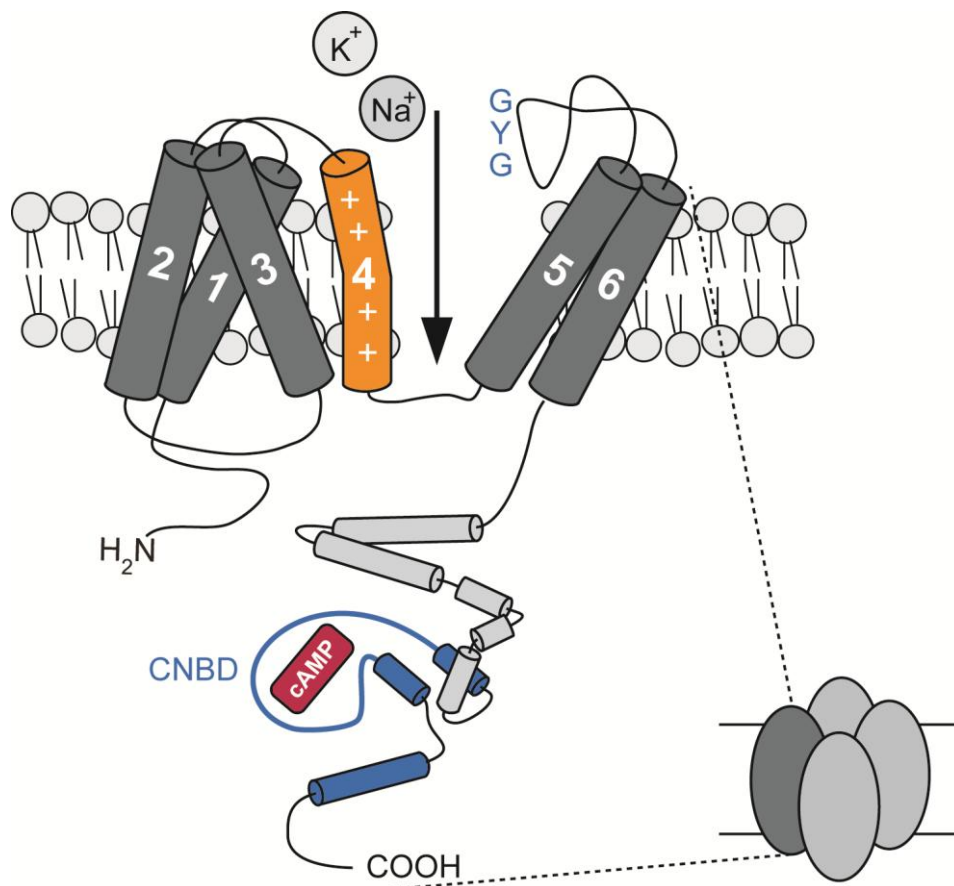


Abb. 4: Struktur der HCN-Kanäle: HCN Kanäle bestehen aus vier Untereinheiten. Jede Untereinheit besteht aus sechs α -helikalen Transmembransegmenten (S1-S6). N- und C-Terminus sind intrazellulär lokalisiert. Das vierte Transmembransegment stellt den Spannungssensor der HCN-Kanäle dar. Zwischen dem fünften und sechsten Transmembransegment befindet sich die Porenregion. Sie enthält den Selektivitätsfilter (GYG). Der C-Terminus besteht aus dem C-Linker und einer Bindungsdomäne für zyklische Nukleotide (CNBD, cyclic nucleotide binding domain).

Das Öffnen der Pore wird durch zwei Vorgänge gesteuert („duales gating“). Primär führt eine Hyperpolarisation der Zellmembran zu einer Bewegung des Spannungssensors in der Membran. Diese wird auf den S4-S5 Linker übertragen und bewirkt eine Öffnung der Pore (Decher et al, 2004; Prole & Yellen, 2006). Zusätzlich kann eine Bindung von cAMP an die CNBD die spannungsabhängige Aktivierung der HCN-Kanäle beeinflussen (DiFrancesco & Tortora, 1991). Es wird angenommen, dass in Abwesenheit von cAMP die C-Termini der einzelnen Untereinheiten hauptsächlich als Monomere vorliegen und eine autoinhibitorische Domäne bilden, die die Öffnungswahrscheinlichkeit des HCN Kanals herabsetzt. Erst eine Bindung von cAMP an die CNBD bewirkt eine Tetramerisierung der C-Termini, wodurch der hemmende Effekt der

C-Termini aufgehoben und die Öffnung des Kanals erleichtert wird (Lolicato et al, 2011; Zagotta et al, 2003). Das bedeutet, dass die Bindung von cAMP zu einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurve zu positiveren Potentialen führt. Deshalb sind bei gleichem Potential mehr HCN-Kanäle offen, die mehr depolarisierenden Strom leiten können.

In Studien am Menschen, an der Maus und an der Ratte wurde gezeigt, dass in allen Organismen der HCN4 Kanal für 70-80% des I_f in Sinusknotenzellen verantwortlich ist (Gaborit et al, 2007; Moosmang et al, 2001; Shi et al, 1999). Der HCN3 Kanal wird zwar im Herzen exprimiert und trägt dort zur Repolarisation des Ventrikels bei, im Sinusknoten konnte aber keine relevante Proteinexpression des HCN3 Kanals gefunden (Fenske et al, 2011) werden. Bisher wurde angenommen, dass im Sinusknoten der Maus der restliche Strom vom HCN2 Kanal geleitet wird und der HCN1 Kanal nur eine untergeordnete Rolle spielt (Ludwig et al, 2003). In Studien zur HCN Kanal Expression im Herzen wurde im Sinusknoten der Maus aber nicht nur das Transkript von HCN4 und HCN2, sondern auch das von HCN1 detektiert. Obwohl das HCN1 Transkript 20-30% (Herrmann et al, 2011; Shi et al, 1999) des gesamten HCN Transkripts ausmacht, konnte lange Zeit keine korrespondierende HCN1 Proteinexpression nachgewiesen werden (Baruscotti et al, 2011). Erst eine detaillierte Analyse der Lokalisation der einzelnen HCN Isoformen im kardialen Reizleitungssystem der Maus zeigte eine eindeutige Expression des HCN1 Kanals im Sinusknoten (Herrmann et al, 2011).

Die Funktion von HCN2 und HCN4 Kanälen im Sinusknoten wurde in verschiedenen Studien mit Hilfe genetisch veränderter Mausmodelle intensiv untersucht. Die Deletion des HCN4 Kanals hat in Mäusen einen ausgeprägten kardialen Phänotyp zur Folge. So ist sowohl die globale als auch die herzspezifische Deletion des HCN4 Kanals in Mäusen letal (Stieber et al, 2003). Die Mäuse sterben während der Embryonalentwicklung zwischen dem 9,5. und dem 11,5. Tag der Schwangerschaft. Isolierte embryonale Herzen von HCN4^{-/-}-Mäusen zeigen keine morphologischen Auffälligkeiten, schlagen jedoch signifikant langsamer als die der gleichaltrigen Wildtyp-Embryonen. Die Herzfrequenz kann durch die Zugabe von cAMP nicht gesteigert werden. Die

vergleichende Analyse der Aktionspotentiale einzelner Kardiomyozyten aus HCN4^{-/-}- und Wildtyp-Embryonen am Tag E9 zeigte, dass die HCN4^{-/-}-Zellen nur in der Lage sind „unreife“ embryonale Aktionspotentiale zu bilden. Die Wildtyp-Zellen können in diesem Stadium hingegen „reife“ Aktionspotentiale generieren, die den adulten Schrittmacherpotentialen sehr ähnlich sind. Zusammen mit der Fähigkeit die Herzfrequenz zu steigern scheinen diese „reifen“ Aktionspotentiale notwendig für die Entwicklung des Embryos zu sein.

Um die Funktion des HCN4 Kanals im Sinusknoten der adulten Maus aufzuklären, muss das Problem der embryonalen Letalität umgangen werden. Es wurden unabhängig voneinander zwei induzierbare Knockout Mauslinien generiert, in denen die Tiere während der gesamten Entwicklung den HCN4 Kanal besitzen und die Deletion des Kanals erst in der adulten Maus induziert wird (Baruscotti et al, 2011; Herrmann et al, 2007). Da die Untersuchungen der beiden Mauslinien zu unterschiedlichen Ergebnissen führten, ist die Funktion des HCN4 Kanals unklar.

In einer der Studien sind adulte Mäuse nach der Deletion des Kanals lebensfähig und weisen eine normale Herzfrequenz auf (Herrmann et al, 2007). Auffällig sind jedoch Episoden von wiederkehrenden Sinuspausen während der Ruhephasen der Mäuse. Während Aktivitätsphasen oder nach pharmakologischer Stimulation mit Isoprenalin verringert sich die Häufigkeit der auftretenden Sinuspausen. In der Phase nach der Isoprenalininjektion, während des Übergangs vom aktivierten in den basalen Zustand, vervierfacht sich dagegen die Anzahl der auftretenden Sinuspausen. Dieser Effekt zeigt sich auch nach der Applikation des Muskarinrezeptoragonisten Carbachol oder des A1 Adenosinrezeptoragonisten CCPA (Chlorocyclopentyladenosin). Überraschend ist die Tatsache, dass die Regulation der Herzfrequenz durch Stimulation des Sympathikus durch die Deletion des HCN4 Kanals nicht beeinträchtigt ist. Die Autoren folgerten, dass in Situationen, in denen sich die Herzfrequenz senkt und das maximale diastolische Potential sinkt, der depolarisierende I_f gegensteuert und das Membranpotential in einem Bereich hält, in dem eine regelmäßige Bildung von Aktionspotentialen möglich ist. So spielt der HCN4 Kanal für die beta-adrenerge

Modulation der Herzfrequenz keine Rolle, ist aber für einen stabilen Sinusrhythmus in kritischen Phasen von Bedeutung.

Die Analyse eines anderen Mausmodells zeigte jedoch, dass diese HCN4^{-/-}-Mäuse eine schwerwiegende Bradykardie sowie einen AV-Block entwickeln (Baruscotti et al, 2011). Dieser führt fünf Tage nach der Induktion des herzspezifischen Knockouts zum Herzstillstand und Tod der HCN4^{-/-}-Mäuse. Nach beta-adrenerger Stimulation mit Isoprenalin ist die Herzfrequenz in den HCN4^{-/-}-Mäusen verglichen mit den Wildtyp-Mäusen signifikant niedriger. Die relative Steigerung der Herzfrequenz ist aber in HCN4^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen gleich. Somit zeigt auch diese Studie, dass der HCN4 Kanal für die Regulation der Herzfrequenz nicht von Bedeutung ist, aber im Gegensatz zum vorher beschriebenen induzierbaren Mausmodell in der adulten Maus für die Impulststehung und -weiterleitung unabdingbar ist.

Der Grund für diese widersprüchlichen Ergebnisse der beiden Studien ist bisher ungeklärt. Vermutet wird, dass die Verwendung verschiedener Promotoren der benutzten Cre-Mauslinie für die abweichenden Ergebnisse verantwortlich ist (Baruscotti et al, 2011). Eine andere Erklärung wäre, dass die beiden HCN4 Knockouts auf die Funktion der anderen Isoformen einen unterschiedlichen Effekt haben (Herrmann et al, 2012). In der Studie von Herrmann und Kollegen (Herrmann et al, 2007) ähnelt die Aktivierungskinetik des Reststroms in isolierten Sinusknotenzellen einer Kombination aus HCN1 und HCN2 Kanälen. Im Gegensatz dazu führt die Deletion des HCN4 Kanals in der Studie von Baruscotti et al. (Baruscotti et al, 2011) zu einer deutlichen Reduktion des gesamten I_f und die Kinetik des verbleibenden Stroms unterscheidet sich nicht von der des Wildtyp-Stroms. Deshalb wird vermutet, dass in der Studie von Baruscotti et al. (Baruscotti et al, 2011) die HCN4 Deletion durch Heteromerisierung mit den anderen Isoformen einen dominant negativen Effekt hat.

Interessanterweise zeigte eine kürzlich erschienene Publikation, dass die herzspezifische Deletion des Transient Receptor Potential Melastatin 7 (TRPM7) in der Maus zu einem ähnlichen Phänotyp führt, wie er von Herrmann und Kollegen (Herrmann et al, 2007) in der HCN4^{-/-}-Maus beobachtet wurde (Sah et al, 2013). Die

Deletion des TRPM7 hat keinen Einfluss auf die basale Herzfrequenz, hat aber ein gehäuftes Auftreten von Sinuspausen und AV-Blocks zur Folge. Bei TRPM7 handelt es sich um einen Ionenkanal, der Kalzium leitet und in die diastolische Depolarisation involviert sein könnte. Da er aber durch physiologische Magnesiumspiegel inaktiviert ist, ist ein indirekter Mechanismus wahrscheinlicher. Die Analyse der Expressionslevel von für die Automatie des Sinusknoten wichtiger Ionenkanäle, zeigt eine deutliche Reduktion des HCN4 Kanal Transkripts im Sinusknoten. Diese Reduktion hat einen verringerten I_f zur Folge. Die Autoren folgerten, dass TRPM7 die Transkription des HCN4 Gens reguliert. Der reduzierte I_f soll für den beobachteten Phänotyp verantwortlich sein. Der genaue Regulationsmechanismus ist aber noch nicht aufgeklärt.

Bislang sind sechs humane Mutationen des HCN4-Gens bekannt. Diese führen zu erblich bedingten Funktionsstörungen des Kanals, die als „Channelopathien“ bezeichnet werden. Alle betroffenen Patienten sind heterozygote Träger dieser Mutationen. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die homozygote Ausprägung der Mutationen wie in dem zuvor beschriebenen Mausmodell (Stieber et al, 2003) nicht lebensfähig ist. Im Gegensatz zu den beschriebenen HCN4 Knockout Mäusen, bei denen die Herzfrequenzregulation durch die Deletion des HCN4 Kanals nicht beeinflusst wird, führt der Verlust der cAMP-abhängigen Modulation des HCN4 Kanals (Mutation 573X) zu einer chronotropen Inkompetenz (Schulze-Bahr et al, 2003). Weitere Mutation können zu einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurve in Richtung negativerer Potentiale (Duhme et al, 2012; Laish-Farkash et al, 2010; Milanesi et al, 2006; Nof et al, 2007) oder zu einer verringerten Oberflächenexpression des HCN4 Kanals (Ueda et al, 2004) führen. Menschen, die von diesen Mutationen betroffen sind, leiden unter einer Sinusbradykardie.

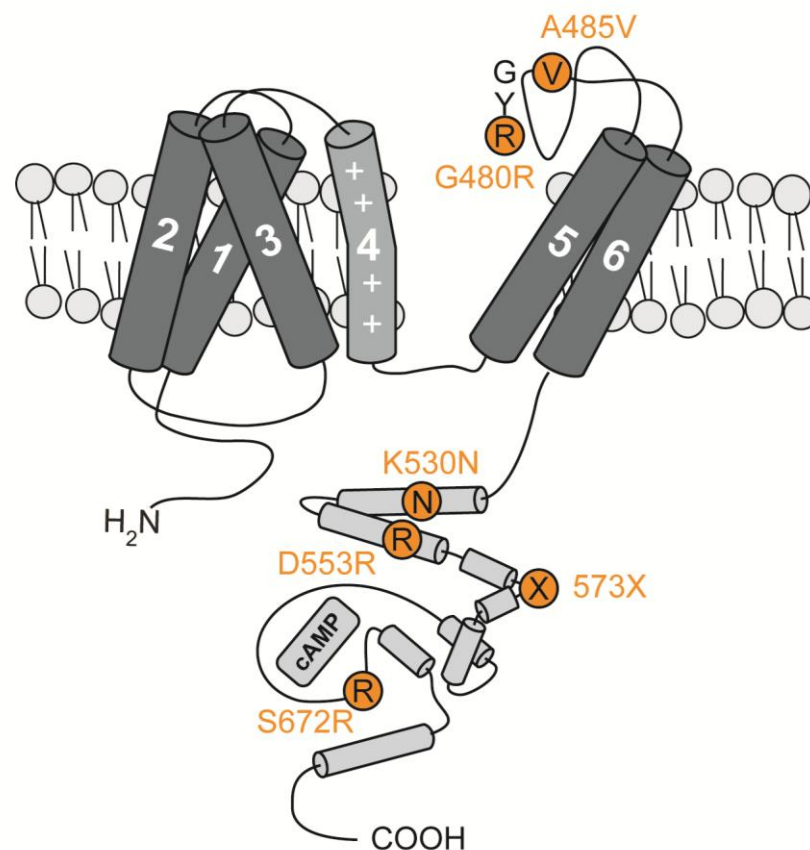


Abb. 5: Lokalisation der sechs bekannten humanen Mutationen des HCN4 Kanals. Die Mutationen führen zu einem Verlust der cAMP-abhängigen Modulation (573X), zu einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurve in Richtung negativerer Potentiale (S672R, G480R, A485V und K530N) oder zu einer verringerten Oberflächenexpression des HCN4 Kanals (D553R).

Neben dem HCN4 Kanal spielen auch andere HCN Kanäle im Sinusknoten eine Rolle. Um die Funktion des verglichen mit dem HCN4 Kanal wesentlich geringer exprimierten HCN2 Kanal im Sinusknoten zu untersuchen, wurde der kardiale Phänotyp von HCN2^{-/-}-Mäusen analysiert. Sowohl der globale als auch der herzspezifische Knockout des HCN2 Kanals führt zu einer Sinusdysrhythmie, die sich nur während der Ruhephasen der Mäuse zeigt (Ludwig et al, 2003). Wie schon in dem induzierbaren HCN4-Model (Herrmann et al, 2007) bleibt die durchschnittliche Herzfrequenz sowie die autonome Regulation der Herzfrequenz von der Deletion des HCN2-Gens unbeeinträchtigt. Somit ist der HCN2 Kanal für einen stabilen Sinusrhythmus in Ruhe, nicht aber für die Regulation der Herzfrequenz, nötig.

Da die Deletion des HCN2 Kanals eine Reduktion des I_f um ungefähr 30% zur Folge hat, wurde davon ausgegangen, dass HCN2 neben HCN4 hauptverantwortlich für I_f im murinen Sinusknoten ist. Dem HCN1 Kanal wurde deshalb bislang keine große Rolle im Sinusknoten zugeschrieben und der kardiale Phänotyp der HCN1^{-/-}-Maus nicht untersucht. Die bisherigen Studien zur Funktion des HCN1 Kanals konzentrieren sich auf die in neuronalen Strukturen. Die Deletion des HCN1 Kanals führt in Mäusen unter anderem zu einer Beeinträchtigung des motorischen Lernens, zu einem verbesserten räumlichen Lernen und Gedächtnis sowie zu einer schweren Ausprägung von epileptischen Anfällen (Nolan et al, 2004; Nolan et al, 2003; Santoro et al, 2010).

HCN1 nimmt unter allen im Sinusknoten relevanten HCN Isoformen auf Grund seiner besonderen biophysikalischen Eigenschaften eine Sonderrolle ein. Innerhalb der HCN Kanal Familie ist er der Kanal mit der schnellsten Aktivierungskinetik (Moosmang et al, 2001). Bezüglich seiner spannungsabhängigen Aktivierung und seiner Sensitivität gegenüber cAMP unterscheidet er sich deutlich von dem HCN2 und HCN4 Kanal (Biel et al, 2009). Die Bindung von cAMP an die CNBD bewirkt in HCN2 und HCN4 Kanälen eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurve zu positiveren Potentialen. Der HCN1 Kanal wird dagegen in wesentlich geringerem Maße von einem Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration beeinflusst. Die spannungsabhängige Aktivierungskurve des HCN1 Kanals wird durch cAMP nicht zu positiveren Potentialen hin verschoben, aber sie befindet sich unter basalen Bedingungen schon im gleichen Bereich wie die des HCN2 oder HCN4 Kanals in Anwesenheit von cAMP. Es wird angenommen, dass ein Großteil der C-Termini des HCN1 Kanals schon im Grundzustand cAMP gebunden haben und eine tetramere Struktur bilden (Lolicato et al, 2011). Dadurch üben sie keinen inhibitorischen Effekt auf die Kanalöffnung aus und die spannungsabhängige Aktivierungskurve befindet sich unter basalen Bedingungen bei positiveren Potentialen. Eine Erhöhung der cAMP Spiegel führt nur noch zu einer sehr leichten Verschiebung der Aktivierungskurve, da nur noch ein kleiner Teil an HCN1 Kanälen tetramerisiert. Eine kürzlich veröffentlichte Studie gibt allerdings einen Hinweis darauf, dass der HCN1 Kanal in postsynaptischen Neuronen des Hippocampus in einem gewissen Ausmaß durch cGMP reguliert werden kann (Neitz et al, 2013).

2 Zielsetzung der Arbeit

Sowohl die Funktion des HCN4 als auch die des HCN2 Kanals wurde mittels genetisch veränderter Mausmodelle analysiert (Herrmann et al, 2007; Ludwig et al, 2003; Stieber et al, 2003). Im Gegensatz dazu wurde die genaue Rolle des HCN1 Kanals im Sinusknoten bislang nicht untersucht. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit der kardiale Phänotyp einer HCN1-defizienten Mauslinie analysiert werden. Die HCN1 Proteinexpression im Sinusknoten sollte mit Hilfe von Western Blot und Immunhistochemie überprüft werden. Um den Anteil von HCN1 am I_f und die Funktion des HCN1 in der Automatie des Sinusknoten zu bestimmen, sollte die I_f Stromdichte und die Feuerfrequenz isolierter Sinusknotenzellen von HCN1^{-/-} und Wildtyp-Mäusen ermittelt werden. Im Anschluss sollte mit Hilfe von Mikroelektrodenmessungen an Sinusknotenpräparationen überprüft werden, ob sich in Einzelzellen beobachtete Unterschiede auf den Gewebeverband des Sinusknotens übertragen lassen und ob der HCN1 Kanal zusätzliche Aufgaben hat, die sich nur im Zellverband äußern. Um den kardialen Effekt der HCN1 Deletion in der ganzen Maus zu analysieren, sollten EKGs an Wildtyp- und HCN1^{-/-}-Mäusen durchgeführt werden. Mittels einer intrakardialen elektrophysiologischen Untersuchung sollten im EKG beobachtete Auffälligkeiten im Erregungsleitungssystem genauer betrachtet werden. Die Konsequenzen des kardialen Phänotyps sollten mit Blutdruckmessungen und Herzechokardiographie analysiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck, Roth und Sigma-Aldrich 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 HCN1-Gen mittels einer Cre/loxP-basierten Strategie deletiert wurde. Zur Deletion wurde das Exon 4 ausgewählt, welches für die Porenregion und das Transmembransegment 6 kodiert (Nolan 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 stammten. Sie wurden mit einem genetisch gemischtem Hintergrund aus den Stämmen 129SvJ und C57-Bl6/N gezüchtet. Die Tiere erhielten Futter und Wasser ad libidum und lebten in einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus.

3.3 RNA Isolation und Mikroarray-Analyse

Für die Mikroarray-Analyse wurden die Sinusknoten von drei Wildtyp- und drei HCN1^{-/-}-Mäusen präpariert. Die RNA Isolation und die Mikroarray-Analyse wurde kommerziell durchgeführt (MFT Services, Tübingen).

3.4 Proteinisolation und Westernblot

Für die Proteinisolation wurden 6 Wildtyp- und 6 HCN1^{-/-}-Sinusknoten isoliert. Das Gewebe wurde auf Trockeneis mit einem Mörser pulverisiert und in Lysepuffer (2 % SDS, 50 mM TRIS) bei 95°C inkubiert. Die Denaturierung erfolgte durch Inkubation in Lämmli-Probenpuffer mit DTT bei 97°C. Die Proteine wurden in einer Elektrophoreseapparatur (Protean 3, Biorad) bei 100 V aufgetrennt. 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 einem vorgekühlten Transferpuffer für eine Stunde bei 100 V und maximal 300 mA durchgeführt. Nachdem die Membran für eine Stunde mit 5% Milchpulver blockiert wurde, wurde sie im primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Primärantikörper dienten α -HCN1 (1:1000, Maus, Abcam, United Kingdom), α -HCN2 (1:500, Hase, (Ludwig et al, 2003)) und α -HCN4 (1:500, Ratte, Santa Cruz Biotechnology, USA). Zur Detektion der Ladekontrolle Tubulin wurde α -Tubulin (1:2000, Maus, Dianova, Deutschland) verwendet. Am nächsten Tag erfolgte eine Stunde lang die Inkubation mit den entsprechenden sekundären, peroxidasegekoppelten Antikörpern bei Raumtemperatur. Danach wurden die Antikörper mit Hilfe des ECL-Kits (Santa Cruz Biotechnology) durch Chemolumineszenz mit dem Chemidoc (Biorad) detektiert.

3.5 Histochemie

3.5.1 Herstellung von Cryoschnitten

Isolierte Herzen von 12 Wochen alten Wildtyp- und HCN1^{-/-}-Mäusen wurden für 2 h in 4% PFA fixiert und über Nacht in 30% Sucrose eingelegt. Am nächsten Tag wurden die Herzen in RFM Tissue Freezing Medium (Electron Microscopy Sciences) eingebettet. Der Sinusknoten und ihn umgebendes atriales Gewebe wurden direkt nach der Präparation auf Tockeneis eingebettet. Die eingebetteten Herzen wurden mit einem Kryotom (LEICA CM 3050 S) in einer Dicke von 16 µm geschnitten und auf Glas-Objektträger (SuperFrost Plus, Fa. Menzel) geschmolzen. Die Schnittdicke der Sinusknotenschnitte betrug 10 µm. Die Objektträger wurden für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und bei -20°C gelagert.

3.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Cryoschnitte wurden mit 2% Paraformaldehyd fixiert. Danach wurden die Schnitte bei 60°C getrocknet. Die Färbung erfolgte mit Mayers Hämalaunlösung (Merck) und 1% Eosin G (Sigma). Nach der Färbung wurden die Schnitte mit Entellan Neu Mounting Medium (Merck) und einem Deckglas luftdicht versiegelt.

3.5.3 Immunhistochemie von Cryoschnitten

Die Cryo-Gewebeschnitte wurden mit 4% PFA fixiert. Permeabilisierung und Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde mit 0,4% Saponin, 5% Normal Goat Serum (NGS, Vector Laboratories) und 1% Bovines Serum Albumin (BSA) in PBS für eine Stunde durchgeführt. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C mit α-HCN1 (1:500; Alomone labs, Israel) und α-HCN4 (1:200, Santa Cruz Biotechnology, USA) Antikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper dienten Alexa488-konjugierter α-rabbit und Alexa555-konjugierter α-rat (1:800; Invitrogen, Germany). Mit dem wässrigen Einbett-

Medium Permafluor (Thermo Scientific) wurden die Schnitte eingedeckelt und mit einem Konfokal-Mikroskop (LEICA TCS SP8) untersucht.

3.5.4 Immunhistochemie von Sinusknotenpräparationen

Das Gewebestück wurde mit einer Mischung aus 80% DMSO und 20% MeOH fixiert, mit 1% Triton X-100 in PBS permeabilisiert und in Blockierlösung (10% NGS, 1% Fetales Kalb Serum (FBS), 1% BSA, 1% Triton X-100 in PBS) inkubiert. Zur Detektion von HCN1 und HCN4 wurden α -HCN1 (1:100; Alomone labs, Israel) und α -HCN4 (1:100, Santa Cruz Biotechnology, USA) Antikörper verwendet. Danach erfolgte die Inkubation in den Sekundäantikörpern Alexa488-konjugierter α -rabbit und Alexa555-konjugierter α -rat (1:800; Invitrogen, Germany). Die Sinusknotenpräparationen wurden mit dem wässrigen Einbett-Medium Fluoromount-G (Beckman-Coulter) eingedeckelt und mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop (Axioskop 2; FluoArc, Zeiss), ausgestattet mit einer CCD-Kamera (MRc; Zeiss), untersucht.

3.6 Isolation von Sinusknotenzellen

Für die Isolation von Sinusknotenzellen wurden 6-10 Wochen alte, weibliche Mäuse verwendet. Das Versuchstier wurde durch zervikale Dislokation und anschließendes Durchschneiden der Karotiden getötet. Durch einen Schnitt unterhalb des Sternums wurde das Abdomen bzw. der Thorax unter Durchtrennung der Rippen eröffnet. Der Thoraxraum wurde durch laterale Einschnitte unterhalb der Rippenbögen und Einschneiden des Zwerchfells zugänglich gemacht. Das schlagende Herz wurde entnommen und in eine mit warmer Tyrode III gefüllte Petrischale überführt. Das Herz wurde mit der Herzurückseite nach oben auf den silikonbeschichteten Boden einer Petrischale mit einer Kanüle fixiert. Die Sinusknotenregion wurde entlang der Vena cava superior und der Crista terminalis heraus präpariert (Abb. 6).

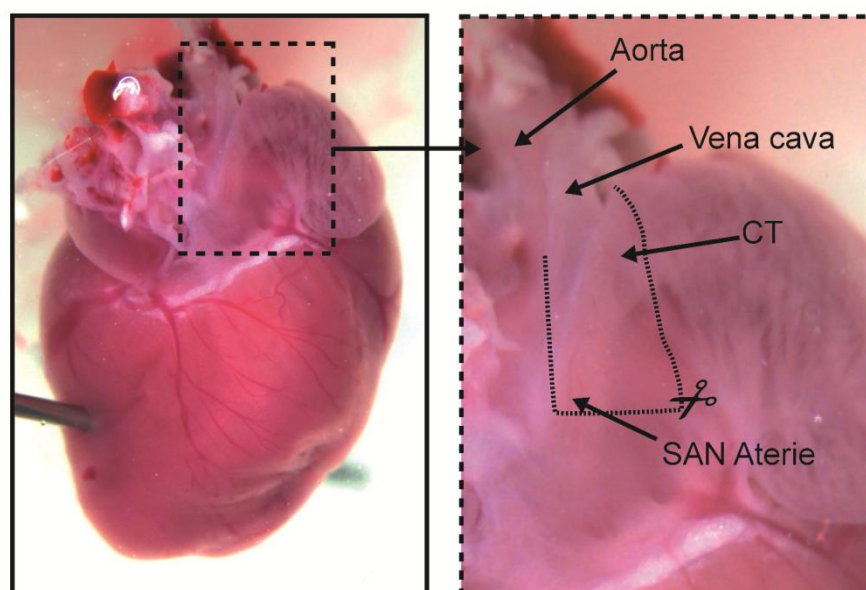


Abb. 6: Präparation der Sinusknotenregion; dorsal Herzseite (links), Vergrößerung des markierten Ausschnitts (rechts), gestrichelte Linie zeigt Schnittlinien; CT Crista terminalis

Das Gewebestück wurde, nachdem es drei bis vier Mal eingeschnitten wurde, in ein mit Tyrode low befülltes Eppendorfgefäß überführt und für 5 min bei 35°C inkubiert. Danach wurden 1 mg/ml BSA und die Enzyme Collagenase B (0,332 U/ml; Roche), Elastase (129,36 U/ml; Sigma) und Protease Typ XIV (0,9 U/ml; Sigma) dazu pipettiert.

Nach einem 30 minütigem Verdau bei 35°C und 500 rpm wurde das Gewebestück mehrmals gespült. Hierzu wurde mit einer Tischzentrifuge bei 0,2 rcf 2 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Das Gewebestück wurde in frischer Tyrode low aufgeschüttelt und es wurde erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt, wobei noch einmal mit Tyrode low und anschließend zweimal mit kalter Kraftbrühe gewaschen wurde. Nach zweieinhalb bis drei Stunden Regenerationszeit bei 4°C wurden die Kraftbrühe und das enthaltene Gewebestück in einem Wasserbad für 10 min auf 37°C erwärmt. Im Anschluss wurden durch vorsichtiges auf- und abpipettieren mit einer abgeschnittenen, abgeflamten blauen 1000 µl Pipettenspitze (Eppendorf) nach und nach einzelne Zellen aus dem verdauten Gewebe herausgelöst. Mit einer abgeschnittenen, abgeflamten gelben 200 µl Pipettenspitze (Eppendorf) wurden weiter Zellen aus dem Gewebestück herausgelöst und auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger ausgesät. Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur in einer Inkubationskammer gelagert. Diese verschlossene Inkubationskammer enthielt ein mit Wasser durchtränktes Papiertuch, um das Austrocknen der Zellen während der Aufbewahrungszeit zu verhindern. Ungefähr 20 min nach dem Aussäen konnte mit der Calcium-Readaptation begonnen werden. Direkt vor der elektrophysiologischen Messung der Sinusknotenzellen wurden diese schrittweise an Calcium gewöhnt, bevor die Badlösung eingewaschen wurde.

Tyrode III		Tyrode low		Kraftbrühe	
NaCl	140,0 mM	NaCl	140,0 mM	L-Glutaminsäure	80,0 mM
KCl	5,4 mM	KCl	5,4 mM	KCl	25,0 mM
MgCl ₂	1,0 mM	MgCl ₂	0,5 mM	MgCl ₂	3,0 mM
CaCl ₂	1,8 mM	CaCl ₂	0,2 mM	KH ₂ PO ₄	10,0 mM
HEPES	5,0 mM	KH ₂ PO ₄	1,2 mM	Taurin	20,0 mM
Glukose	5,5 mM	Taurin	50,0 mM	HEPES	10,0 mM
		HEPES	5,0 mM	EGTA	0,5 mM
		Glukose	5,5 mM	Glukose	10,5 mM
pH 7,4		pH 6,9		pH 7,4	

3.7 Elektrophysiologie an isolierten Sinusknotenzellen

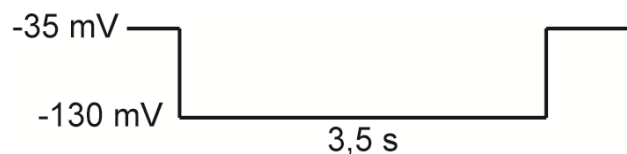
3.7.1 Experimentelle Durchführung

Die Daten-Akquisition der Patch-Clamp Messung erfolgte mit Hilfe eines EPC 10 Verstärkers und des Computerprogramms PatchMaster (HEKA instruments, USA). Die Daten wurden mit Origin 6.1 ausgewertet. 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 erfolgte an einem horizontalen Pipettenziehgerät (DMZ-Universal Puller). Zur Regulation der Messtemperatur wurde ein TC-324B Temperaturkontrollelement in Verbindung mit einer PH1 Plattform (Warner Instruments) benutzt.

3.7.2 Patch-Clamp Protokolle und Datenanalyse

Messung der I_f -Amplitude/ -stromdichte und der Aktivierungskinetik

Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur in der Whole-cell-Konfiguration. Ausgehend von einem Haltepotential von -35 mV wurde für die Dauer von 3,5 s ein Spannungspuls zu -130 mV gegeben.



Zur Berechnung der Stromdichte wurde die Stromamplitude bei maximaler Aktivierung (I_{\max}) auf die Zelloberfläche der Zelle normiert. Die Zelloberfläche wurde mit Hilfe der Computerprogramme AxioVision 4.8 (Carl Zeiss) und ImageJ bestimmt. Die Stromdichte berechnet sich aus dem Quotienten aus I_{\max} und der Zelloberfläche. Um die Zeitkonstanten (τ) der Aktivierung zu bestimmen, wurden die Stromspuren nach der initialen Verzögerung mit einer einfachen oder mit der Summe aus zwei Exponentialfunktionen gefittet.

$$\text{einfache Exponentialfunktion: } f(t) = A_1 e^{(-t/\tau_1)} + C$$

$$\text{Summe aus zwei Exponentialfunktionen: } f(t) = A_1 e^{(-t/\tau_1)} + A_2 e^{(-t/\tau_2)} + C$$

Messung von Aktionspotentialen

Aktionspotentiale wurden in der Perforated-patch-Konfiguration bei 32 ± 1 °C gemessen. Hierfür wurde 200 µg/ml Amphotericin (in DMSO) in intrazellulärer Lösung (Sinusknoten Am) suspendiert. Verschiedene Isoprenalinkonzentrationen (2 nM und 10 µM) wurden über eine SHM-6 Perfusionsanlage (Warner Instruments) in die Badlösung eingewaschen. Zur Bestimmung der Feuerfrequenz der Sinusknotenzellen wurde die Anzahl der spontanen Aktionspotentiale in einem Zeitraum von 10 s bestimmt und auf eine Minute hochgerechnet.

3.7.3 Lösungen für die Elektrophysiologie

Für die Strommessungen wurden Sinusknoten_{current}out und für die Aktionspotentialmessungen Sinusknoten out als Badlösung verwendet. Die Pipettenlösung Sinusknoten AP wurde sowohl für die Strom- als auch für die Aktionspotentialmessungen benutzt.

Sinusknoten_{current} out		Sinusknoten out	
NaCl	140,0 mM	NaCl	140,0 mM
KCl	5,4 mM	KCl	5,4 mM
MgCl ₂	1,0 mM	MgCl ₂	1,0 mM
CaCl ₂	1,0 mM	CaCl ₂	1,8 mM
CdCl ₂	0,3 mM	HEPES	10,0 mM
BaCl ₂	2,0 mM	Glukose	10,0 mM
HEPES	5,0 mM		
Glukose	5,0 mM		
pH 7,4		pH 7,4	

Sinusknoten AP (intazellulär)		Sinusknoten Am (intrazellulär)	
Kaliumaspartat	90 mM	Kaliumaspartat	130,0 mM
NaCl	10,0 mM	NaCl	10,0 mM
MgCl ₂	2,0 mM	CaCl ₂	0,04 mM
CaCl ₂	2,0 mM	HEPES	10,0 mM
EGTA	5,0 mM	Na ₂ -GTP	0,1 mM
Na ₂ -ATP	2,0 mM	Mg-ATP	2,0 mM
Na-GTP	0,1 mM	Kreatinphosphat	6,6 mM
Kreatinphosphat	5,0 mM		
pH 7,2		pH 7,2	

3.8 Präparation von Sinusknotenpräparationen

Aus 6-10 Wochen alten, männlichen Mäusen wurde, wie für die Isolation von Einzelzellen beschrieben, das Herz entnommen und die Sinusknotenregion herauspräpariert. Das Gewebestück wurde mit Hilfe von Minutiennadeln (Fiebig Lehrmittel, Art. Nr. 2041) mit der endokardialen Seite nach oben auf ein Silikonkissen gespannt. Direkt im Anschluss konnten elektrophysiologischen Messungen an diesem Präparat durchgeführt werden (Abb. 7).

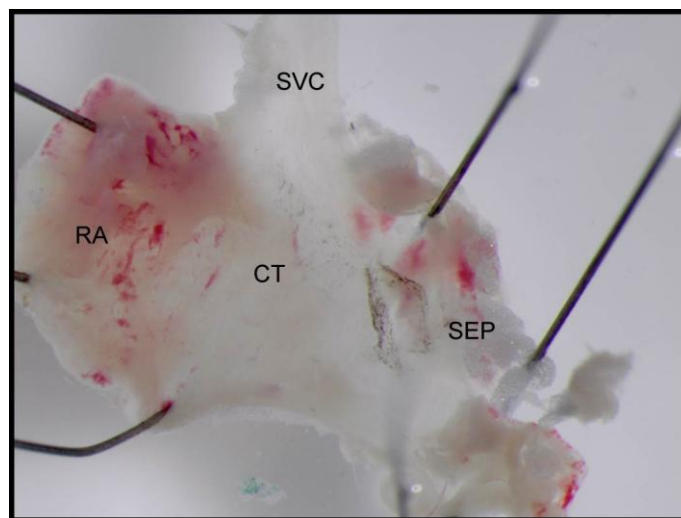


Abb. 7: aufgespannte Sinusknotenpräparation; RA: rechtes Atrium, SEP: Septum, SVC: Vena cava superior, CT: Crista terminalis

3.9 Mikroelektrodenmessungen an Sinusknotenpräparationen

3.9.1 Experimentelle Durchführung

Die Mikroelektrodenmessungen an Sinusknotenpräparationen wurden mit einem IX2-700 Mikroelektrodenverstärker (Dagan Corporation) und dem Computerprogramm Clampex 8.2 (Axon Instruments) durchgeführt. Der Verstärker war mit einem Digidata 1320 A (Axon Instrument) verbunden. Für die Herstellung der Pipetten wurde ebenfalls das horizontale Pipettenziehgerät verwendet. Die zu ziehenden Glaskapillaren unterschieden sich nur in Innendurchmesser (0,86 mm) und Länge (GC150F-10, Harvard Apparatus) von den für die Einzelzellmessungen verwendeten Glaskapillaren. Alle Experimente an Sinusknotenpräparationen wurden bei $30,0 \pm 0,5$ °C durchgeführt. Es wurde in atrialen Zellen nahe dem Sinusknoten gemessen.

3.9.2 Mikroelektroden Protokolle und Datenanalyse

Messung von Aktionspotentialen

Zur Bestimmung der Feuerfrequenz der Sinusknotenpräparationen wurde die Anzahl der spontanen Aktionspotentiale in einem Zeitraum von 30 s bestimmt und auf eine Minute hochgerechnet. Verschiedene Isoprenalinkonzentrationen (2 nM und 10 µM) wurden über eine SHM-6 Perfusionsanlage (Warner Instruments) in die Badlösung eingewaschen.

Bestimmung der Sinusknoten-Erholungszeit (SNRT, sinus node recovery time)

Um die Erholungszeit zu ermitteln, wurde im rechten Atrium der Sinusknotenpräparationen mit einem A360 Stimulator (WPI) bei 10 Hz für 10 s stimuliert. Nach einer Regenerationszeit von circa 30 s wurde das Protokoll wiederholt. Das Intervall zwischen dem letzten stimulierten und dem ersten spontanen, aus dem Sinusknoten generierten Aktionspotential wurde als SNRT definiert. Um die frequenzkorrigierte Erholungszeit (cSNRT, corrected SNRT) zu erhalten, wurde von der

ermittelten SNRT die spontane Sinuszykluslänge (SZL) abgezogen. Die SZL ergab sich als der Mittelwert zehn aufeinanderfolgender Zykluslängen direkt vor der Stimulation.

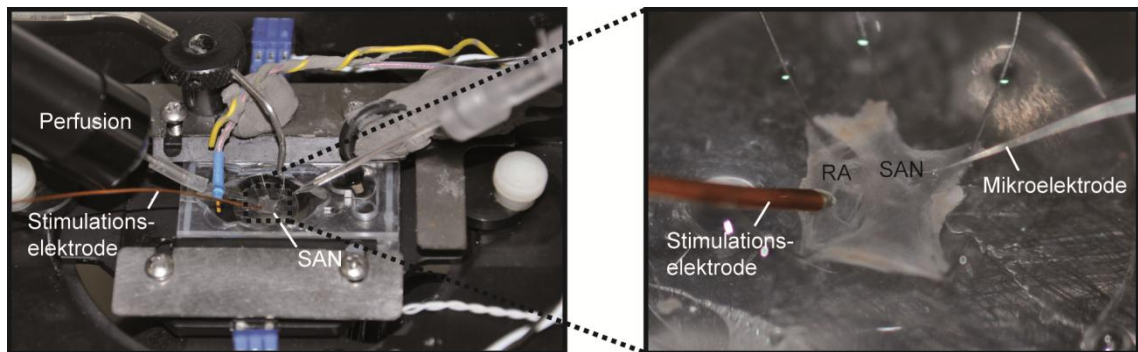


Abb. 8: Aufbau zur Bestimmung der Sinusknoten-Erholungszeit. Die Stimulations-elektrode wurde im rechten Atrium (RA) platziert. Die Mikroelektrodenmessung erfolgte im Sinusknoten (SAN).

3.9.3 Lösungen für Mikroelektroden Messungen

Bei den Messungen wurden 3M KCl Elektroden benutzt. Als Badlösung wurde Tyrode III verwendet.

3.10 Langendorff-Herzen

Von 5 Wildtyp- und 6 HCN1^{-/-}-Mäusen wurde das komplette Herz mit einem ca. 3 mm langen Stück Aorta herauspräpariert und in eine mit PBS gefüllte Petrischale überführt. Die Aorta wurde dann unter mikroskopische Kontrolle (Stemi2000, Zeiss) kanüliert (gekürzte 20 gauche-Kanüle, Braun) und mit Nahtmaterial (Seide 5/0 USP, Resorba) an der Kanüle fixiert. Die Kanüle mit dem Herzen wurde an die Langendorff-Apparatur angeschlossen. Das Herz wurde retrograd mit einem modifizierten, mit Carbogen begasten Krebs Henseleit Puffer perfundiert. Die Herztätigkeit konnte mit Hilfe eines EP-Tracers von CardioTek (Niederlande) aufgezeichnet werden.

Krebs Henseleit Puffer	
NaCl	118,5mM
NaHCO ₃	25,0 mM
KCl	4,7 mM
MgSO ₄	1,2 mM
CaCl ₂	1,8 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
Glukose	11,0 mM
pH 7,4	

3.11 EKG

3.11.1 EKG-Messungen

Die Versuchstiere wurden während des gesamten Zeitraums der Messung in einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus in Einzelkäfigen mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Männlichen Tieren (3 Wildtypen, 4 HCN1^{-/-}) wurde im Alter von ca. 4 Monaten ein EKG-Transmitter intraperitoneal implantiert (TA10EA-F20, Data Sciences International, DSI). Die Elektroden wurden so platziert, dass die aufgenommenen EKG Signale der Ableitung II entsprachen. Postoperativ regenerierten die Mäuse unter Analgesie zehn Tage, bevor mit den Aufzeichnungen begonnen wurde. Für die Bestimmung der basalen Herzfrequenz und der Aktivitätsanalyse wurden telemetrischen EKG-Signale über 72 Stunden von der Dataquest A.R.T. Software (DSI) aufgenommen. Die Pharmaka Isoprenalin (0,1 mg/kg) und Carbachol (0,15 mg/kg) wurden intraperitoneal injiziert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Dataquest A.R.T. Software (DSI) und Origin 6.1 (OriginLab). Um Unterschiede in der Dynamik der Herzfrequenz zu untersuchen, wurde aus den Herzfrequenzdaten der 72 Stunden Messung ein Histogramm erstellt. Hierfür wurden die Herzfrequenzen von 200 bis 800 Schläge pro Minute in 30 gleiche Bereiche aufgeteilt.

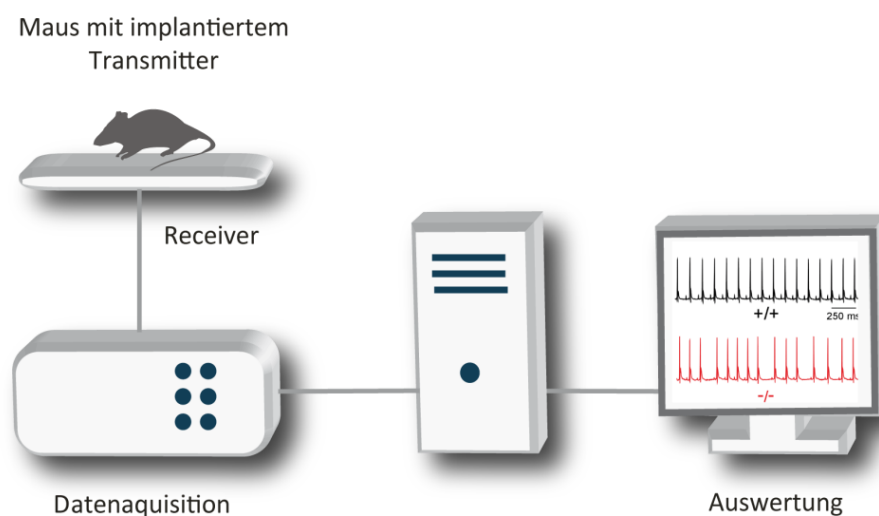


Abb. 9: Versuchsaufbau für EKG-Messung. Die Mäuse mit implantierten EKG-Transmittter werden mit ihrem Käfig auf eine Empfängerplatte gestellt. Die EKG Daten werden an einen Computer gesendet und können anschließend ausgewertet werden. (Fenske, 2010)

3.11.2 Analyse der Herzfrequenzvariabilität

Für die Analyse der Frequenzdomäne wurden die Rohdaten der EKG-Aufnahme auf einen stabilen Sinusrhythmus überprüft und Ausreißer manuell entfernt. 60 s lange Abschnitte der RR-Intervalle wurden als Tachogramm dargestellt. Diese Tachogramme wurden mittels einer kubischen Spline-Interpolation äquidistant abgetastet. So wurden in gleichbleibenden Abständen von 50 ms Datenpunkte erhalten, die als Grundlage für die Schnelle Fourier-Transformation (FFT, Fast Fourier Transformation) dienten. Nach der Trendbereinigung, die zur Korrektur der Verschiebung der Basislinien dient, und Mittelwertkorrektur wurde eine FFT basierend auf 512 Spektralpunkten durchgeführt. Um Randartefakte zu mildern, wurde mit einer Fensterfunktion nach Hanning multipliziert, bestehend aus zwei jeweils 50% überlappenden Fenstern. Für jedes Zeitsegment wurde die gesamte spektrale Leistungsdichte (TP, engl. total power; s^2/Hz) aus dem Integral des Leistungsdichtespektrums über den Frequenzbereich 0 – 4,0 Hz errechnet. Dieser Frequenzbereich wurde zudem in drei für die Maus charakteristische Frequenzbänder unterteilt. So ergaben sich ein hochfrequenter (HF, high frequency; 1,5 -4 Hz), einen niederfrequenter (LF, low frequency; 0,4 -1,5 Hz) und einen sehr niederfrequenter (VLF, very low frequency; < 0,4 Hz) Bereich. Entsprechende Zeitsegmente der jeweiligen Mäuse wurden gemittelt.

Um die Zeitdomäne zu analysieren, wurde ein zweistündiges Aufnahmeintervall während der Ruhephase untersucht. Für diesen Aufnahmebereich wurden alle RR-Abstände bestimmt, wobei ektopische Schläge und andere Artefakte manuell gefiltert wurden. Das durchschnittliche RR-Intervall, die Standardabweichung aller RR-Intervalle (SDRR, standard deviation of all RR intervals) und das quadratische Mittel aus dem Abstand aufeinander folgender Schläge (RMSDD, root-mean square of the difference of successive RR intervals) wurden ermittelt. Für die Darstellung im Poincaré-Blot wurden insgesamt 20 000 Datenpunkte verwendet. In einem Poincaré-Blot wird ein RR-Intervall (n , x-Achse) gegen den darauffolgenden RR-Abstand ($n + 1$; y-Achse) aufgetragen.

3.12 Intrakardiale elektrophysiologische Untersuchung

3.12.1 Experimentelle Durchführung

Die Versuchstiere (9 Wildtypen und 11 HCN1^{-/-} Mäuse) wurden mit Isofluran narkotisiert. Zur Überwachung der Vitalfunktionen der Mäuse wurde das Oberflächen-EKG der Mäuse während der gesamten Untersuchung beobachtet. Die Körpertemperatur der Versuchstiere wurde über eine Wärmeplatte mit Steuerung über eine rektale Temperatursonde über einen Rückkopplungsmechanismus konstant gehalten (Harvard Apparatus). Nachdem die rechte äußere Jugularvene freigelegt wurde (Abb. 10, links), wurde sie zur Unterbrechung der Blutzufuhr kopfnah mit Nahtmaterial (Seide 5/0 USP, Resorba) abgebunden. Mit einem zweiten Faden wurde das Gefäß nahe des Brustkorbs angehoben, um es besser kanülieren zu können (Abb. 10, Mitte). Mit Hilfe einer Kanüle wurde die rechte Jugularvene geöffnet und ein oktapolarer 0,54 mm (1,7 French) Elektroden-Katheter (CIBer mouse cath, NuMed Inc.) in das Gefäß geschoben.



Abb. 10: Die rechte äußere Jugularvene (RJV) wurde freigelegt (links) und kopfnah abgebunden (Mitte). Der Elektrodenkatheter wurde über die Jugularvene in den rechten Vorhof und Atrium geschoben.

Geleitet durch die Morphologie der intrakardialen Signale, wurde der Katheter optimal platziert. Abb. 11 zeigt die Lage des Katheters im rechten Vorhof und Ventrikel. Die acht Ringelektroden, welche jeweils 0,5 mm von einander entfernt waren, befanden sich im direkten Kontakt zum Endokard.

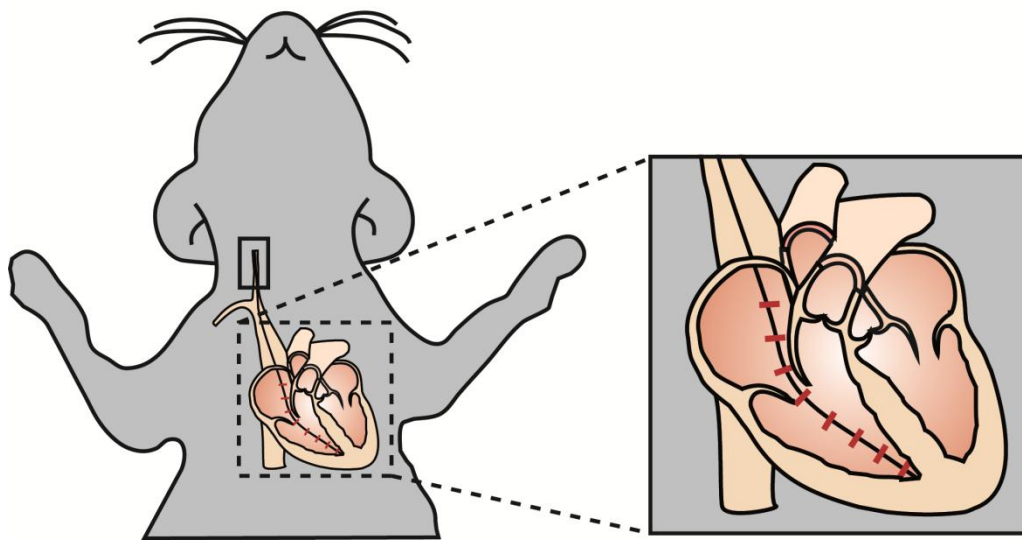


Abb. 11: Position des Katheters im rechten Herzen; der oktapolare Katheter wird über die Jugularvene (kleines schwarzes Rechteck) im rechten Atrium und Ventrikel platziert. Drei der acht Elektroden (kleine rote Ringe) befinden sich im Vorhof und fünf in der rechten Kammer. (Abbildung nach (Li & Wehrens, 2010))

Die simultane Aufzeichnung des Oberflächen-EKGs und der intrakardialen Signale erfolgte mit Hilfe des EP-Tracers (CardioTek, Niederlande). Die elektrische Stimulation des Herzens wurde bei doppelter Stimulationsschwelle, in der Regel 1 mA für 1 ms, durchgeführt.

3.12.2 Stimulationsprotokolle

Sinusknoten-Erholungszeit (SNRT, sinus node recovery time)

Zur Bestimmung der SNRT wurde 30 s lang bei unterschiedlichen Basiszykluslängen stimuliert. Die längste Basiszykluslänge wurde für jedes Tier einzeln bestimmt. Sie befand sich wenige Millisekunden unter der spontanen Sinuszykluslänge (SZL). Nach einer 60 sekundigen Regenerationszeit wurde das Protokoll mit einer um 10 ms reduzierten Basiszykluslänge wiederholt. Bei den $HCN1^{-/-}$ -Mäusen ergaben sich so Basiszykluslängen von 150 - 70 ms, bei den Wildtypen Zykluslängen von 110 - 70 ms. Für die statistische Analyse wurden SNRTs mit gleicher Basiszykluslänge verglichen. Als SNRT ergab sich das Zeitintervall vom letzten Stimulus bis zum ersten natürlich auftretenden atrialen Signal (Abb. 12). Um die korrigierte Sinusknoten-Erholungszeit (cSNRT, corrected SNRT) zu erhalten, wurde die gemittelte SZL von der SNRT abgezogen.

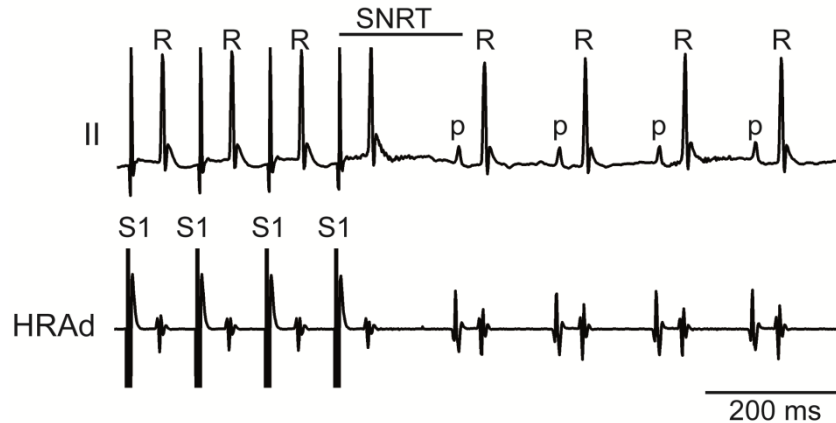


Abb. 12: Stimulationsprotokoll zur Bestimmung der SNRT; Ableitung II des Oberflächen-EKGs (oben), proximale intraatriale Ableitung (HRAd, high right atrium proximal) (unten); S: Stimulationsartefakt, p: atriales Signal, R: ventrikulärer Komplex

Sinuatriale Leitungszeit (SACT, sinoatrial conduction time)

Die SACT wurde analog zu humanen Studien indirekt ermittelt (LaBarre et al, 1979; Reiffel et al, 1974). Hierbei wurde in einen spontanen Sinusrhythmus ein vorzeitiger atrialer Stimulus über die Stimulationselektrode appliziert. Für jedes Versuchstier wurden bis zu 80 Stimuli mit unterschiedlicher Vorzeitigkeit gegeben. Die spontane Sinuszykluslänge (A1A1), das Kopplungsintervall des vorzeitigen Stimulus (A1A2), der atriale Return Cycle (A2A3) und der Post Return Cycle (A3A4) wurden bestimmt (Abb. 13).

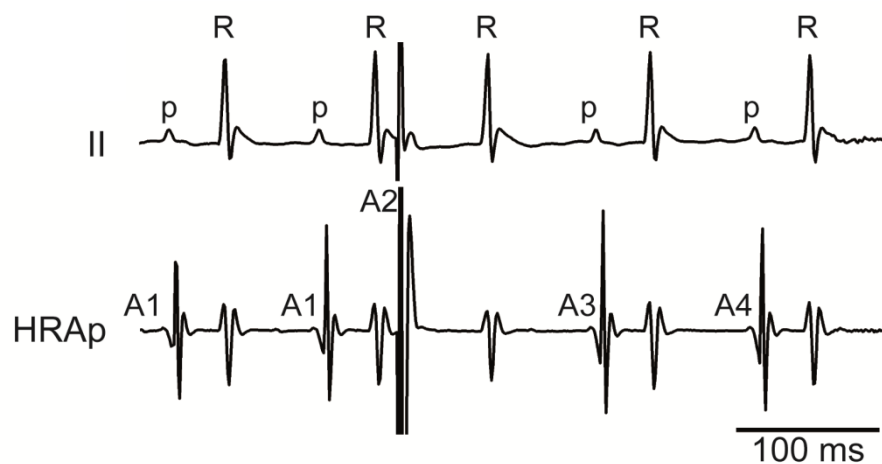


Abb. 13: Darstellung der Stimulationstechnik zur Bestimmung der SACT; II Ableitung des Oberflächen-EKGs (oben), proximale intraatriale Ableitung (HRAp, high right atrium proximal) (unten). Stimulationsartefakt p: atrialer Komplex; R: ventrikulärer Komplex

Effektive Refraktärzeit

Aus der Antwort des Herzgewebes auf einen vorzeitigen Stimulus lässt sich die Refraktärzeit des Gewebes bestimmen. Die effektive Refraktärzeit beschreibt das längste Kopplungsintervall des vorzeitigen Stimulus, welches nicht mehr zur Erregung des Gewebes führt.

Die effektive Refraktärzeit des AV-Knotens (AVNERP, effective atrioventricular nodal refractory period) wurde durch programmierte atriale Stimulation ermittelt. Um einen Einfluss der spontanen Zykluslänge auf die Refraktärzeit auszuschließen, wurde vor dem vorzeitigen Stimulus S2 8-mal festfrequent stimuliert. Die acht Stimuli wurden in

einem Stimulationsintervall S1S1 von 100 ms appliziert. Das Kopplungsintervall S1S2 wurde in 2 ms Schritten von 100 ms bis auf 20 ms verkürzt. Nach einer Erholungszeit von 30 s wurde das Protokoll mit Stimulationsintervallen S1S1 von 90 ms und 80 ms wiederholt (Abb. 14). Die AVNERP wurde als das längste S1S2 Kopplungsintervall definiert, bei dem keine AV-Knoten-Überleitung mehr zu beobachten war.

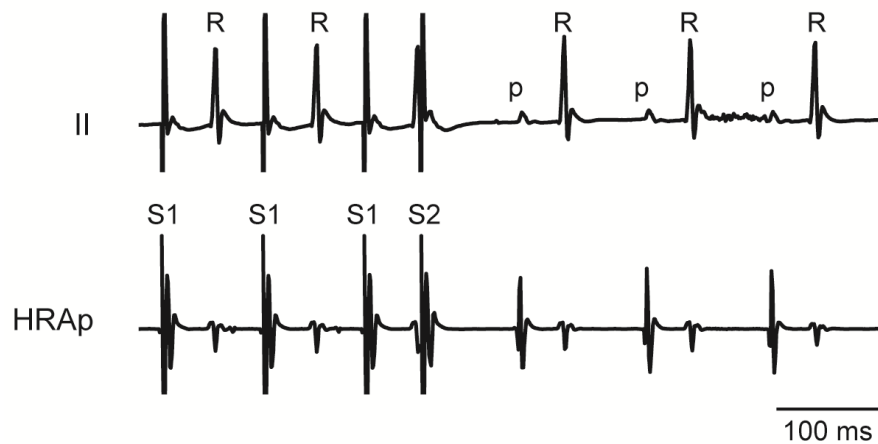


Abb. 14: Protokoll zur Ermittlung der AVNERP; II Ableitung des Oberflächen-EKGs (oben), proximale intraatriale Ableitung (HRAp, high right atrium proximal) (unten). S: Stimulationsartefakt p: atrialer Komplex; R: ventrikulärer Komplex

Ein ähnliches Protokoll wurde zur Bestimmung der effektiven Refraktärzeit des Ventrikels (VERP, effective ventricular refractory period) verwendet. Die Stimulation im Ventrikel erfolgte mit Stimulationsintervallen S1S1 von 100 ms, 90 ms und 80 ms. Das Kopplungsintervall S1S2 wurde schrittweise bis auf 30 ms verkürzt (Abb. 15). Das längste Kopplungsintervall, welches nicht mehr zur Bildung eines Ventrikelkomplexes führte, wurde als VERP definiert.

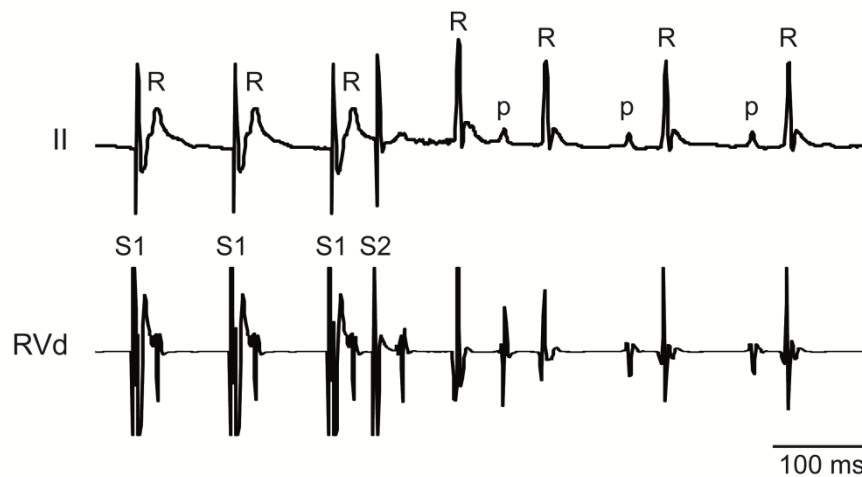


Abb. 15: Protokoll zur Ermittlung der VERP; II Ableitung des Oberflächen-EKGs (oben), distale intraventrikuläre Ableitung (RVd, right ventricle distal) (unten). S: Stimulationsartefakt p: atrialer Komplex; R: ventrikulärer Komplex

Aus den Daten zur Bestimmung der AVNERP konnte die effektive Refraktärzeit des Atriums (AERP, effective atrial refractory period) nicht ermittelt werden. Das atriale Signal fiel bei Kopplungsintervallen unter 40 ms in das ventrikuläre Signal des vorherigen Stimulus. Aus diesem Grunde wurde zur Ermittlung der AERP ein Dreischritt-Protokoll angewendet (Abb. 16). Nach acht Stimuli wurde ein Extrastimulus mit einem Kopplungsintervall S1S2 gegeben, welches um 5 ms kürzer war als die zuvor bestimmte AVNERP und somit einen AV-Überleitungsblock auslöste. Das darauffolgende Kopplungsintervall S2S3 wurde in 2 ms Schritten bis auf 10 ms verkürzt. Die AERP wurde als das längste Kopplungsintervall S2S3 definiert, welches keine atriale Antwort auslöste.

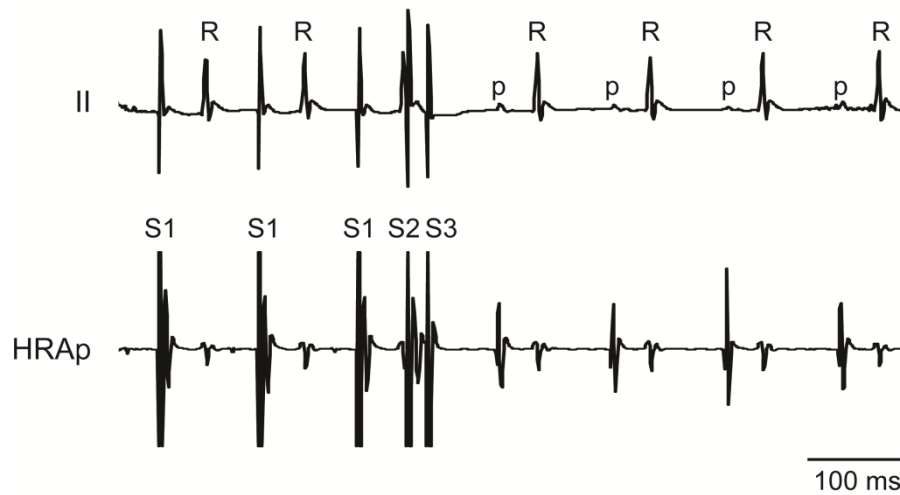


Abb. 16: Protokoll zu Ermittlung der AERP; II Ableitung des Oberflächen-EKGs (oben), proximale intraatriale Ableitung (HRAp, high right atrium proximal) (unten). S: Stimulationsartefakt; p: atrialer Komplex; R: ventrikuläre Komplex

Wenckebachpunkt (WBP)

Beim Wenckebachpunkt handelt es sich um die Stimulationszykluslänge, bei der keine 1:1 Überleitung von Vorhof auf den Ventrikel mehr zu beobachten ist. Um diese Zykluslänge zu bestimmen, wurde mit acht Impulsen stimuliert. Der Abstand der Stimuli verringerte sich alle 3 s um 2 ms bis auf 30 ms. Das Stimulationsintervall, bei dem eine 2:1-Überleitung auftrat, wurde ebenfalls ermittelt.

3.13 Echokardiographie und Messungen des arteriellen Blutdrucks

Für die Echokardiographie wurden von jeder Mauslinie 12 Mäuse verwendet. Der arterielle Blutdruck wurde von sechs Wildtyp- und drei HCN1^{-/-}-Mäuse bestimmt. Die Echokardiographie und die Blutdruckmessungen wurden im Institut von Prof. Christian Kupatt von Dr. Tilman Ziegler und Dr. Philipp Lange durchgeführt.

3.14 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse wurde GraphPadPrism 5.0 verwendet. Mit Hilfe des Grubb's Ausreißer Tests wurden Ausreißer erkannt und aus der Datenanalyse ausgeschlossen. Die Daten wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov Test auf eine Normalverteilung hin überprüft. Daten, welche normalverteilt waren, wurden auf einen Unterschied zwischen den Genotypen mit Hilfe eines parametrischen Tests (zweiseitiger t-Test oder ANOVA) überprüft. Wenn nicht anders vermerkt, wurde die statistische Signifikanz mit einem zweiseitigen t-Test ermittelt. Relative Unterschiede zwischen den Genotypen wurden als prozentuale Angaben des Wildtyp-Werts dargestellt. Alle Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler (mean \pm SEM) angegeben. Die statistische Analyse wurde in Kooperation mit Carsten Wodjak durchgeführt.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Mauslinie verwendet, bei der das HCN1-Gen mittels einer Cre/loxP-basierten Strategie deletiert wurde. Zur Deletion wurde das Exon 4 ausgewählt, welches für die Porenregion und das Transmembransegment 6 kodiert (Abb. 17) (Nolan et al, 2003).

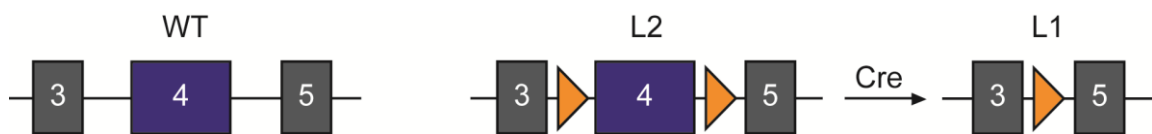


Abb. 17: Schematische Darstellung der Wildtyp (WT), geflochtenen (L2) und HCN1 Knockout (L1) Allele. Die nummerierten Boxen stellen die Exons 3-5 dar. LoxP Seiten sind als orangefarbene Dreiecke dargestellt. Aktivität der Cre Rekombinase führt zu einer Deletion des Exons 4, welches für die Porenregion und das sechste Transmembransegment kodiert.

Bei diesem Knockout handelt es sich um einen globalen, nicht induzierten Knockout. Das bedeutet, dass der HCN1 Kanal nicht erst im adulten Tier, sondern schon während der gesamten Entwicklung der Mäuse nicht mehr vorhanden ist. Das Fehlen des HCN1 Kanals könnte durch eine veränderte Expression der anderen HCN Isoformen oder anderer Proteine kompensiert werden. Um bei der Analyse der Funktion des HCN1 Kanals im Sinusknoten solche Effekte zu berücksichtigen, wurde eine vergleichende Expressionsanalyse aus den Sinusknoten von HCN1^{-/-} und Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Die Mikroarray Analyse zeigte, dass die HCN1 Deletion zu keiner veränderten Expression von Ionenkanälen oder Proteinen führt, die bei der Entstehung eines Aktionspotentials eine wichtige Rolle spielen (Tab. 1, Tab. 2; Anhang). Das Fehlen des HCN1 Kanals während der gesamten Entwicklung könnte auch zu einer strukturellen Veränderung des Herzens führen. Um zu untersuchen, ob die HCN1 Kanal Deletion einen Einfluss auf die Morphologie der Herzen hat, wurden Herzschnitte von HCN1^{-/-} und Wildtyp-Mäusen verglichen. Des Weiteren wurde im Institut von Christian Kupatt eine Herzechographie durchgeführt. Sowohl die Herzschnitte als auch die Daten aus der Echokardiographie zeigen eine unveränderte Struktur der HCN1^{-/-} Herzen (Abb. 18, Tab. 3; Anhang). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass weder ein

kompensatorisches Remodelling noch eine veränderte Expression in den HCN1^{-/-}-Herzen eine Rolle spielt.

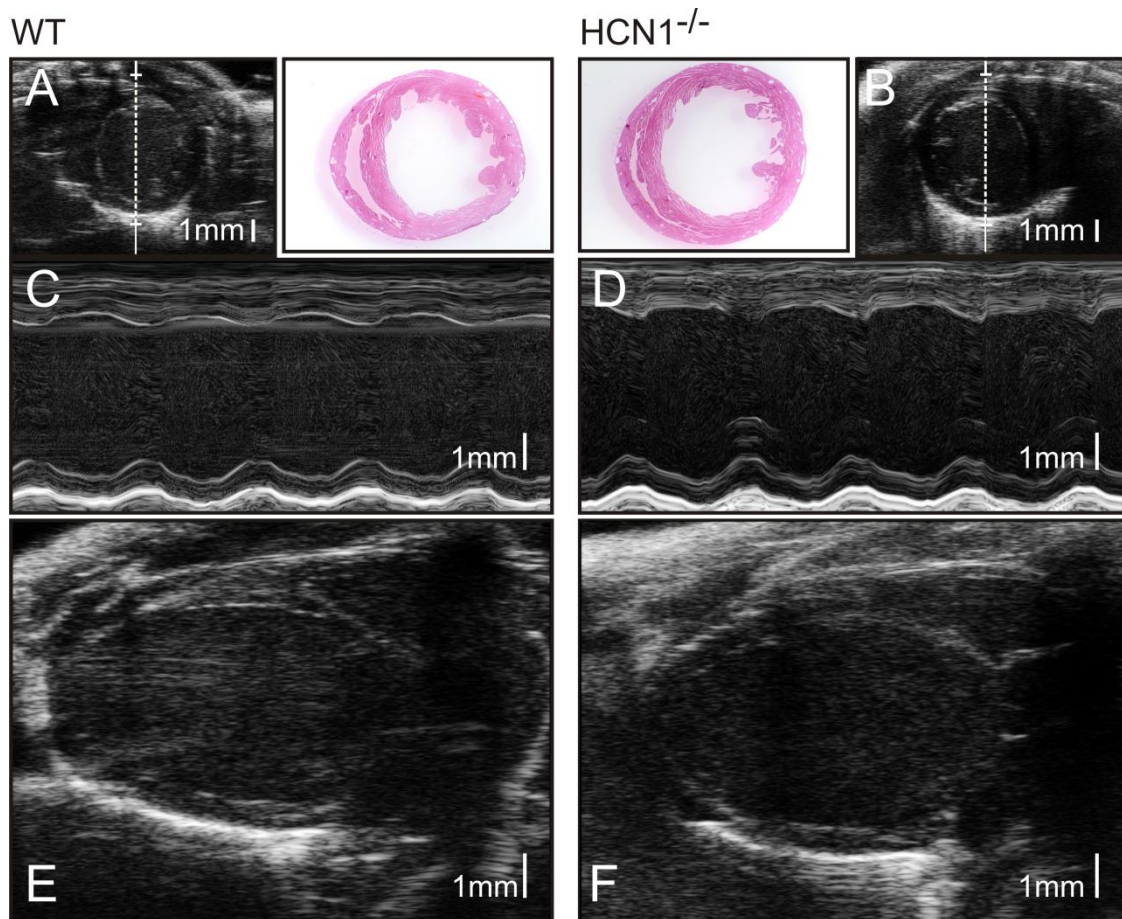


Abb. 18: Unveränderte kardiale Struktur und Funktion der HCN1^{-/-}-Herzen im Vergleich zu Wildtyp Herzen. (A, B) Repräsentatives Kurzachsen-Echokardiogramm. Die gestrichelt Linie zeigt die Achse für die M-Mode Messungen in C und D. Beim M-Mode wird die Amplitude des Signals (vertikale Achse) in Abhängigkeit der Zeit (horizontale Achse) dargestellt. (E, F) Langachsen-Echokardiogramm. Einsatz: Hämatoxylin-Eosin gefärbte Herzschnitte von Wildtyp- (links) und HCN1^{-/-}-Herzen (rechts)

Da verschiedene Publikationen, die sich mit der Expression von HCN Kanälen im Sinusknoten beschäftigen, unterschiedliche Aussagen über die Expression des HCN1 Proteins machen (Baruscotti et al, 2011; Herrmann et al, 2011), wurde mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse die Proteinexpression überprüft. In Western-Blots aus Lysaten von Wildtyp-Sinusknoten kann eine spezifische HCN1 Bande detektiert werden (Abb. 19). Die Bande entspricht der voll glykosylierten Form des HCN1 Kanals (120 kDa). Dahingegen ist diese Bande in Sinusknotenlysaten der HCN1^{-/-}-Maus nicht zu sehen. In beiden Lysaten werden ähnliche Mengen an HCN4 Protein detektiert. Im Gegensatz dazu können weder der HCN1 noch der HCN4 Kanal im rechten Atrium nachgewiesen werden. Die Expression des HCN2 Kanals war im Sinusknoten und im Atrium nicht detektierbar (Abb. 19A). Mittels immunhistochemischer Untersuchungen von Sinusknotenpräparationen konnte eine überlappende Expression von HCN1 und HCN4 im zentralen Bereich des Sinusknotens gezeigt werden (Abb. 19B, C). Für eine detailliertere Analyse der Expression in diesem Bereich wurden Schnitte aus der zentralen Region des Sinusknotens immunhistochemisch gefärbt. In diesen Schnitten wurde deutlich, dass beide HCN Kanäle innerhalb derselben Zellen der zentralen Sinusknotenregion exprimiert werden (Abb. 19D).

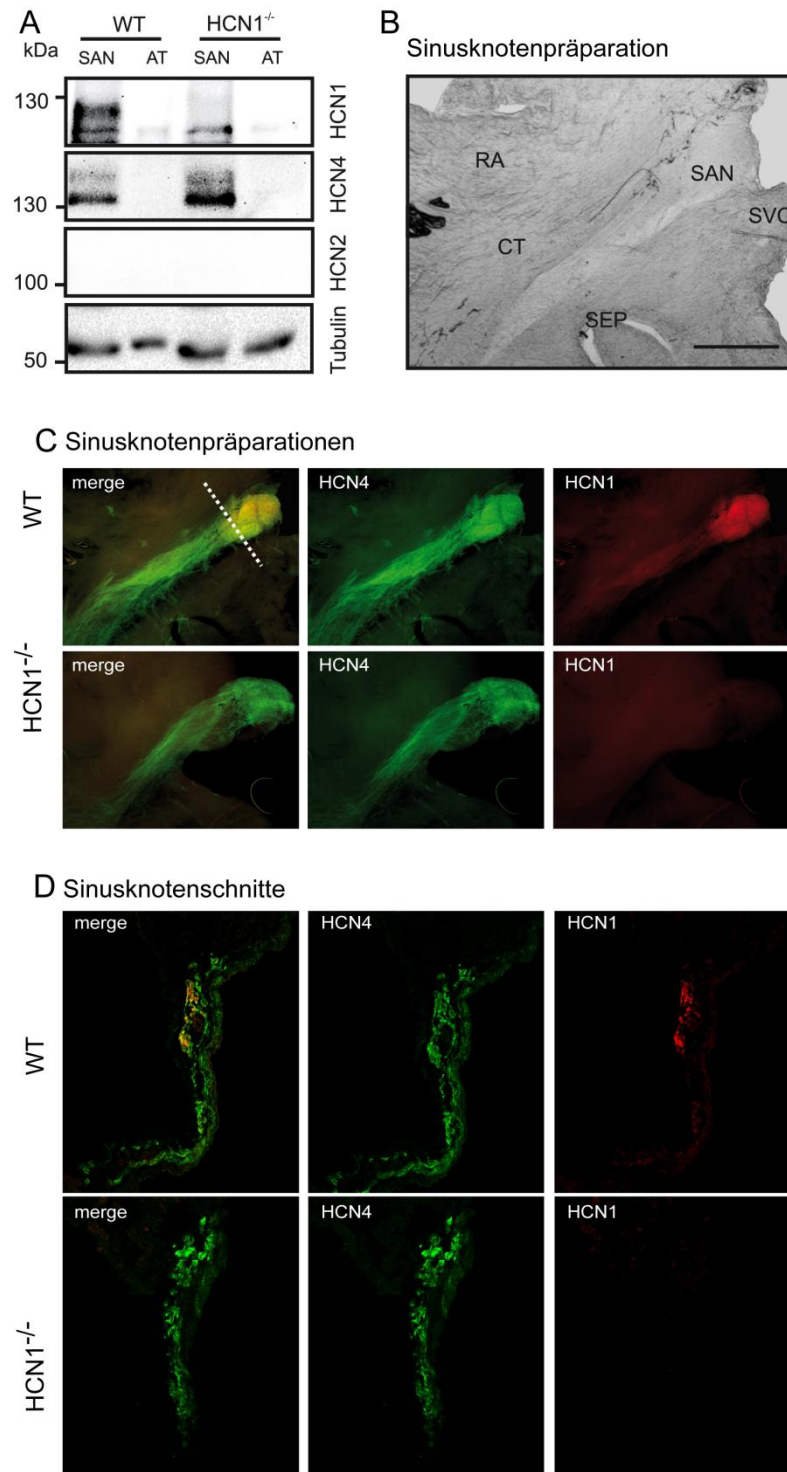


Abb. 19: Der HCN1 Kanal wird im zentralen Sinusknoten exprimiert. (A) HCN Kanal Expression im Sinusknoten und im Atrium. Tubulin dient als Ladekontrolle. (B) Sinusknotenpräparation einer Wildtyp-Maus; die zentrale Sinusknotenregion (SAN), die Crista terminalis (CT), die Vena cava superior (SVC), das rechte Atrium (RA) und das Septum (SEP) sind dargestellt. (C) Detektion des HCN1 und HCN4 Proteins in der Sinusknotenpräparation. Die gestrichelte Linie in C zeigt die Schnittebene für die zentralen Schnitte durch den Sinusknoten. (D) Immunhistochemische Färbung der Sinusknotenschnitte

Diese deutliche HCN1 Expression wirft die Frage auf, welchen Beitrag der HCN1 Kanal zum I_f in isolierten Sinusknotenzellen leistet. Um diese Frage aufzuklären, wurde ein Protokoll entwickelt, mit dem Sinusknotenzellen aus der zentralen Region isoliert werden konnten. Im Unterschied zur üblichen Präparation wurden hierbei höhere Enzymkonzentrationen verwendet, die zwar die peripheren Zellen überverdauten, die Zellen aus dem zentralen Sinusknoten aber besser herauslösen konnten. Der Fokus dieser Untersuchung liegt auf den zwei häufigsten Zelltypen: den Spindle Zellen, welche klein (Oberfläche: $247 \pm 17 \mu\text{m}^2$) und spindelförmig sind, und den Elongated Zellen, welche wesentlich länger (Oberfläche: $516 \pm 45 \mu\text{m}^2$) und ebenfalls spindelförmig sind (Abb. 20 A). Zusammen machen diese einen Anteil von 90 - 95% an allen nicht atrialen Zellen im Sinusknoten aus. In beiden Zelltypen aus Wildtyp-Mäusen kann ein hyperpolarisierender Spannungssprung HCN-Kanäle aktivieren. Dies zeigt sich in einem deutlichen I_f (Abb. 20B). Die Deletion des HCN1 Kanals führt in den Spindle Zellen zu einer Abnahme der Stromdichte um ca. 30%. In den Elongated Zellen beträgt die Reduktion der Stromdichte ungefähr 40%.

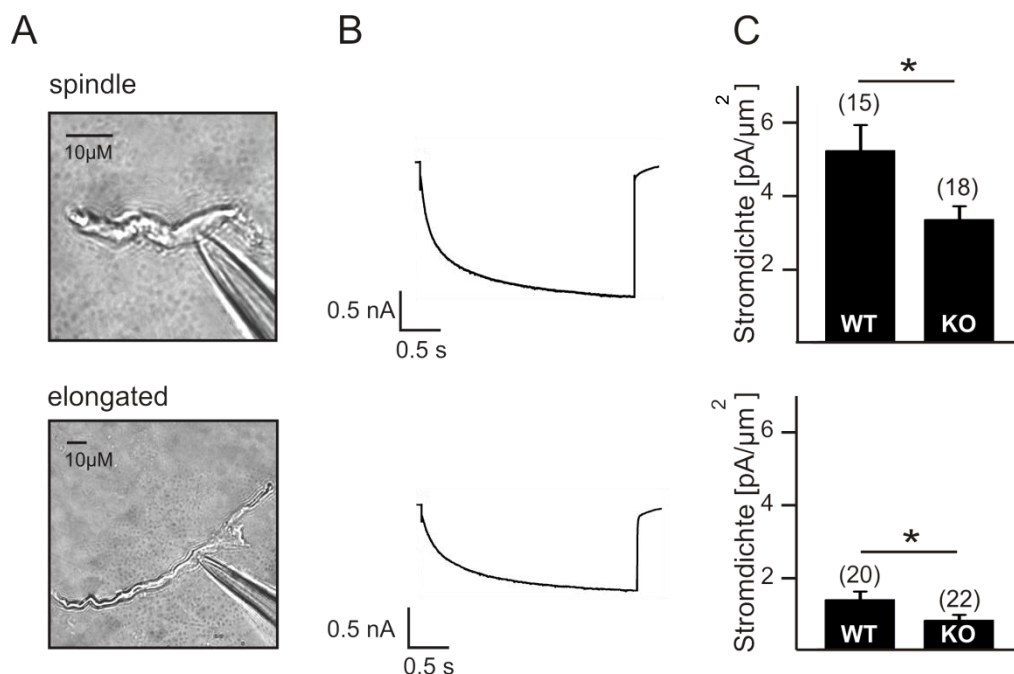


Abb. 20: Reduzierte Stromdichte in isolierten Sinusknotenzellen von $\text{HCN1}^{-/-}$ Mäusen. (A) Morphologie der Spindle und der Elongated Zellen. (B) Repräsentative Stromspuren von Spindle (oben) und Elongated (unten) Zellen. (C) Stromdichte von I_f in Spindle (oben) und Elongated (unten) Zellen. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. * $p < 0,05$

Darüber hinaus ist in $\text{HCN1}^{-/-}$ -Zellen die Aktivierungskinetik des I_f stark verlangsamt (Abb. 21). Zur Ermittlung der Zeitkonstanten der Aktivierung wurden die Stromspuren der Wildtyp- und $\text{HCN1}^{-/-}$ -Zellen mit einer einfachen Exponentialfunktion oder der Summe aus zwei Exponentialfunktionen gefittet. Die Stromspuren der Wildtyp-Zellen lassen sich nur sehr schlecht mit einer einfachen Exponentialfunktion fitten. Diese Tatsache wird besonders deutlich, wenn man die Residuen der Fits betrachtet. Die Residuen stellen die Stromdifferenz aus der eigentlichen Stromspur und dem Fit dar. Vergleicht man die Residuen der Fits mit einer einfachen Exponentialfunktion (oben in Abb. 21) in Wildtyp- und $\text{HCN1}^{-/-}$ -Zellen, ist in Wildtyp-Zellen anfangs eine deutliche Abweichung der Fits von der ursprünglichen Stromspur zu erkennen. Die Stromspur der $\text{HCN1}^{-/-}$ -Zellen lässt sich dagegen mit einer einfachen Exponentialfunktion gut fitten und die Spur der Residuen stellt eine Gerade dar. Für einen optimalen Fit der Wildtyp-Spuren wurde die Summe aus zwei Exponentialfunktionen benötigt. Das bedeutet, dass sich der Strom in Wildtyp-Zellen aus zwei Komponenten zusammensetzt, wovon eine durch die Deletion des HCN1 Kanals verloren geht. Die verlangsamte Aktivierungskinetik des Reststroms in den $\text{HCN1}^{-/-}$ -Zellen erinnert stark an die Kinetik klonierter HCN4 Kanäle (Ludwig et al, 1999). Diese Ergebnisse zeigen, dass der HCN4 und der HCN1 Kanal die vorherrschenden Isoformen im Sinusknoten sind und dass I_f hauptsächlich durch diese beiden Isoformen getragen wird.

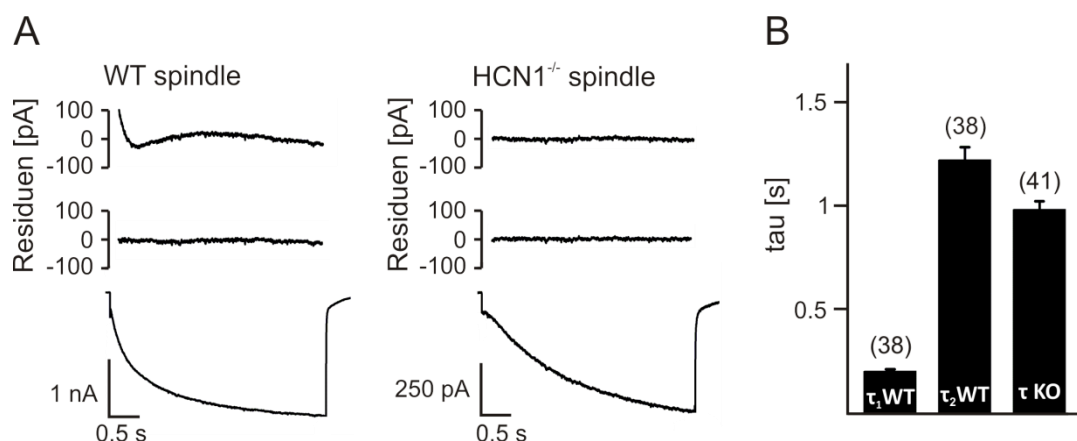


Abb. 21: (A) Repräsentative Stromspuren (unten) aus Spindle Zellen von Wildtyp- (links) und $\text{HCN1}^{-/-}$ -Mäusen (rechts). Aus einem einfach exponentiellen (oben) und einem zweifach exponentiellen (Mitte) Fit erhaltene Residuen. (B) Statistik der ermittelten Zeitkonstanten.

Da HCN Kanäle zur Steigung der diastolischen Depolarisation beitragen und damit die Feuerfrequenz von Sinusknotenzellen mitbestimmen, stellt sich die Frage, welche Auswirkungen die HCN1 Deletion und die damit verbundene Reduktion der Stromdichte auf die Bildung spontaner Aktionspotentiale haben. Um diesen Einfluss zu untersuchen, wurden die Änderungen des Membranpotentials von isolierten Sinusknotenzellen im Current-Clamp Modus aufgezeichnet. Die elektrophysiologischen Messungen zeigen, dass sowohl Zellen aus Wildtyp- als auch die aus HCN1^{-/-}-Mäusen spontan und regelmäßig feuern (Abb. 22A). Bei den Aktionspotentialmessungen ist eine Verschiebung des Ruhemembranpotentials zu einem negativeren Wert zu beobachten (WT: $-59,9 \pm 1,3$ mV, $n = 11$; HCN1^{-/-}: $-63,9 \pm 1,1$ mV, $n = 8$; $p < 0,05$). Darüber hinaus ist die Feuerfrequenz der Sinusknotenzellen von HCN1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen um $13 \pm 4\%$ reduziert. Einige Messungen wurden in Anwesenheit von Isoprenalin durchgeführt. Wie schon die basale Feuerfrequenz ist auch die Frequenz unter adrenerger Stimulation in HCN1^{-/-}-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen erniedrigt (Abb. 22B). Die relative Frequenzsteigerung ist jedoch unverändert (Tab. 4A; Anhang).

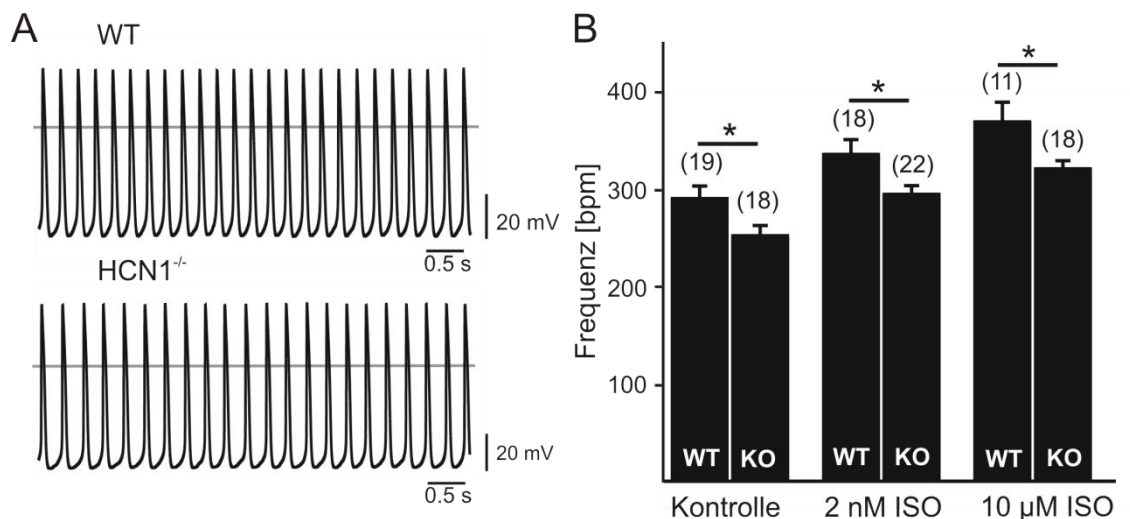


Abb. 22: Sinusknotenzellen von HCN1^{-/-}-Mäusen feuern mit erniedrigter Frequenz. (A) Repräsentative spontane Aktionspotentiale von Sinusknotenzellen von Wildtyp- (oben) und HCN1^{-/-}-Mäusen (unten). (B) HCN1^{-/-}-Zellen (KO) zeigen eine signifikante Reduktion der Feuerfrequenz unter Kontrollbedingungen und nach der Perfusion mit 2 nM oder 10 μM Isoprenalin (ISO). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. * $p < 0,05$

Da im Sinusknoten die Zellen nicht isoliert vorliegen, sondern von benachbarten Zellen beeinflusst werden, wurde in weiteren Experimenten untersucht, inwieweit die auf zellulärer Ebene beobachteten Effekte sich im Zellverband des kompakten Sinusknoten äußern. Hierfür wurden Mikroelektrodenmessungen an aufgespannten Sinusknotenpräparationen und Frequenzmessungen an perfundierten Herzen durchgeführt. Sowohl in Sinusknotenpräparationen von Wildtyp- als auch in denen von HCN1^{-/-}-Mäusen können spontane Aktionspotentiale beobachtet werden (Abb. 23A), wobei die Feuerfrequenz der HCN1^{-/-} im Vergleich zu den Wildtyp-Präparationen um $29 \pm 2\%$ reduziert ist (Tab. 4B; Anhang). Eine vergleichbare Reduktion um $20 \pm 3\%$ der Schlagfrequenz kann auch an isolierten HCN1^{-/-}-Herzen beobachtet werden (Tab. 4C; Anhang). Da sowohl im Sinusknotenexplant als auch im isolierten Herzen keine neuronale Regulation mehr stattfindet, deutet dies darauf hin, dass die Deletion von HCN1 zu einer Reduktion der nur durch das Herz selbst bestimmten Frequenz, der intrinsischen Herzfrequenz, führt. Damit liegt die Vermutung nahe, dass der Ursprung der beobachteten Reduktion der Schlagfrequenz im Sinusknoten zu finden ist. Wie in den Einzelzellmessungen ist die Feuerfrequenz der Sinusknotenpräparationen auch unter adrenerger Stimulation verringert (Abb. 23B). Die relative Steigerung der Feuerfrequenz ist aber auch hier unverändert (Tab. 4B; Anhang). Eine genauere Analyse der Intervalle zwischen zwei aufeinander folgenden Schlägen (ZL, Zykluslänge) zeigt eine viel größere Schwankung der ZL in den Präparationen aus HCN1^{-/-}-Mäusen (Abb. 23C, D). Auch unter Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ Isoprenalin sind diese schnellen Fluktuationen der ZLs in den Sinusknotenpräparationen von HCN1^{-/-}-Mäusen deutlich höher als in denen von Wildtyp-Mäusen (Tab. 4D; Anhang). Um auszuschließen, dass dieser irreguläre Schlagrhythmus frequenzabhängig ist, wurden Wildtyp- und HCN1^{-/-}-Sinusknoten bei gleicher Frequenz miteinander verglichen. Unter normalen Messbedingungen bei $30,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ist in keiner Wildtyp-Präparation eine solch langsame Frequenz wie in HCN1^{-/-}-Präparationen zu sehen. Deshalb wurden Wildtyp-Sinusknoten künstlich durch eine geringere Messtemperatur von 28°C verlangsamt. Aber auch unter diesen Bedingungen sind die Intervalle wesentlich gleichmäßiger als bei HCN1^{-/-}-Mäusen mit einer ähnlichen Frequenz (Abb. 23C). Diese Ergebnisse deuten

stark darauf hin, dass die beobachteten, erhöhten Fluktuationen der Intervalle zwischen den Schlägen im Sinusknoten selbst verursacht werden.

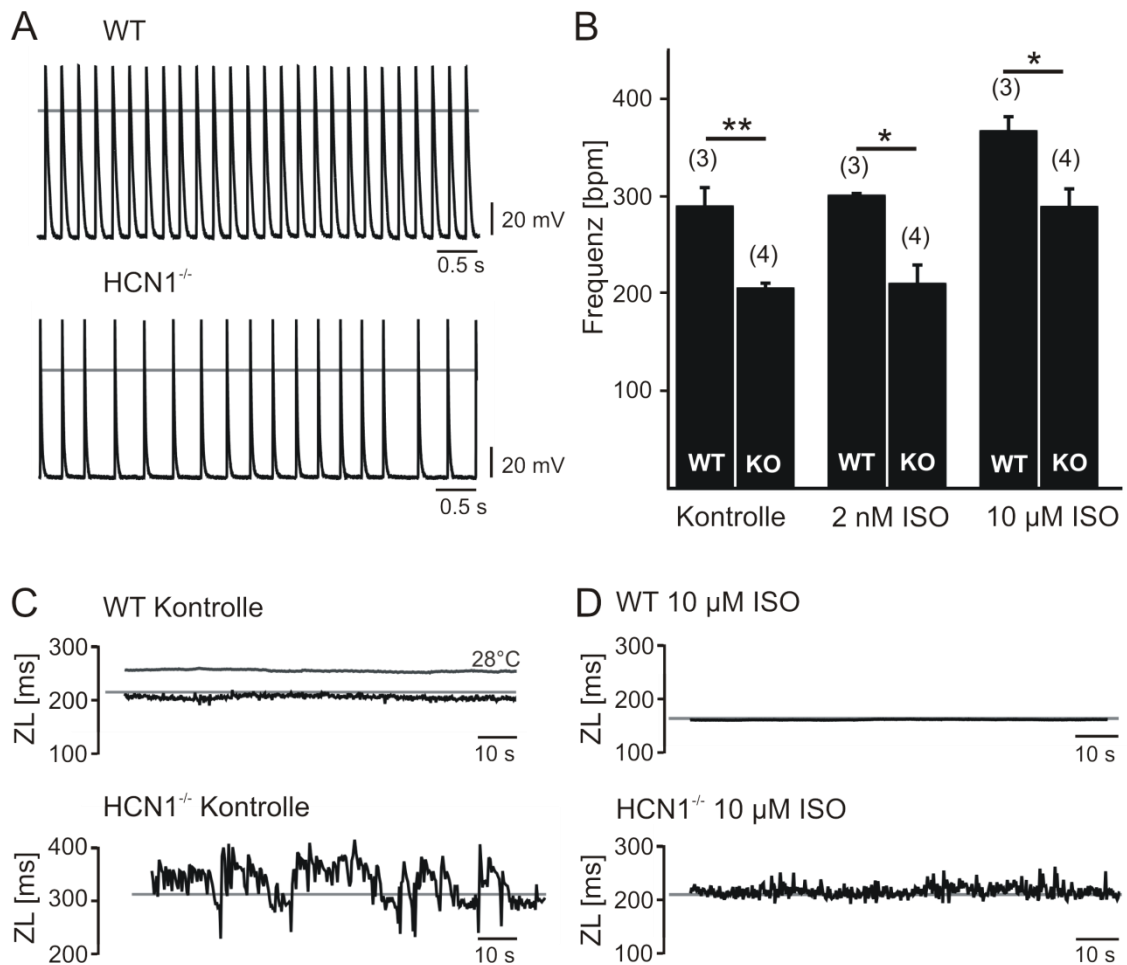


Abb. 23: Reduzierte Feuerfrequenz und verstärkte Varianz der Intervalle zwischen zwei Schlägen (ZL, Zykluslänge) in Sinusknotenpräparationen von HCN1^{-/-}-Mäusen. (A) Repräsentative Aktionspotentiale von Sinusknotenpräparationen von Wildtyp- (oben) und HCN1^{-/-}-Mäusen (unten). (B) Durchschnittliche Feuerfrequenz unter Kontrollbedingungen und nach der Perfusion mit 2 nM oder 10 µM Isoprenalin (ISO). (C) ZL von Sinusknotenpräparationen von Wildtyp- (oben) und HCN1^{-/-}-Mäusen (unten) unter Kontrollbedingungen (C) und nach der Perfusion mit 10 µM ISO (D). Die hellgraue Linie in C und D zeigt die mittlere Sinuszykluslänge. In C ist die ZL von einer Wildtyp-Maus bei 28 °C als dunkelgraue Linie dargestellt. Alle Werte sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. *p < 0,05; **p < 0,01

Die bisherigen Ergebnisse weisen auf eine Fehlfunktion des Sinusknotens hin. Um einen ersten Hinweis für die Ursache dieser Fehlfunktion des Sinusknotens zu erhalten, wurde in Sinusknotenpräparationen die autonome Erregungsbildung des Sinusknotens untersucht. Hierzu wurde die Sinusknoten-Erholungszeit (SNRT, sinus node recovery time) ermittelt. Bei der Bestimmung der SNRT wird der Sinusknoten schneller

stimuliert als er von sich aus schlagen kann. Das führt zu einer Unterdrückung der Schrittmacheraktivität. Die SNRT ist die Zeit, die der Sinusknoten nach Ende der Stimulation braucht, um ein neues Schrittmacherpotential zu generieren. Zur Bestimmung der SNRT wurde im rechten Atrium der Sinusknotenpräparation für 10 s mit 10 Hz mit einer Stimulationselektrode stimuliert (Abb. 24A). Die SNRT ist in $HCN1^{-/-}$ -Mäusen deutlich verlängert (Tab. 5; Anhang). Da das Intervall zwischen dem letzten Stimulus bis zum ersten spontanen Aktionspotential von der Grundfrequenz des Sinusknotens abhängig ist, wurde auch die frequenzkorrigierte SNRT (cSNRT, corrected SNRT) bestimmt. Diese lässt sich aus der Differenz aus SNRT und Sinuszykluslänge (SZL) errechnen. Sie ist in $HCN1^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu der der Wildtyp-Mäuse ebenfalls erhöht (Tab. 5; Anhang). Die Kombination aus den schnellen Schwankungen der ZLs und der verlängerten Sinusknotenerholungszeit zeigt, dass die Deletion des HCN1 Kanals zu Symptomen führt, die für eine Erkrankung des Sinusknotens typisch sind.

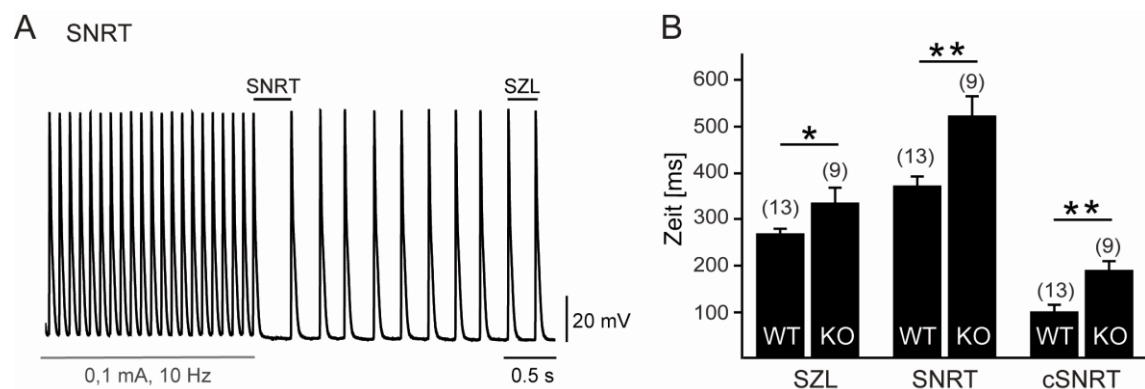


Abb. 24: Verlängerte Sinusknotenerholungszeit in $HCN1^{-/-}$ -Mäusen. (A) Repräsentative Aktionspotentiale von einem Wildtyp-Sinusknoten während und nach dem Protokoll zur Bestimmung der SNRT. (B) Sinuszykluslänge (SZL), Sinusknoten-Erholungszeit (SNRT) und korrigierte SNRT (cSNRT) von Wildtyp und $HCN1^{-/-}$ -Mäusen (KO). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Mit Hilfe einer telemetrischen Langzeit Elektrokardiogramm (EKG)-Messung sollte überprüft werden, ob sich die Vermutung einer Sinusknotendysfunktion im ganzen Tier bestätigen lässt (Abb. 25). Ein besonderer Vorteil bei dieser telemetrischen Messung ist, dass die Mäuse während der Messung bei Bewusstsein sind und sich frei im Käfig bewegen können. In Langzeit-EKG-Messungen über 72 Stunden lässt sich bei $HCN1^{-/-}$ -Mäusen eine eindeutige Bradykardie erkennen (Abb. 25A). Die Bradykardie ist durch

eine niedrigere durchschnittliche Herzfrequenz im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen gekennzeichnet (Abb. 25B; Tab. 6A; Anhang). Auch sind in HCN1^{-/-}-Mäusen häufiger Episoden mit langsamen Herzfrequenzen zu beobachten (Abb. 25C). Die Aktivitäts- und Ruhephasen sind in beiden Mauslinien ähnlich und können somit als Grund für die Bradykardie ausgeschlossen werden. Sowohl die durchschnittliche als auch die minimale und die maximale Herzfrequenz sind in den HCN1^{-/-}-Mäusen erniedrigt. Während der gesamten Aktivitäts- und auch der Ruhephasen ist die Herzfrequenz der HCN1^{-/-}-Mäuse reduziert. So wurde beobachtet, dass HCN1^{-/-}-Mäuse so gut wie nie eine Herzfrequenz von über 600 Schlägen pro Minute aufweisen (Abb. 25C). Die Analyse der dynamischen Breite der Herzfrequenz zeigt aber, dass die Breite der Verteilung der Herzfrequenz in beiden Mauslinien ähnlich, in den HCN1^{-/-}-Mäusen aber zu niedrigeren Herzfrequenzen hin verschoben ist. Auch der relative Grad der Regulation der Herzfrequenz, der Quotient aus der maximalen und der minimalen Herzfrequenz, ist in HCN1^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen ähnlich (Tab. 6B; Anhang). Nach beta-adrenerger Stimulation mit Isoprenalin (0,1mg/kg) erreicht die Herzfrequenz der HCN1^{-/-}-Mäuse nicht die der Wildtyp-Mäuse (Abb. 25B). Die Herzfrequenz der HCN1^{-/-} steigt aber um den gleichen Anteil wie die der Wildtyp-Mäuse (Tab. 6A; Anhang). Die Injektion von Carbachol (0,15 mg/kg) führt zu einer Reduktion der Herzfrequenz von Wildtyp- und HCN1^{-/-}-Mäusen auf einen ähnlichen Wert (Abb. 25B).

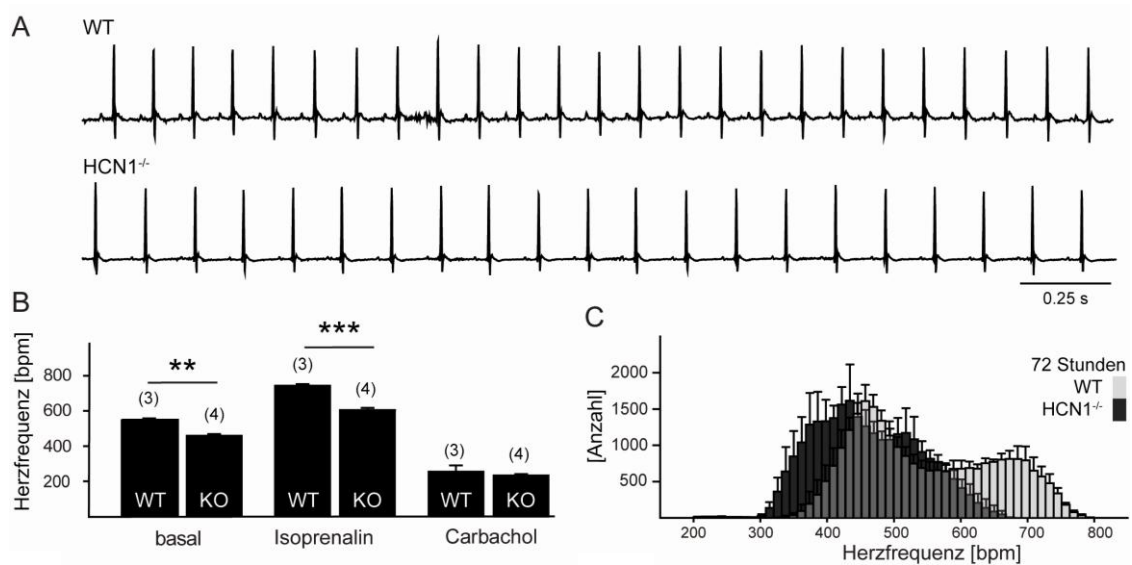


Abb. 25: HCN1^{-/-}-Mäuse zeigen eine Bradykardie. (A) Repräsentative EKG Spuren von Wildtyp- (oben) und HCN1^{-/-}-Mäusen (unten). (B) Durchschnittliche basale Herzfrequenz und Herzfrequenz nach der Injektion von Isoprenalin und Carbachol. (C) Histogramm der Herzfrequenz von Wildtyp- (hellgrau) und HCN1^{-/-}-Mäusen über 72 Stunden. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Im EKG der HCN1^{-/-}-Mäuse sind neben der Bradykardie auch Phasen von wiederkehrenden Sinuspausen zu finden (Abb. 26). Diese werden gelegentlich von einem junktionalem Ersatzrhythmus, einem Ersatzschlag aus dem AV-Knoten, begleitet. Die Ergebnisse aus der EKG-Analyse zeigen, dass auch *in vivo* Symptome einer Sinusknotendysfunktion wie Bradykardie und Sinuspausen beobachten werden können.

Die Erregungsausbreitung über den AV-Knoten und die Kammerschenkel ist normal. (PQ-Intervall: WT: $36,0 \pm 2,9$ ms; HCN1^{-/-}: $37,6 \pm 0,8$ ms).

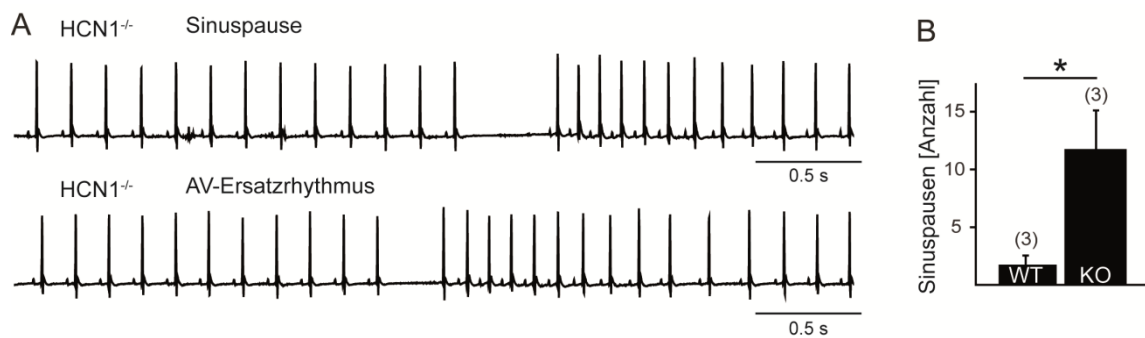


Abb. 26: HCN1^{-/-}-Mäuse zeigen eine Sinusknotendysfunktion. (A) Repräsentative Sinuspause und AV-Ersatzrhythmus von HCN1^{-/-}-Mäusen in Ruhe. (B) Durchschnittliche Zahl der Sinuspausen in einem Untersuchungszeitraum von 6 Stunden. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. * $p < 0,05$

Da es sich bei der untersuchten HCN1^{-/-}-Mauslinie um einen globalen Knockout handelt und die Herzfrequenz auch durch eine Deletion des neuronalen HCN1 Kanals beeinflusst sein könnte, wurde überprüft, inwieweit das vegetative Nervensystem zum beobachteten kardialen Phänotyp der HCN1^{-/-}-Mäuse beiträgt. Hierfür wurde eine Analyse der Herzfrequenzvariabilität (HRV, heart rate variability) durchgeführt. Normalerweise wird diese genutzt, um feine Herzfrequenzmodulationen zu bestimmen und diese, anhand der Schnelligkeit der Modulation, bestimmten Anteilen des vegetativen Nervensystems zuzuordnen. Um eine Aussage über die Variabilität der Herzfrequenz über einen längeren Zeitraum zu machen, wurde die Standardabweichung aller RR-Intervalle (SDRR, standard deviation of all RR intervals) bestimmt. Die SDRR beschreibt die Streuung des RR-Abstandes über den gesamten Zeitraum und ist somit ein Indikator für die Langzeitvariabilität. Schnelle Modulation innerhalb eines kurzen Zeitintervalls werden besser durch das quadratische Mittel aus dem Abstand aufeinander folgender Schläge (RMSDD, root-mean square of the difference of successive RR intervals) beschrieben. Das RMSDD untersucht im Gegensatz zur SDRR nicht die Streuung der RR-Abstände über einen langen Zeitraum, sondern die Änderung der RR-Intervalle im Bezug auf die RR-Intervalle in ihrem direkten Umfeld. Beide Werte wurden in einem Zeitraum von zwei Stunden während der Ruhephase der Mäuse ermittelt.

Die Analyse zeigt in Wildtyp-Mäusen nur eine basale Fluktuation der RR-Intervalle. Dies spricht für einen stabilen Rhythmus der Wildtyp-Herzen. Im Gegensatz dazu ist sowohl

die SDRR als auch das RMSDD in $HCN1^{-/-}$ -Mäusen erhöht. Dies spiegelt die extremen Schwankungen der RR-Intervalle wieder. Anhand der Darstellung in einem Poincaré-Blot kann dies noch besser visualisiert werden. In einem Poincaré-Blot wird ein RR-Abstand (RR, Abszisse) gegen den darauffolgenden RR-Abstand (RR + 1, Ordinate) aufgetragen. Die physiologische Variabilität der Herzfrequenz in Wildtyp-Mäusen spiegelt sich im zugehörigen Poincaré-Blot in der Form einer schmalen Ellipse wieder (Abb. 27A). Im Poincaré-Blot der $HCN1^{-/-}$ -Mäuse ist dagegen eine starke Variabilität zu erkennen, was zu einer Ausbreitung der Punktverteilung vor allem im Bereich der langsamen Herzfrequenzen ($RR > 150$) führt und an die Form eines Kometen erinnert (Abb. 27B). Dies ist typisch für die Pathologie von Arrhythmien und unterstreicht die Hypothese einer Sinusknotendysfunktion.

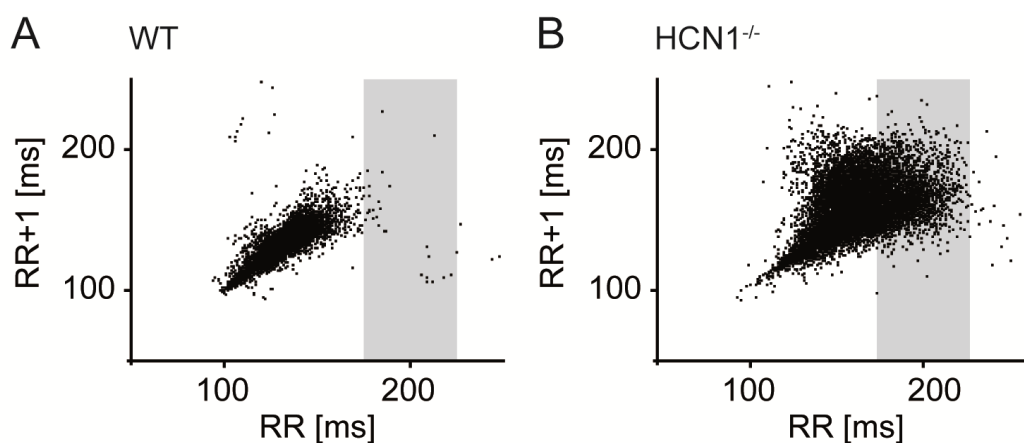


Abb. 27: Sinusknoten-Arrhythmie bei $HCN1^{-/-}$ -Mäusen. (A, B) Repräsentative Poincaré-Blots von Wildtyp- (A) und $HCN1^{-/-}$ -Mäusen (B). RR Intervalle über 180 ms kommen in Wildtyp-Mäuse so gut wie gar nicht vor. In $HCN1^{-/-}$ Mäusen machen diese ein Drittel aller RR Intervalle aus (grauer Bereich).

Die RR-Abstände lassen sich auch in Abhängigkeit von der Zeit in einem Tachogramm darstellen (Abb. 28). Hierbei wird das Intervall zwischen zwei Schlägen gegen die Zeit aufgetragen. Es wurden Tachogramme von Wildtyp- und $HCN1^{-/-}$ -Mäusen für Herzfrequenzen von ungefähr 400 (Ruhephase) und 600 (Aktivitätsphase) Schlägen pro Minute erstellt und miteinander verglichen. Die Tachogramme von Wildtyp-Mäusen zeigen nur eine leichte Variation der RR-Intervalle (Abb. 28A). Wenn, wie bei den Wildtyp-Mäusen, keine Erkrankung des Sinusknotens vorliegt, entstehen diese

Fluktuationen unter anderem durch die gegensätzlichen Effekte von Sympathikus und Parasympathikus. In den Tachogrammen der $HCN1^{-/-}$ -Mäuse können dagegen deutliche Schwankungen der RR-Intervalle beobachtet werden (Abb. 28B). Diese starken Schwankungen sind bei langsamer Herzfrequenz noch auffälliger. Deshalb wurden in der weiteren Analyse Zeitintervalle mit niedriger Herzfrequenz untersucht.

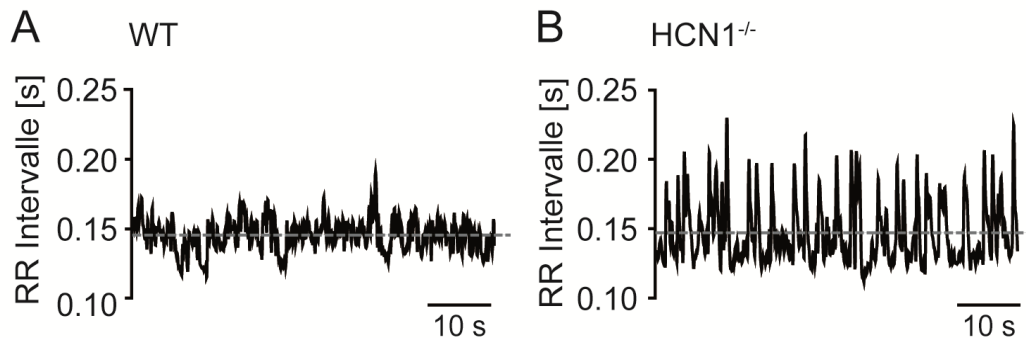


Abb. 28: Extreme Schwankungen im RR-Intervall bei $HCN1^{-/-}$ -Mäusen. Tachogramme von Wildtyp- (A) und $HCN1^{-/-}$ -Mäusen (B) für 60 s während einer Phase mit langsamer Herzfrequenz (~ 400 bpm).

Das Tachogramm der RR-Abstände stellt eine diskrete Zeitreihe dar, welche oszilliert. Wie alle Oszillationen kann auch diese mit einer Fourier Transformation analysiert werden. Nach der Fourier Transformation werden die jeweiligen Frequenzkomponenten, gewichtet nach dem relativem Anteil ihrer Amplitude an der Ursprungsfunktion, in einem Leistungsdichtespektrum dargestellt (Abb. 29). Neben anderen Faktoren kann, wie oben erwähnt, das vegetative Nervensystem die Herzfrequenz modulieren. Es wurde gezeigt, dass die Blockade des Sympathikus mit Propanolol die Leistungsdichte im hochfrequenten Bereich und eine Blockade des Parasympathikus mit Atropin die Leistungsdichte im niederfrequenten Bereich erniedrigt. Basierend darauf können Modulationen der Herzfrequenz im hohen Frequenzbereich (HF, high frequency; 1,5 - 4 Hz) dem Sympathikus und im niederen Frequenzbereich (LF, low frequency; 0,4 - 1,5 Hz) dem Parasympathikus zugeordnet werden. Deshalb kann mit Hilfe der Analyse der Leistungsdichte einzelner Frequenzbänder eine Aussage darüber gemacht werden, inwieweit die beiden Komponenten des vegetativen Nervensystems zur Modulation der Herzfrequenz

beitragen. Die Spektren der $HCN1^{-/-}$ -Mäuse zeigen im Vergleich zu denen der Wildtypen eine deutliche Zunahme der Leistungsdichte in allen Frequenzbereichen (Abb. 29B).

Die Schwankungen der Herzfrequenz entsprechen im gleichen Ausmaß denen der intakten Sinusknotenpräparation. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das vegetative Nervensystem nicht ausschlaggebend für den beobachteten kardialen Phänotyp ist, da dieses in den Sinusknotenpräparationen nicht mehr vorhanden ist.

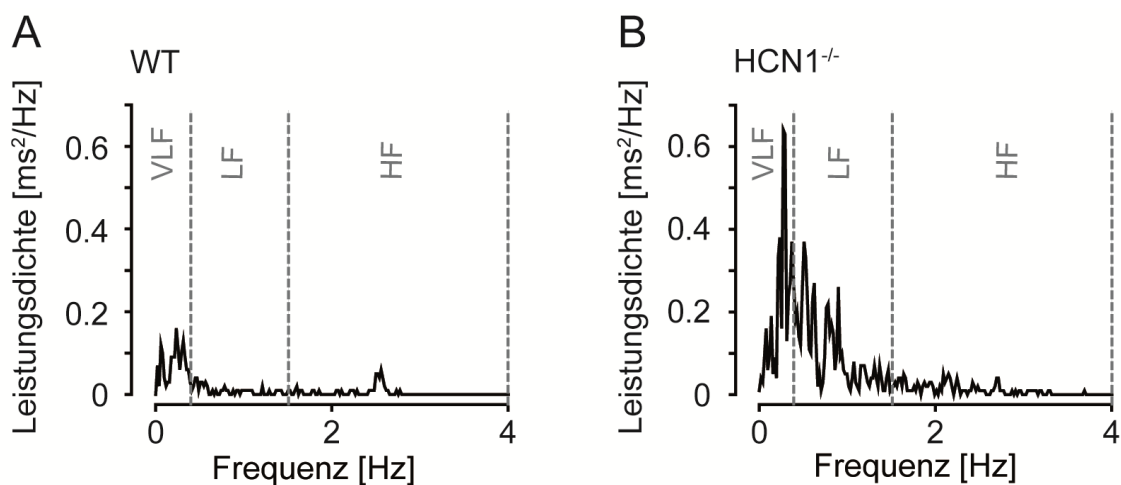


Abb. 29: Erhöhte Herzfrequenzvariabilität in $HCN1^{-/-}$ -Mäusen. Repräsentative Leistungsdichtespektren von Wildtyp- (A) und $HCN1^{-/-}$ -Mäusen (B). Einteilung der Frequenzbereiche in einen hochfrequenten (HF, high frequency; 1,5 - 4 Hz), einen niederfrequenten (LF, low frequency; 0,4 - 1,5 Hz) und einen sehr niederfrequenten (VLF, very low frequency; $< 0,4$ Hz) Bereich.

Die im EKG beobachtete Sinusdysrhythmie und die Sinuspausen können verschiedene Ursachen haben. So können diese sowohl durch eine Störung der Impulsbildung, als auch durch eine gestörte Impulsweiterleitung aus dem Sinusknoten verursacht werden. Um einen Hinweis auf den Grund für die Fehlfunktion des Sinusknotens zu bekommen, wurde eine intrakardiale elektrophysiologischen Untersuchung (EPU) durchgeführt. Neben der Funktion des Sinusknotens wurde mit dieser Methode auch das gesamte Reizleitungssystem auf weitere Auffälligkeiten untersucht. Die EPU wird auch am Menschen angewandt und dient zur Diagnose von Arrhythmien. Hierbei wird ein Katheter mit acht Ringlektroden meist über eine Vene, zum Teil jedoch auch über Arterien, in die zu untersuchende Herzhöhle eingeführt. Diese Methode bringt den

Vorteil, dass sowohl intrakardiale Signale abgeleitet aber auch Stimulationstests durchgeführt werden können. Um die Automatie des Sinusknotens *in vivo* zu überprüfen, wurde, wie schon für die Sinusknotenpräparationen, die SNRT ermittelt (Abb. 30A). In $HCN1^{-/-}$ -Mäusen war diese im Vergleich zu der SNRT der Wildtyp-Mäuse für Stimulationszykluslängen von 110 - 90 ms verlängert (Abb. 30B). Auch die frequenzkorrigierte SNRT (cSNRT) war in $HCN1^{-/-}$ -Mäusen länger (Tab. 7, Anhang). Sowohl in Wildtyp- als auch in $HCN1^{-/-}$ -Mäusen kann eine Abnahme der SNRT bei schnelleren Stimulationszykluslängen beobachtet werden. (Bigger & Reiffel, 1979). Es wird vermutet, dass sehr schnelle Stimulationsfrequenzen eine verstärkte Ausschüttung von Catecholaminen bewirken (Bigger & Reiffel, 1979). Dies würde ein positiveres Membranpotential sowie eine steilere Depolarisation zur Folge haben. Somit entsteht nach dem letzten Stimulus das erste spontane Aktionspotential schneller und die SNRT ist verkürzt (Mandel et al, 1971). Diese Ergebnisse bestätigen *in vivo* die verlängerte SNRT, die in den Mikroelektrodenexperimenten am Sinusknotenpräparat der $HCN1^{-/-}$ -Mäuse festgestellt wurde. Zusammen deuten die Daten auf eine verzögerte Impulstehung im Sinusknoten der $HCN1^{-/-}$ -Mäuse hin.

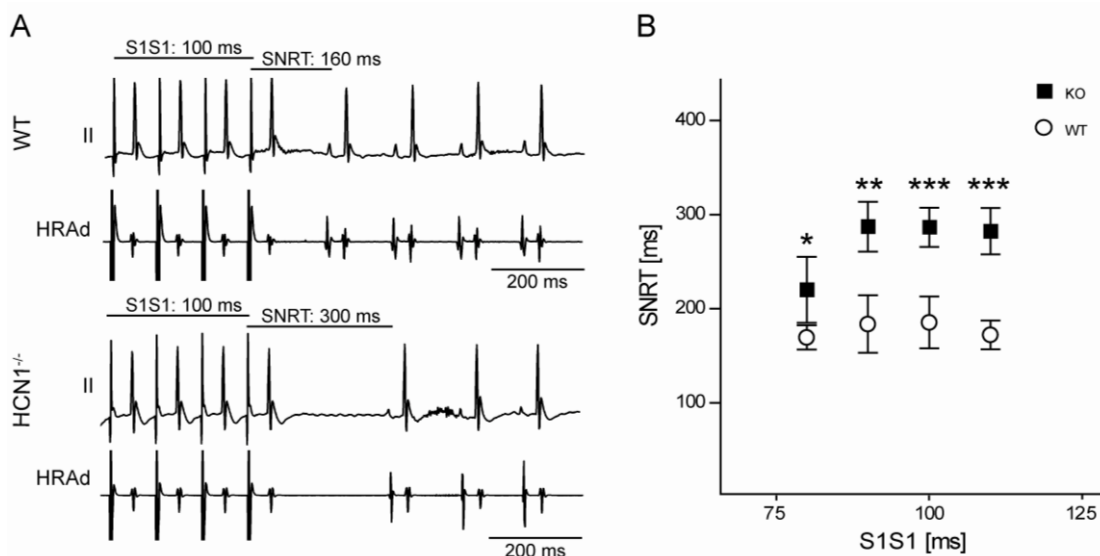


Abb. 30: Die Sinusknoten-Erholungszeit ist in $HCN1^{-/-}$ -Mäusen verlängert. (A) Ableitung II des Oberflächen-EKGs und proximale intraatriale Ableitung (HRAd, high right atrium proximal) in Wildtyp- (oben) und $HCN1^{-/-}$ -Mäusen (unten) während des Stimulationsprotokolls zur Bestimmung der SNRT. (B) Durchschnittliche SNRT-Werte für Wildtyp- (n = 7-8) und $HCN1^{-/-}$ -Mäuse (n = 7-10) bei verschiedenen Stimulationszykluslängen. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. *p < 0,05; **p < 0,01

Ein Parameter, der die Impulsweiterleitung vom Sinusknoten auf das umliegende atriale Gewebe beschreibt, ist die sinuatriale Leitungszeit (SACT, sinoatrial conduction time). Bei der Ermittlung der SACT wurde das Atrium unabhängig vom spontanen Sinuszyklus mit einem einzelnen Stimulus über die Stimulationselektrode erregt und die Reaktion des Sinusknotens beobachtet. Nach vorzeitigem atrialen Stimulus wurden die spontane Sinuszykluslänge (A1A1), das Kopplungsintervall des vorzeitigen Stimulus (A1A2), der atriale Return-Zyklus (A2A3) und der Post-Return-Zyklus (A3A4) wie in Abb. 13 bestimmt.

Abb. 31 veranschaulicht die verschiedenen Antworten auf unterschiedliche Kopplungsintervalle. Bei einer frühzeitigen Stimulation im Atrium breitet sich die Erregung in zwei Richtungen aus. In Richtung Ventrikel (nicht dargestellt) und über die sinuatriale Verbindung in den Sinusknoten. Die Reaktion des Sinusknotens hängt von dem Zeitpunkt des Extrastimulus im Sinusrhythmus ab. Man unterscheidet zwischen der „zone of non reset“, der „zone of reset“ und der „zone of interpolation“. Sehr späte Extrastimuli führen zu einer Kollision mit der herausgeleiteten Aktivierung A1 des vorangegangenen spontanen Impulses aus dem Sinusknoten. Die Erregung kann nicht in den Sinusknoten eindringen und diesen somit nicht zurücksetzen (zone of non reset). Die Erregungsbildung im Sinusknoten bleibt von der Kollision unbeeinflusst. Somit entsteht der nächste spontane Impuls nach einer normalen Sinuszykluslänge. Das führt dazu, dass während der „zone of non reset“ das A1A3 Intervall immer doppelt so groß ist wie das A1A1 Intervall.

Bei vorzeitigeren Stimuli A2 kommt es zu keiner Kollision und die Erregung kann retrograd in den Sinusknoten geleitet werden und diesen zurücksetzen (zone of reset). Genau eine Sinuszykluslänge nach dem Zurücksetzen des Sinusknotens durch den Stimulus entsteht im Sinusknoten ein neuer Impuls. Das A2A3 Intervall ist jetzt die Summe aus der Leitungszeit in den Sinusknoten, der Sinuszykluslänge und der Leitungszeit aus dem Sinusknoten heraus. Theoretisch ist dieses Intervall während der „zone of reset“ unabhängig vom Kopplungsintervall A1A2 immer gleich lang.

Bei sehr kurzen Kopplungsintervallen kann aufgrund der Refraktärphase des Sinusknotens und des umliegenden Gewebes ein sinuatrialer Eingangs-Block auftreten. In diesem Fall wird der Impuls nicht in den Sinusknoten geleitet und dieser nicht

zurückgesetzt (zone of interpolation). Auch hier ist die Erregungsbildung im Sinusknoten unbeeinflusst und die nächste Erregung entsteht im Sinusknoten nach einer normalen Sinuszykluslänge. Das führt dazu, dass das A1A3 Intervall genauso lang ist wie das A1A1 Intervall.

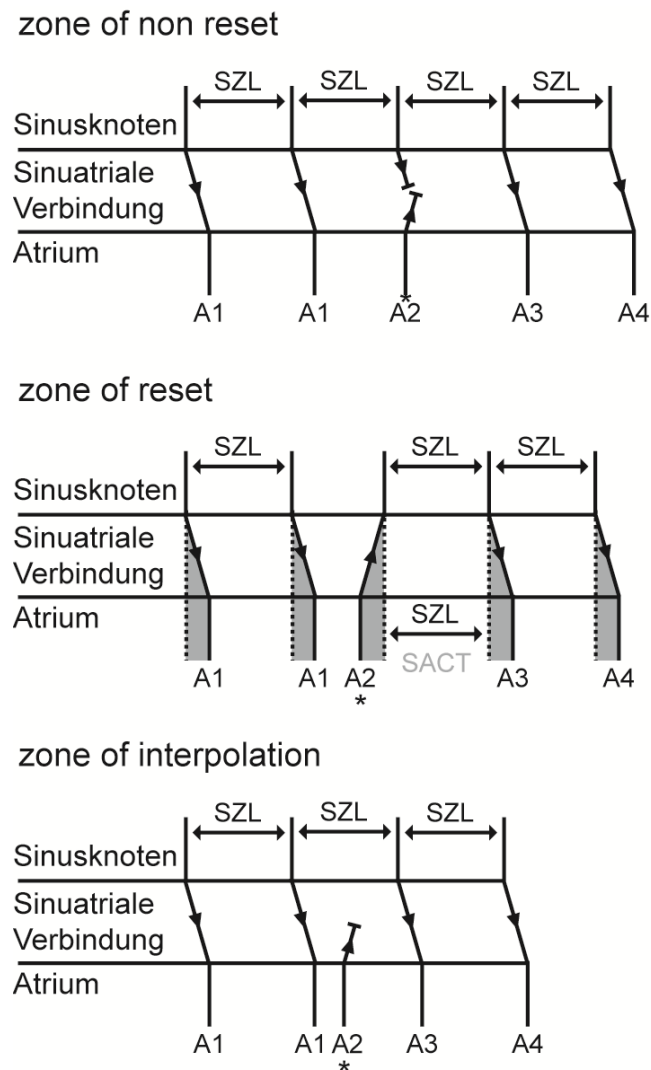


Abb. 31: Diagramm zur Veranschaulichung verschiedener Antworten auf vorzeitige atriale Stimulation. „zone of non reset“: es kommt zu einer Kollision mit dem herausgeleiteten Impuls, der Sinusknoten wird nicht zurückgesetzt; „zone of reset“: der Stimulus dringt in den Sinusknoten ein und setzt ihn zurück; „zone of interpolation“: das Gewebe ist refraktär und es kommt zu einem Eingangs-Block.

Um die SACT zu bestimmen, wurden die normalisierten Intervalle $A2A3/A1A1$ und $A3A4/A1A1$ gegen $A1A2/A1A1$ aufgetragen (Abb. 32). Für sehr späte Extrastimuli, die in die „zone of non reset“ fallen, ist die Erregungsbildung von der Kollision unbeeinflusst und das $A1A3$ Intervall unabhängig vom Kopplungsintervall $A1A2$ immer gleich lang. In der „zone of non reset“ befinden sich die Datenpunkte auf einer kompensatorischen Diagonale. Das bedeutet, dass, wenn sich das Kopplungsintervall $A1A2$ verkürzt, verlängert sich der dazugehörige Return-Zyklus $A2A3$ um denselben Anteil ($A1A2 + A2A3 = 2 \cdot A1A1$).

Frühere Extrastimuli treffen den Sinusknoten in der „zone of reset“. In dieser Phase dringt der Stimulus in den Sinusknoten ein, depolarisiert ihn vorzeitig und setzt ihn damit zurück. Die nächste spontane Erregung wird nach einer Sinuszykluslänge gebildet. Diese Erregung entsteht früher als im normalen Sinusrhythmus. Somit ist die Summe der Intervalle $A1A2$ und $A2A3$ kleiner als die doppelte spontane Sinuszykluslänge. Deshalb befinden sich die Datenpunkte nicht mehr auf der kompensatorischen Diagonalen, sondern unter ihr. Das $A2A3$ Intervall bleibt unabhängig vom Kopplungsintervall $A1A2$ in einigen Tieren konstant und die Datenpunkte bilden wie in Abb. 32 ein Plateau.

Sind die Kopplungsintervalle $A1A2$ sehr kurz, fallen sie in die „zone of interpolation“. In dieser Phase sind der Sinusknoten und das umliegende Gewebe refraktär. Folglich kann der atriale Stimulus nicht in Richtung Sinusknoten geleitet werden. Daher wird nach einer normalen Sinuszykluslänge ein neuer Impuls vom Sinusknoten generiert. Somit ist die Summe der Intervalle $A1A2$ und $A2A3$ genauso lang wie eine normale Sinuszykluslänge $A1A1$. Dies führt dazu, dass betreffende Datenpunkte auf der unteren Diagonale zu finden sind.

Der Wert, an dem der Graph die kompensatorische Diagonale verlässt, wurde als SACT definiert. $HCN1^{-/-}$ -Mäuse weisen im Vergleich zu Wildtypen eine verlängerte SACT auf (WT: $16,1 \pm 1,9$ ms, $n = 9$; $HCN1^{-/-}$: $28,3 \pm 2,4$ ms, $n = 10$; $p < 0,01$). Die in den telemetrischen EKG-Messungen beobachtete Sinusarrhythmie und die damit verbundenen schnellen Änderungen der spontanen Sinuszykluslänge könnten einen Einfluss auf die Berechnung der SACT haben. So wurde ein Bereich für die SACT berechnet, der sowohl die längsten als auch die kürzesten gemessenen

Sinuszykluslängen berücksichtigt. Der Bereich für die SACT liegt für die Wildtyp-Mäuse bei 13,6 - 17,5 ms (n = 9) und für HCN1^{-/-}-Mäusen bei 25,5 - 38,8 ms (n = 10). Damit ist die SACT in diesem Fall unabhängig von sich ändernden Sinuszykluslängen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die HCN1 Deletion im Sinusknoten nicht nur zu einer gestörten Impulsgenerierung, sondern auch zu einer verzögerten Überleitung des Impulses auf das Atrium führt. Diese Daten passen gut in das klinische Bild der Sinusknoten-dysfunktion.

In Abb. 32 wurde auch der Zyklus nach dem Return-Zyklus (Post-Return-Zyklus A3A4) dargestellt. Der Vergleich des Post-Return-Zyklus mit der Sinuszykluslänge dient zur Überprüfung der Schwankung der Sinuszykluslänge und der Automatie des Sinusknotens. Die Datenpunkte für den Post-Return-Zyklus liegen in der „zone of non reset“ und in der „zone of reset“ nahe der horizontalen Linie, die die durchschnittliche Sinuszykluslänge zeigt. Dies ist ein Zeichen dafür, dass die vorzeitigen Extrastimuli keine Unterdrückung oder einen anderen Einfluss auf die Automatie des Sinusknotens zur Folge haben.

Aus dem Übergang zwischen der „zone of reset“ und der „zone of interpolation“ lässt sich die effektive Refraktärzeit des Sinusknotens (SNERP, effective sinus node refractory period) bestimmen (Abb. 32). Die SNERP ist definiert als das längste Kopplungsintervall A1A2, bei dem die Erregung auf einen refraktären Sinusknoten trifft und deshalb nicht in den Sinusknoten geleitet werden kann. Es ergab sich kein Unterschied in der SNERP zwischen WT und HCN1^{-/-}-Tieren (WT: 48,80 ± 3,10 ms, n = 9; HCN1^{-/-}: 51,20 ± 2,40 ms, n = 10).

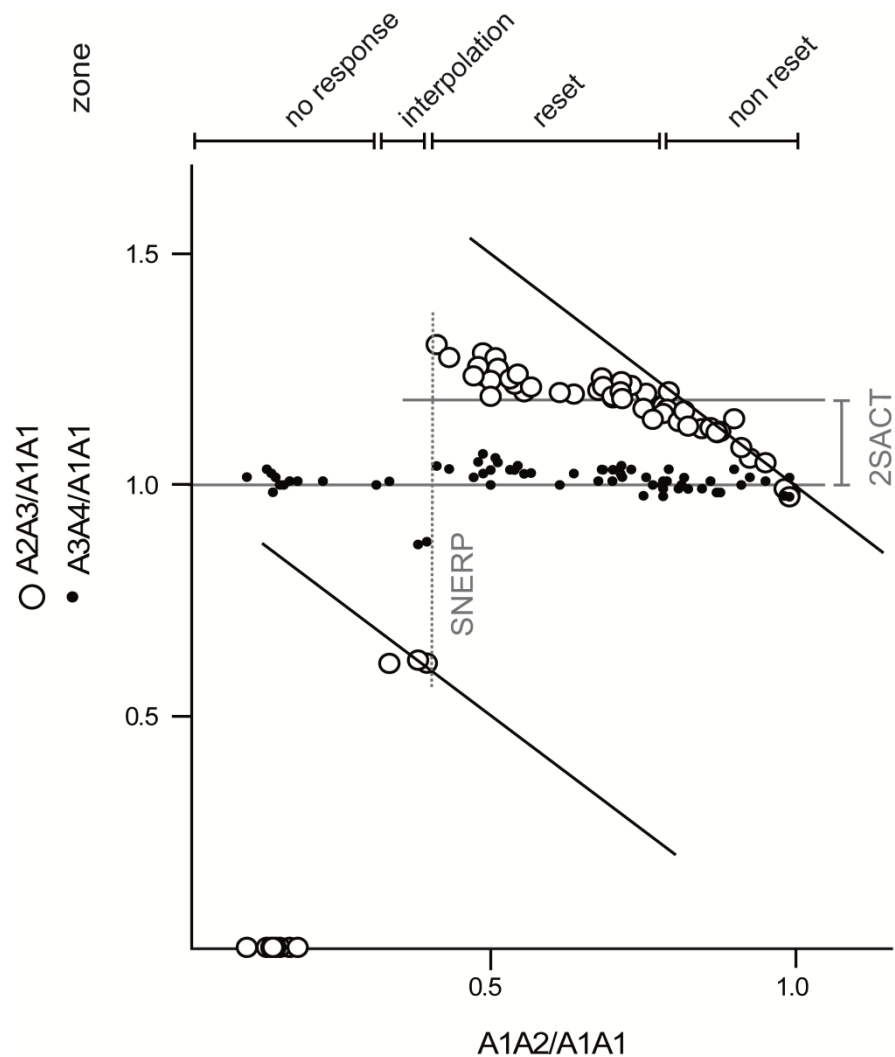


Abb. 32: Graph zur Bestimmung der SACT. Jeder Punkt repräsentiert ein Test-Kopplungsintervall. Die untere horizontale Linie zeigt die durchschnittliche Sinuszykluslänge. SACT: Sinuatriale Leitungszeit; SNERP: relative Refraktärzeit des Sinusknotens

Neben der Funktion des Sinusknotens wurden auch das nachfolgende Reizleitungssystem sowie die Refraktärzeit des Atriums und des Ventrikels untersucht. Die Analyse der effektiven Refraktärzeiten von Atrium, AV-Knoten und Ventrikel zeigen keine Unterschiede zwischen $HCN1^{-/-}$ - und Wildtyp-Mäusen. Auch der Wenckebachpunkt, bei dem es sich um die Stimulationszykluslänge handelt bei der keine 1:1 Überleitung von Vorhof auf den Ventrikel mehr zu beobachten ist, ist unverändert (Tab. 8, Tab. 9; Anhang).

Um die atrioventrikuläre Überleitung zu untersuchen, wurden AV-Leitungskurven erstellt. Hierzu wurden die bei der Bestimmung der Refraktärzeit des AV-Knotens

gewonnenen Daten verwendet. Bei der Analyse dieser Daten konnte bei drei Wildtyp- und sechs $HCN1^{-/-}$ -Mäusen in der intrakardialen Ableitung ein His-Bündel Signal beobachtet werden (Abb. 33; H: His Signal).

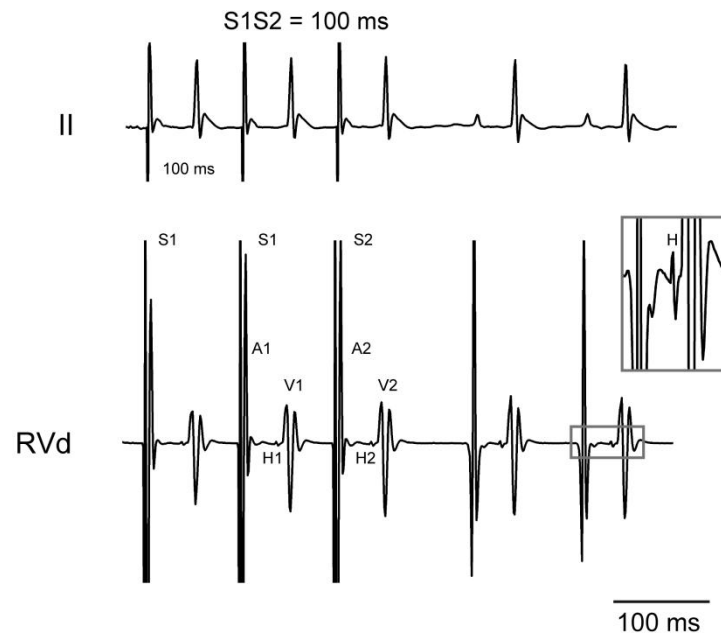


Abb. 33: AV-Überleitung wurde durch vorzeitige atriale Stimulation ermittelt. Der sich immer verkürzende Extrastimulus S2 wurde nach einer Abfolge von acht Stimuli ($S1S1 = 100$ ms) appliziert. Ableitung II des Oberflächen-EKGs (oben), distale intraventrikuläre Ableitung (RVd, right ventricle distal) (unten). S: Stimulationsartefakt; A: atriales Signal; H: His-Bündel-Signal; V: ventrikuläre Signal

Aus einer AV-Überleitungskurve lassen sich die verschiedenen Refraktärzeiten des AV-Knotens bestimmen. Hierzu wurden die Intervalle $V1V2$ bzw. $H1H2$ gegen $A1A2$ aufgetragen (Abb. 34). $A2$ ist hierbei das atriale Signal auf den vorzeitigen Stimulus $S2$. $H2$ und $V2$ sind die dazugehörigen His- bzw. Ventrikel-Signale (Abb. 33).

Wenn sich das Kopplungsintervall $A1A2$ verkürzt, verkürzt sich das $V1V2$ Intervall um den gleichen Anteil. Somit liegen die Datenpunkte auf der eingezeichneten grauen Diagonale. Diese Diagonale stellt die theoretische Linie dar bei der sich keine AV-Überleitungsverzögerung zeigt. Deshalb haben die $V1V2$ Intervalle für alle $A1A2$ Intervalle, die sich auf dieser Linie befinden, die gleiche Länge wie das dazugehörige $A1A2$ Intervall. Das $A1A2$ Intervall, an dem die Datenpunkte beginnen von der Diagonale abzuweichen (85 ms in Abb. 34), beschreibt den Beginn der relativen

Refraktärzeit des AV-Knotens (AVNRRP, relative atrioventricular nodal refractory period). Als die relative Refraktärzeit von Herzgewebe wird das längste Kopplungsintervall bezeichnet, welches zu einer, verglichen mit der basalen Erregungsleitung, verzögerten Weiterleitung des Stimulus innerhalb des Gewebes führt. Bei einem bestimmten A1A2 Intervall (62 ms in Abb. 34) zeigt die AV-Überleitungskurve ein Minimum (75 ms in Abb. 34). Dieses Minimum ist als die funktionelle Refraktärzeit des AV-Knotens (AVNFRP, functional atrioventricular nodal refractory period) definiert. Die funktionelle Refraktärzeit von Herzgewebe beschreibt das kürzeste mögliche Intervall in dem zwei Impulse nacheinander durch das Gewebe geleitet werden können. Wenn das A1A2 Intervall nach diesem Minimum weiter verkürzt wird, verlängert sich das V1V2 Intervall wieder, bis ein kompletter Block der AV-Überleitung eintritt. Das längste Kopplungsintervall, bei der keine Überleitung mehr beobachtet wird, ist die effektive Refraktärzeit des AV-Knotens (AVNERP, effective atrioventricular nodal refractory period).

In der AV-Überleitungskurve wurden auch die H1H2 Intervalle gegen A1A2 aufgetragen (Abb. 34). Sie fallen genau mit den Punkten der ermittelten V1V2 Intervalle zusammen. Daraus lässt sich ableiten, dass das H2V2 Intervall unabhängig von der Länge des Kopplungsintervalls konstant bleibt. Somit beschränkt sich der Anstieg der AV-Überleitungszeit bei vorzeitiger atrialer Stimulation auf den AV-Knoten und befindet sich zwischen Atrium und His-Bündel. Weder die Form der Überleitungskurve noch die Werte, die sich aus diesen ableiten lassen, unterscheiden sich in HCN1^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen.

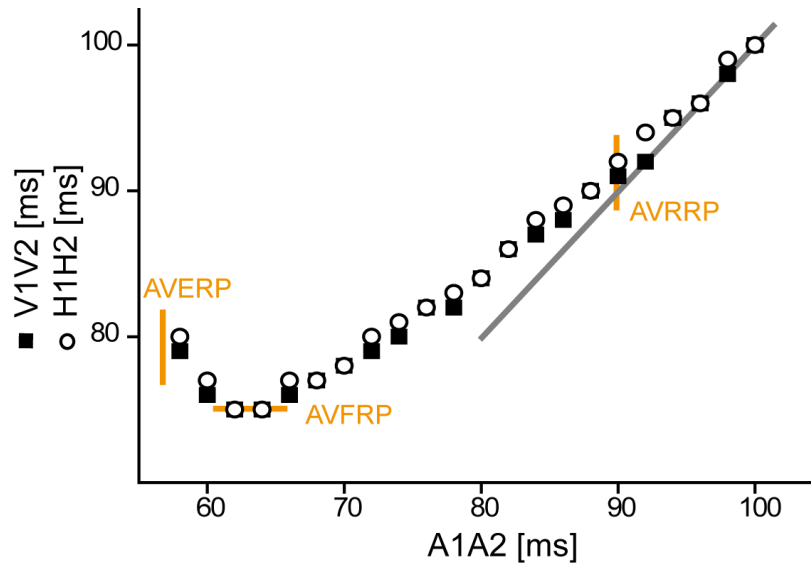


Abb. 34: AV-Überleitungskurve; relative Refraktärzeit des AV-Knotens (AVRRP, relative atrioventricular nodal refractory period); funktionelle Refraktärzeit des AV-Knotens (AVFRP, functional atrioventricular nodal RP); effektive Refraktärzeit des AV-Knotens (AVNERP, effective atrioventricular nodal RP); V: Ventrikel-Signal, H: His-Bündel-Signal, A: atriales Signal

Eine andere Möglichkeit der Darstellung der Refraktärzeiten des AV-Knotens bietet die Latenzkurve. Hier wird die aktuelle Leitungszeit durch den AV-Knoten in Abhängigkeit vom Kopplungsintervall des frühzeitigen Stimulus abgebildet. Um eine Latenzkurve zu erhalten, wurden A2V2 Intervalle ebenfalls gegen A1A2 aufgetragen (Abb. 35). Solange es zu keiner AV-Überleitungsverzögerung kommt, bleiben die A2V2 Intervalle konstant (horizontale graue Linie in Abb. 35). Dieser Bereich korrespondiert mit der grauen Diagonale in Abb. 34. Sobald die A1A2 Intervalle kürzer sind als die AVNRRP und es zu einer Verzögerung der Überleitung kommt, verlängert sich das A2V2 Intervall. In der Regel gibt es einen Bereich der Latenzkurve, in welchem die Verlängerung des A2V2 Intervalls der Verkürzung des A1A2 Intervalls entspricht. Datenpunkte in diesem Bereich liegen auf der grauen Diagonale in Abb. 35 mit der Steigung -1.

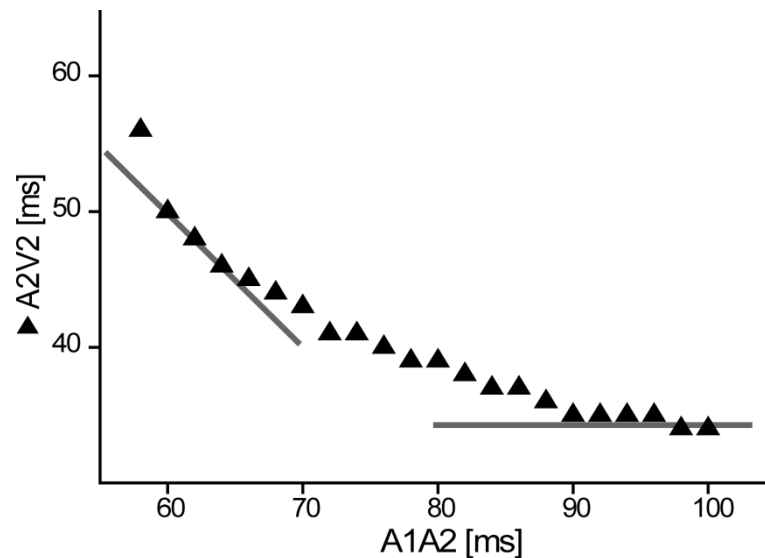


Abb. 35: Latenzkurve des AV-Knotens, V: Ventrikel-Signal, H: His-Bündel-Signal, A: atriales Signal

Um die Latenzkurven der $HCN1^{-/-}$ mit denen der Wildtyp-Mäuse vergleichen zu können, wurden für A1A2 Intervalle von 100 ms und 80 ms die korrespondierenden A2V2 Intervalle ermittelt. Hierbei unterscheiden sich die für $HCN1^{-/-}$ -Mäuse bestimmten Wert nicht von denen der Wildtyp-Mäusen.

Abschließend wurden in Kooperation mit dem Institut von Prof. Christian Kupatt die hämodynamischen Konsequenzen des beobachteten kardialen Phänotyps *in vivo* überprüft. *In vivo* Daten aus der Herzechokardiographie zeigten, dass die Bradykardie der $HCN1^{-/-}$ -Mäuse zu einer hämodynamisch relevanten Reduktion des Herzzeitvolumens auf 69% führt. Gleichzeitig ist das Schlagvolumen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unverändert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es zu keiner Kompensation der verlangsamten Herzfrequenz, vor allem nicht durch ein gesteigertes Schlagvolumen, kommt. *In vivo* Blutdruckmessungen ergeben keine Unterschiede im systolischen und diastolischen Blutdruck zwischen beiden Mauslinien (systolischer Blutdruck: WT: 118 ± 5 mmHg; $HCN1^{-/-}$: 114 ± 3 mmHg; diastolischer Blutdruck: WT: 74 ± 3 mmHg; $HCN1^{-/-}$: 67 ± 8 mmHg; WT: n = 6, $HCN1^{-/-}$: n = 3). Zusammen lassen die Daten erkennen, dass der primäre Grund für das reduzierte Herzzeitvolumen die verringerte Herzfrequenz ist.

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass der HCN1 Kanal einen physiologisch relevanten Beitrag zum I_f im zentralen Sinusknoten leistet. Eine Deletion des HCN1 Kanals führt zu einer gestörten Impulsbildung und zum anderen zu einer verzögerten Impulsweiterleitung. Dies äußert sich in HCN1^{-/-}-Mäusen in einer Sinusknotendysfunktion, welche durch eine Bradykardie, eine Arrhythmie und wiederkehrenden Sinuspausen charakterisiert ist. Die hämodynamische Folge der Bradykardie ist ein reduziertes Schlagvolumen.

Zu diesem komplexen Phänotyp können verschiedene Mechanismen beitragen. Daten aus heterologen Expressionsstudien und die Untersuchung des hippocampalen I_f , der hauptsächlich durch HCN1 getragen ist, schreiben dem HCN1 Kanal ein besonderes biophysikalisches Profil zu. Innerhalb der HCN Familie ist HCN1 die Isoform, die mit der schnellsten Kinetik und bei den positivsten Potentialen aktiviert (Biel et al, 2009). Dies wird durch die beobachtete verlangsamte Aktivierungskinetik des verbleibenden Stroms in HCN1^{-/-}-Sinusknotenzellen bestätigt. Der Reststrom wird hauptsächlich vom wesentlich langsamer aktivierenden HCN4 getragen. Somit fehlt in den Sinusknotenzellen von HCN1^{-/-}-Mäusen die schnelle HCN1 Stromkomponente und die Aktivierungskinetik ist verlangsamt. Die Aktivierungskinetiken der einzelnen HCN Isoformen spielen unter physiologischen Bedingungen vermutlich keine Rolle. Die Deaktivierung eines vollständigen aktivierten HCN1 Kanals während der Depolarisation der Zellmembran ist wesentlich länger als das Intervall zwischen zwei Aktionspotentialen (Fenske et al, 2011). Somit bleibt dem HCN1 Kanal nicht genug Zeit, um zwischen zwei Aktionspotentialen zu deaktivieren und der Kanal ist die ganze Zeit offen.

Eine weitere Besonderheit des HCN1 Kanals ist seine, verglichen mit HCN2 und HCN4, schwache Modulation durch cAMP (Abb. 36) (Biel et al, 2009). Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass die chronotrope Kompetenz in den HCN1^{-/-}-Mäusen gewahrt bleibt. Die Deletion des für cAMP wenig sensitiven HCN1 Kanals führt zwar zu einer Bradykardie, der relative Anstieg der Herzfrequenz nach adrenerger Stimulation bleibt jedoch unbeeinflusst.

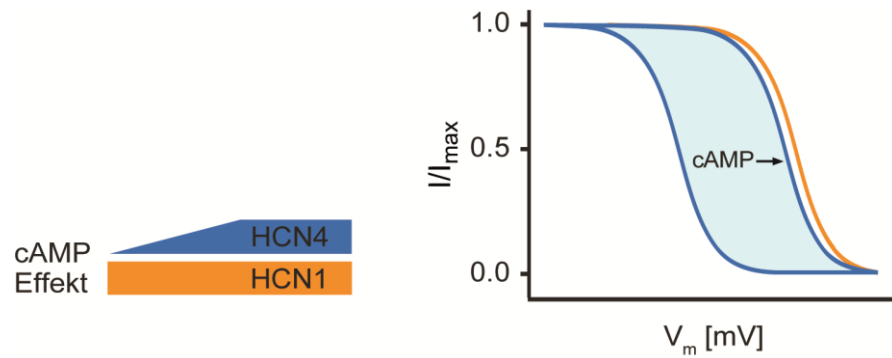


Abb. 36: Modulation des HCN4 (blau) und HCN1 (orange) durch cAMP. Die Bindung von cAMP bewirkt eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurve zu positiveren Potentialen. So kann cAMP den Einfluss von HCN4 verstärken. Der HCN1 Kanal wird durch cAMP so gut wie nicht moduliert.

Diese speziellen biophysikalischen Eigenschaften lassen vermuten, dass ein Großteil der HCN1 Kanäle unter basalen Bedingungen offen ist und im zentralen Sinusknoten einen basalen depolarisierenden Strom leitet. Dieser Strom ermöglicht die Öffnung anderer Ionenkanäle, die an der langsamen diastolischen Depolarisation (SDD, slow diastolic depolarisation) teilnehmen. Wenn, wie für die $HCN1^{-/-}$ -Mäuse gezeigt, dieser depolarisierende I_f reduziert ist, ist die Steigung der SDD geringer. Somit ist die Zeit bis zum Erreichen des Schwellenpotentials, bei dem ein Aktionspotential entsteht, verlängert und die Bildung des Aktionspotentials dadurch verzögert (Abb. 37). Dies würde die in $HCN1^{-/-}$ -Mäusen beobachtete Bradykardie erklären.

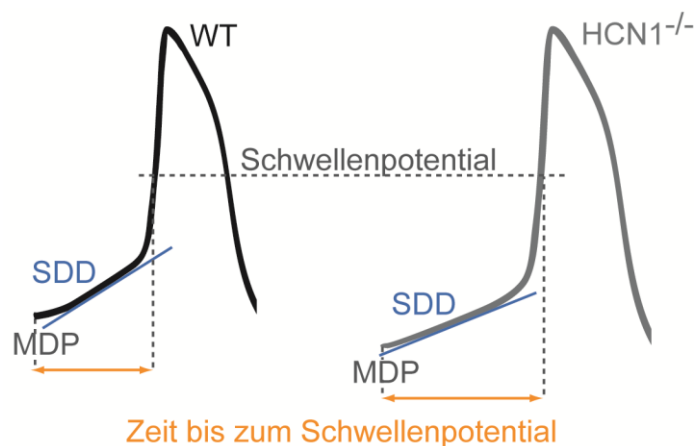


Abb. 37: gestörte Impulsentstehung im Sinusknoten von $HCN1^{-/-}$ -Mäusen; in $HCN1^{-/-}$ -Mäusen ist die Steigung der langsamen diastolischen Depolarisation (SDD, slow diastolic depolarisation) geringer und die Zeit bis zum Erreichen des Schwellenpotentials verlängert. MDP: maximales diastolisches Potential

Neben der Bradykardie zeigt das EKG der HCN1^{-/-}-Mäuse eine auffällige Sinusarrhythmie, die durch extreme Schwankungen der Herzfrequenz und wiederkehrenden Sinuspausen charakterisiert ist. Da es sich bei der untersuchten Mauslinie um einen globalen Knockout handelt, könnten die Fluktuationen der Herzfrequenz theoretisch auch neuronal bedingt sein. Die Tatsache, dass ähnliche Schwankungen auch in isolierten Sinusknotenpräparaten, in denen das vegetative Nervensystem nicht mehr vorhanden ist, zu beobachten sind, gibt aber einen ersten Hinweis darauf, dass der Sinusknoten der Ursprung der Arrhythmie ist. Weiter verstärkt wird diese Hypothese durch die erhöhte Herzfrequenzvariabilität in HCN1^{-/-}-Mäusen. Ein veränderter Einfluss des vegetativen Nervensystems auf die Herzfrequenz würde sich in einer verringerten Herzfrequenzvariabilität zeigen. Somit lässt sich der Einfluss des vegetativen Nervensystems nahezu ausschließen. Auch die verlängerte SNRT in HCN1^{-/-}-Mäusen deutet darauf hin, dass die Arrhythmie und die Sinuspausen durch eine gestörte Impulsentstehung im Sinusknoten verursacht werden.

Es wurde gezeigt, dass im Sinusknoten von HCN1^{-/-}-Mäusen nicht nur die Impulsentstehung, sondern auch die Erregungsweiterleitung gestört ist. Eine Erklärung für die verlängerte sinuatriale Leitungszeit könnte sein, dass durch das negativere maximale diastolische Potential (MDP) die Entfernung zum Schwellenpotential größer ist (Abb. 38). Dadurch benötigt eine Zelle mehr Strom, um eine benachbarte Zelle bis zum Schwellenpotential zu depolarisieren. Dies führt zu einer verlangsamten Weiterleitung der Erregung. Ein negativeres MDP erhöht allerdings auch die Verfügbarkeit von spannungsgesteuerten L-Typ Ca²⁺-Kanälen und Na⁺-Kanälen. Folglich würde die maximale Steigung des Aktionspotentials (dV/dt_{max}) und somit die Leitungsgeschwindigkeit zunehmen. Da aber die sinuatriale Leitungszeit in HCN1^{-/-}-Sinusknoten erhöht ist, scheint dieser konkurrierende Effekt nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

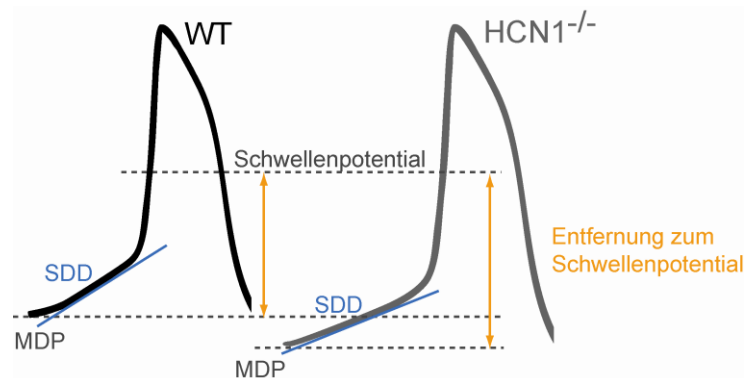


Abb. 38: verlängerte Erregungsleitung in $HCN1^{-/-}$ -Mäusen; ein negativeres maximales diastolisches Potential (MDP) vergrößert in $HCN1^{-/-}$ -Sinusknotenzellen die Entfernung zum Schwellenpotential.

Aus Untersuchungen am Sinusknoten des Kaninchens ist bekannt, dass die Erregung, die zur Kontraktion des ganzen Herzens führt, nur in einer kleinen Region innerhalb des Sinusknotens, dem dominanten Schrittmacherzentrum, entsteht. Die Schrittmacherregion ist der Bereich im Sinusknoten, in dem die Sinusknotenzellen die höchste Feuerfrequenz haben. Die spontane Aktivität aller anderen Zellen innerhalb des Sinusknotens wird von diesem taktgebenden Schrittmacherzentrum unterdrückt. Diese Schrittmacherregion ist jedoch nicht statisch. Während autonomer Stimulation kann sie sich innerhalb des Sinusknotens verlagern (Boyett et al, 2000). Im Sinusknoten werden nicht alle Zellen gleich stark durch Isoprenalin aktiviert. Das führt dazu, dass sich die Schrittmacherregion für die gesamte Dauer der Stimulation in Richtung Vena cava superior schiebt (Glukhov et al, 2010). Wenn sich aber das Schrittmacherzentrum unter basalen Bedingungen von Erregung zu Erregung ständig verschiebt, kann das zu einer Arrhythmie führen (Dobrzynski et al, 2007). Eine stabile, gleichbleibende Position des taktgebenden Schrittmachers trägt zu der in Wildtyp-Mäusen beobachteten stabilen Herzfrequenz bei. Im Gegensatz dazu könnten eine ständig ungerichtete Verschiebung des Schrittmacherzentrums oder mehrere konkurrierende Schrittmacherzentren zu der beobachteten Sinusarrhythmie in $HCN1^{-/-}$ -Mäusen führen. Solch ein Mechanismus wurde bereits für die Sinusdysrhythmie der heterozygoten Ankyrin-B Knockout Maus gezeigt (Glukhov et al, 2010). Es ist gut vorstellbar, dass der $HCN1$ Kanal während der frühen Depolarisation und der späten Repolarisation durch seine Aktivität den Membranwiderstand erniedrigt. Dies hat zur Folge, dass eine Zelle mehr

Strom benötigt, um die Aktionspotentialgenerierung benachbarter Schrittmacherzellen zu beeinflussen. So könnte der HCN1 Kanal das dominante Schrittmacherzentrum vor Störeinflüssen schützen und damit zu dessen Stabilisierung beitragen (Abb. 39). Der Sinusknoten von HCN1^{-/-}-Mäusen könnte aufgrund des fehlenden stabilisierenden Effekts des HCN1 Kanals anfälliger für Störeinflüsse sein.

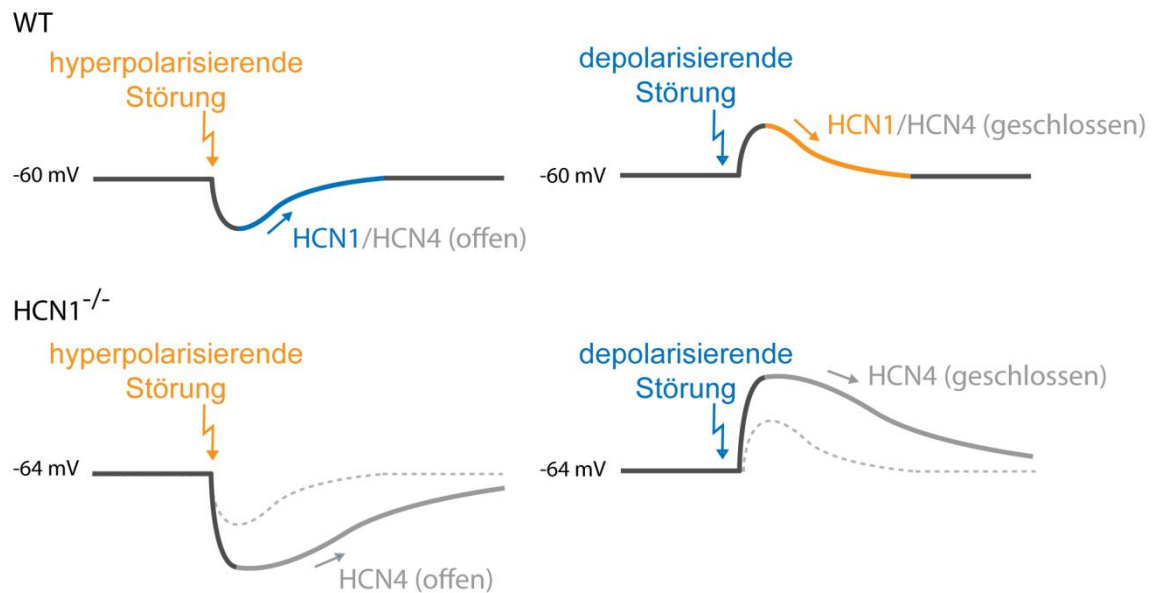


Abb. 39: HCN-Kanäle stabilisieren das Membranpotential. In Wildtyp-Zellen führt eine hyperpolarisierende Störung zur Öffnung von depolarisierenden HCN Kanälen und das Membranpotential erreicht sein ursprüngliches Potential wieder. Eine depolarisierende Störung hat die Schließung von HCN Kanälen zur Folge. So sinkt das Ruhemembranpotential wieder. Das Fehlen des HCN1 Kanals führt in HCN1^{-/-}-Zellen zu einem höheren Membranwiderstand. Dadurch hat ein hyper- oder depolarisierender Strom in HCN1^{-/-}-Zellen eine viel größere Änderung des Membranpotentials als in Wildtyp-Zellen zur Folge. Da der HCN1 Kanal fehlt, dauert es länger, bis das ursprüngliche Ruhemembranpotential wieder erreicht ist.

Unter physiologischen Bedingungen beträgt das Ruhemembranpotential in Sinusknotenzellen um die -60 mV, wohingegen es in atrialen Zellen bei circa -80 mV liegt. Das wesentlich negativere Ruhemembranpotential der atrialen Zellen hat auf die angrenzenden Sinusknotenzellen einen hyperpolarisierenden Effekt. Somit können die atrialen Zellen das Ruhemembranpotential der Sinusknotenzellen senken und dadurch die Schrittmacherfrequenz deutlich verlangsamen (Kurata et al, 2010). Es wird angenommen, dass der depolarisierende I_f diesem hyperpolarisierenden Einfluss des

Atriums entgegenwirkt (Kurata et al, 2010). Da sich neben Sinusknotenzellen auch atriale Zellen im zentralen Sinusknoten befinden (Verheijck et al, 2001), wäre eine mögliche Funktion des HCN1, den zentralen Sinusknoten an den Kontaktstellen zwischen Sinusknoten und Atrium vor dem negativen Potential zu schützen (Abb. 40).

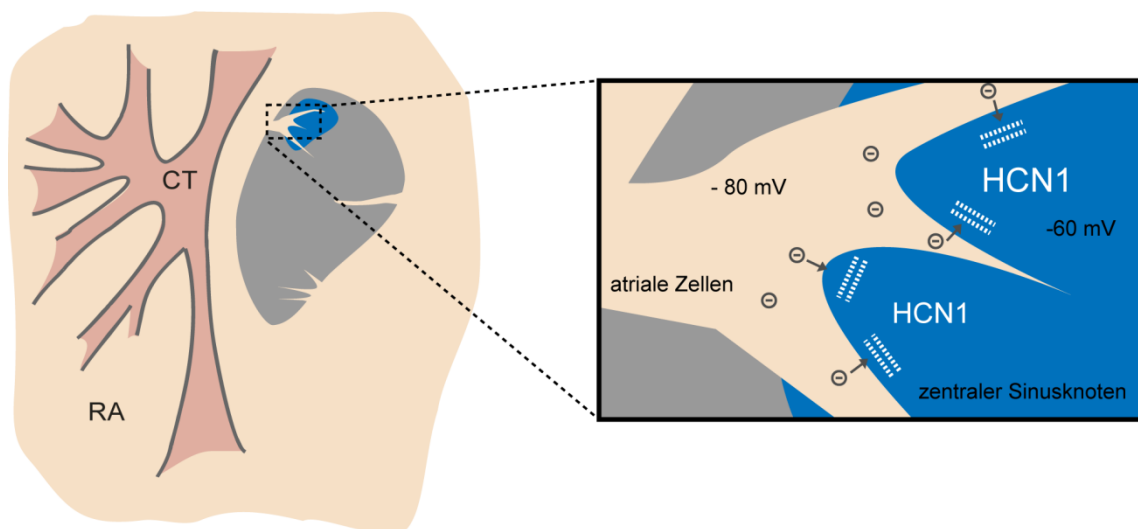


Abb. 40: Atriale Zellen (hellrosa) ziehen bis in den zentralen Teil (blau) des Sinusknotens (grau). Der HCN1 Kanal hat an den Kontaktzellen zwischen atrialen Zellen und zentralen Sinusknotenzellen die Funktion eines Schutzwalls. Der depolarisierende I_f wirkt dem hyperpolarisierenden Einfluss der atrialen Zellen entgegen.

Die Sinusknotendysfunktion ist eine relevante kardiale Erkrankung. In der Altersklasse über 65 Jahren tritt diese Funktionsstörung des Sinusknotens bei Patienten mit einem Herzleiden mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:600 auf. Etwa 50% aller Implantationen eines Herzschrittmachers weltweit sind auf eine Sinusknotendysfunktion zurückzuführen (Dobrzynski et al, 2007). Das Sinusknotensyndrom (Sick-Sinus Syndrom) beschreibt eine symptomatische Funktionsstörung des Sinusknotens. Zu den auftretenden Symptomen können eine Sinusbradykardie, Sinuspausen oder -arrest, ein sinuatrialer Block oder das Bradykardie-Tachykardie-Syndrom gehören (Adan & Crown, 2003). Bei einem Bradykardie-Tachykardie-Syndrom wechselt sich eine Bradykardie nicht selten mit Phasen einer supraventrikulären Tachykardie ab. Eine Sinusknotendysfunktion kann sowohl intrinsische als auch extrinsische Ursachen haben. So können zum Beispiel Herzinsuffizienz, atriale Hypertonie, Myokarditis oder

aber auch Pharmaka eine Sinusknotendysfunktion verursachen. Aber auch angeborene Mutationen verschiedener Ionenkanäle, wie zum Beispiel des spannungsabhängigen Natriumkanals ($\text{Na}_v1.5$) (Benson et al, 2003; Selly et al, 2012; Smits et al, 2005; Veldkamp et al, 2003) oder des HCN4 Kanals (Duhme et al, 2012; Schulze-Bahr et al, 2003; Ueda et al, 2004), können zum familiären Sick-Sinus-Syndrom führen (Adan & Crown, 2003; Dobrzynski et al, 2007). Da der HCN1 Kanal auch im humanen Sinusknoten exprimiert wird (Chandler et al, 2009; Verkerk et al, 2007a; Verkerk et al, 2007b), könnte eine Mutation im HCN1 Gen ein Grund für eine angeborene Sinusknotendysfunktion sein. Deshalb sollte der HCN1 Kanal in der Liste der Gene aufgenommen werden, die in Patienten mit einer idiopathischen Sinusknotendysfunktion auf Mutationen hin untersucht werden.

Seit Januar 2006 wird der HCN-Kanal Blocker Ivabradin zur Herzfrequenzsenkung bei der Therapie der chronischen, stabilen Angina pectoris und der Herzinsuffizienz (seit Februar 2012) eingesetzt. Bei Ivabradin handelt es sich um einen HCN-Kanal Blocker, der keine Selektivität für eine bestimmte HCN Kanal Isoform hat (Stieber et al, 2006), aber aufgrund seiner geringen ZNS-Gängigkeit die neuronalen HCN Kanäle kaum beeinflusst (Savelieva & Camm, 2008). Da gezeigt wurde, dass die Regulation der Expression des HCN1 Kanals bei der Entstehung von epileptischen Anfällen und auch bei neuropathischen Schmerzen von Bedeutung ist, liegt es nahe, Substanzen zu entwickeln, die den HCN1 Kanal spezifisch blocken (Postea & Biel, 2011). Dabei sollte allerdings bedacht werden, welche wichtige Funktion der HCN1 Kanal in der autonomen Erregungsbildung des Herzschlags spielt. Eine systemische Blockade des HCN1 Kanals könnte zu unerwünschten kardialen Nebenwirkungen führen.

6 Zusammenfassung

HCN-Kanäle bilden eine Ionenkanalfamilie, die vier Isoformen (HCN1-4) umfasst. Der von diesen Kanälen getragene Strom (I_f) wird primär durch Hyperpolarisation der Zellmembran aktiviert. Zusätzlich können zyklische Nukleotide die spannungsabhängige Aktivierungskurve in Richtung positiverer Potentiale verschieben. Dies führt bei gleichem Membranpotential zu mehr depolarisierendem Strom. Zusammen mit anderen Ionenströmen ist I_f für die spontane Depolarisation der Zellmembran von Sinusknotenzellen mitverantwortlich und trägt zur Entstehung des autonomen Herzschlags bei. Der HCN4 Kanal ist für ungefähr 80% des I_f im Sinusknoten verantwortlich. Der Reststrom wird vom HCN1 und HCN2 Kanal getragen. Der HCN3 Kanal wird zwar im Ventrikel exprimiert, spielt aber im Sinusknoten keine Rolle (Fenske et al, 2011). Bisher wurden verschiedene Mausmodelle untersucht, um die Funktion des HCN4 und des HCN2 Kanals im Sinusknoten aufzuklären. Die Funktion des HCN1 Kanals ist bislang unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der kardiale Phänotyp der HCN1-defizienten Mauslinie untersucht. HCN1 trägt zu 30% des I_f in isolierten Sinusknotenzellen bei. Die Deletion des HCN1 Kanals hat eine Abnahme der Feuerfrequenz isolierter Sinusknotenzellen, des gesamten Sinusknotens und auch isolierter Herzen zur Folge. Des Weiteren ist eine hohe Varianz der Intervalle zwischen zwei Schlägen in Sinusknotenpräparationen der HCN1^{-/-}-Mäuse auffällig. Die beobachtete Reduktion der Frequenz sowie die Dysrhythmie lassen sich in telemetrischen EKG-Messungen *in vivo* bestätigen. Die Mäuse weisen eine Bradykardie auf, die geprägt von arrhythmischen Episoden ist, welche von Sinuspausen begleitet werden. Die pharmakologische beta-adrenerge Stimulation mit Isoprenalin macht deutlich, dass die Regulation der Herzfrequenz unbeeinträchtigt von der Deletion des HCN1 Kanals bleibt. Eine Herzfrequenzvariabilitätsanalyse spricht dafür, dass die Arrhythmie durch eine Dysfunktion des Sinusknotens und nicht neuronal bedingt ist. Eine genauere Betrachtung der Funktion des Sinusknotens mittels einer intrakardialen elektrophysiologischen Untersuchung zeigt, dass sowohl die Impulsentstehung als auch die Impulsweiterleitung im

Sinusknoten von HCN1^{-/-}-Mäusen gestört ist. Die hämodynamische Konsequenz des beobachteten kardialen Phänotyps ist ein deutlich gesenktes Herzzeitvolumen. Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass der HCN1 Kanal für einen adäquaten, regelmäßigen Herzschlag von Bedeutung ist.

7 Referenzen

- Adan V, Crown LA (2003) Diagnosis and treatment of sick sinus syndrome. *American family physician* **67**: 1725-1732
- Baruscotti M, Bucchi A, Viscomi C, Mandelli G, Consalez G, Gnecci-Rusconi T, Montano N, Casali KR, Micheloni S, Barbuti A, DiFrancesco D (2011) Deep bradycardia and heart block caused by inducible cardiac-specific knockout of the pacemaker channel gene *Hcn4*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 1705-1710
- Benson DW, Wang DW, Dymont M, Knilans TK, Fish FA, Strieper MJ, Rhodes TH, George AL, Jr. (2003) Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (*SCN5A*). *The Journal of clinical investigation* **112**: 1019-1028
- Biel M, Wahl-Schott C, Michalakakis S, Zong X (2009) Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiological reviews* **89**: 847-885
- Bigger JT, Jr., Reiffel JA (1979) Sick sinus syndrome. *Annu Rev Med* **30**: 91-118
- Boyett MR, Honjo H, Kodama I (2000) The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovascular research* **47**: 658-687
- Chandler NJ, Greener ID, Tellez JO, Inada S, Musa H, Molenaar P, DiFrancesco D, Baruscotti M, Longhi R, Anderson RH, Billeter R, Sharma V, Sigg DC, Boyett MR, Dobrzynski H (2009) Molecular architecture of the human sinus node: insights into the function of the cardiac pacemaker. *Circulation* **119**: 1562-1575
- Decher N, Chen J, Sanguinetti MC (2004) Voltage-dependent gating of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated pacemaker channels: molecular coupling between the S4-S5 and C-linkers. *The Journal of biological chemistry* **279**: 13859-13865
- DiFrancesco D (1986) Characterization of single pacemaker channels in cardiac sinoatrial node cells. *Nature* **324**: 470-473
- DiFrancesco D, Tortora P (1991) Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* **351**: 145-147
- Dobrzynski H, Boyett MR, Anderson RH (2007) New insights into pacemaker activity: promoting understanding of sick sinus syndrome. *Circulation* **115**: 1921-1932
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**: 69-77
- Duhme N, Schweizer PA, Thomas D, Becker R, Schroter J, Barends TR, Schlichting I, Draguhn A, Bruehl C, Katus HA, Koenen M (2012) Altered HCN4 channel C-linker

interaction is associated with familial tachycardia-bradycardia syndrome and atrial fibrillation. *European heart journal*

Fenske S (2010) Untersuchung zur kardialen Funktion des Hyperpolarisations-aktivierten Kationenkanals HCN3. *Dissertation, LMU München*

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

Gaborit N, Le Bouter S, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S, Demolombe S (2007) Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *The Journal of physiology* **582**: 675-693

Glukhov AV, Fedorov VV, Anderson ME, Mohler PJ, Efimov IR (2010) Functional anatomy of the murine sinus node: high-resolution optical mapping of ankyrin-B heterozygous mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* **299**: H482-491

Herrmann S, Hofmann F, Stieber J, Ludwig A (2012) HCN channels in the heart: lessons from mouse mutants. *British journal of pharmacology* **166**: 501-509

Herrmann S, Layh B, Ludwig A (2011) Novel insights into the distribution of cardiac HCN channels: an expression study in the mouse heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* **51**: 997-1006

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

Kurata Y, Matsuda H, Hisatome I, Shibamoto T (2010) Roles of hyperpolarization-activated current I_f in sinoatrial node pacemaking: insights from bifurcation analysis of mathematical models. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* **298**: H1748-1760

LaBarre A, Strauss HC, Scheinman MM, Evans GT, Bashore T, Tiedeman JS, Wallace AG (1979) Electrophysiologic effects of disopyramide phosphate on sinus node function in patients with sinus node dysfunction. *Circulation* **59**: 226-235

Laish-Farkash A, Glikson M, Brass D, Marek-Yagel D, Pras E, Dascal N, Antzelevitch C, Nof E, Reznik H, Eldar M, Luria D (2010) A novel mutation in the HCN4 gene causes symptomatic sinus bradycardia in Moroccan Jews. *Journal of cardiovascular electrophysiology* **21**: 1365-1372

Lakatta EG, Maltsev VA, Vinogradova TM (2010) A coupled SYSTEM of intracellular Ca^{2+} clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. *Circulation research* **106**: 659-673

- Li N, Wehrens XH (2010) Programmed electrical stimulation in mice. *J Vis Exp*
- Lolicato M, Nardini M, Gazzarrini S, Moller S, Bertinetti D, Herberg FW, Bolognesi M, Martin H, Fasolini M, Bertrand JA, Arrigoni C, Thiel G, Moroni A (2011) Tetramerization Dynamics of C-terminal Domain Underlies Isoform-specific cAMP Gating in Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Channels. *The Journal of biological chemistry* **286**: 44811-44820
- Ludwig A, Budde T, Stieber J, Moosmang S, Wahl C, Holthoff K, Langebartels A, Wotjak C, Munsch T, Zong X, Feil S, Feil R, Lancel M, Chien KR, Konnerth A, Pape HC, Biel M, Hofmann F (2003) Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *The EMBO journal* **22**: 216-224
- Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M (1998) A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* **393**: 587-591
- Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M (1999) Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *The EMBO journal* **18**: 2323-2329
- Mandel W, Hayakawa H, Danzig R, Marcus HS (1971) Evaluation of sino-atrial node function in man by overdrive suppression. *Circulation* **44**: 59-66
- Mangoni ME, Nargeot J (2008) Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiological reviews* **88**: 919-982
- Milanesi R, Baruscotti M, Gneccchi-Ruscione T, DiFrancesco D (2006) Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. *N Engl J Med* **354**: 151-157
- Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (2001) Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem* **268**: 1646-1652
- Much B, Wahl-Schott C, Zong X, Schneider A, Baumann L, Moosmang S, Ludwig A, Biel M (2003) Role of Subunit Heteromerization and N-Linked Glycosylation in the Formation of Functional Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Channels. *The Journal of biological chemistry* **278**: 43781-43786
- Neitz A, Mergia E, Imbrosci B, Petrasch-Parwez E, Eysel UT, Koesling D, Mittmann T (2013) Postsynaptic NO/cGMP Increases NMDA Receptor Currents via Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels in the Hippocampus. *Cereb Cortex*
- Nof E, Luria D, Brass D, Marek D, Lahat H, Reznik-Wolf H, Pras E, Dascal N, Eldar M, Glikson M (2007) Point mutation in the HCN4 cardiac ion channel pore affecting synthesis, trafficking, and functional expression is associated with familial asymptomatic sinus bradycardia. *Circulation* **116**: 463-470

- Nolan MF, Malleret G, Dudman JT, Buhl DL, Santoro B, Gibbs E, Vronskaya S, Buzsaki G, Siegelbaum SA, Kandel ER, Morozov A (2004) A behavioral role for dendritic integration: HCN1 channels constrain spatial memory and plasticity at inputs to distal dendrites of CA1 pyramidal neurons. *Cell* **119**: 719-732
- Nolan MF, Malleret G, Lee KH, Gibbs E, Dudman JT, Santoro B, Yin D, Thompson RF, Siegelbaum SA, Kandel ER, Morozov A (2003) The hyperpolarization-activated HCN1 channel is important for motor learning and neuronal integration by cerebellar Purkinje cells. *Cell* **115**: 551-56
- Postea O, Biel M (2011) Exploring HCN channels as novel drug targets. *Nature reviews Drug discovery* **10**: 903-914
- Prole DL, Yellen G (2006) Reversal of HCN channel voltage dependence via bridging of the S4-S5 linker and Post-S6. *J Gen Physiol* **128**: 273-282
- Reiffel JA, Bigger JT, Jr., Konstam MA (1974) The relationship between sinoatrial conduction time and sinus cycle length during spontaneous sinus arrhythmia in adults. *Circulation* **50**: 924-934
- Sah R, Mesirca P, Van den Boogert M, Rosen J, Mably J, Mangoni ME, Clapham DE (2013) Ion channel-kinase TRPM7 is required for maintaining cardiac automaticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: E3037-3046
- Santoro B, Lee JY, Englot DJ, Gildersleeve S, Piskorowski RA, Siegelbaum SA, Winawer MR, Blumenfeld H (2010) Increased seizure severity and seizure-related death in mice lacking HCN1 channels. *Epilepsia* **51**: 1624-1627
- Savelieva I, Camm AJ (2008) If inhibition with ivabradine : electrophysiological effects and safety. *Drug safety : an international journal of medical toxicology and drug experience* **31**: 95-107
- Schulze-Bahr E, Neu A, Friederich P, Kaupp UB, Breithardt G, Pongs O, Isbrandt D (2003) Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *The Journal of clinical investigation* **111**: 1537-1545
- Selly JB, Boumahni B, Edmar A, Jamal Bey K, Randrianaivo H, Clerici G, Millat G, Caillet D (2012) [Cardiac sinus node dysfunction due to a new mutation of the SCN5A gene]. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie* **19**: 837-841
- Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT, Pan Z, Robinson RB, Dixon JE, McKinnon D, Cohen IS (1999) Distribution and Prevalence of Hyperpolarization-Activated Cation Channel (HCN) mRNA expression in Cardiac Tissues. *Circulation research* **85**: e1-6
- Smits JP, Koopmann TT, Wilders R, Veldkamp MW, Opthof T, Bhuiyan ZA, Mannens MM, Balser JR, Tan HL, Bezzina CR, Wilde AA (2005) A mutation in the human cardiac sodium channel (E161K) contributes to sick sinus syndrome, conduction disease and

-
- Brugada syndrome in two families. *Journal of molecular and cellular cardiology* **38**: 969-981
- Stieber J, Herrmann S, Feil S, Loster J, Feil R, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (2003) The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 15235-15240
- Stieber J, Wieland K, Stockl G, Ludwig A, Hofmann F (2006) Bradycardic and proarrhythmic properties of sinus node inhibitors. *Mol Pharmacol* **69**: 1328-1337
- Ueda K, Nakamura K, Hayashi T, Inagaki N, Takahashi M, Arimura T, Morita H, Higashiuesato Y, Hirano Y, Yasunami M, Takishita S, Yamashina A, Ohe T, Sunamori M, Hiraoka M, Kimura A (2004) Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia. *The Journal of biological chemistry* **279**: 27194-27198
- Veldkamp MW, Wilders R, Baartscheer A, Zegers JG, Bezzina CR, Wilde AA (2003) Contribution of sodium channel mutations to bradycardia and sinus node dysfunction in LQT3 families. *Circulation research* **92**: 976-983
- Verheijck EE, van Kempen MJ, Veereschild M, Lurvink J, Jongsma HJ, Bouman LN (2001) Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution. *Cardiovascular research* **52**: 40-50
- Verkerk AO, van Borren MM, Peters RJ, Broekhuis E, Lam KY, Coronel R, de Bakker JM, Tan HL, Wilders R (2007a) Single cells isolated from human sinoatrial node: action potentials and numerical reconstruction of pacemaker current. *Conference proceedings : Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Conference* **2007**: 904-907
- Verkerk AO, Wilders R, van Borren MM, Peters RJ, Broekhuis E, Lam K, Coronel R, de Bakker JM, Tan HL (2007b) Pacemaker current (I_f) in the human sinoatrial node. *European heart journal* **28**: 2472-2478
- Yu FH, Catterall WA (2004) The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE* **2004**: re15
- Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, Young EC, Olson R, Gouaux E (2003) Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature* **425**: 200-205

8 Anhang

8.1 Daten-Tabellen

Tab. 1: hochregulierte Transskripte im Sinusknoten von HCN1^{-/-}-Mäusen

Bezeichnung	Gen Symbol	p-Wert	Fold-change
NM_029001	Elovl7	0,000926335	2,86973
NM_001085530	Gm13298	0,0412558	1,80908
ENSMUST00000160534	Gm4477	0,00724953	1,75278
NM_010934	Npy1r	0,0364213	1,58377
NM_172807	Ppwd1	0,000204777	1,56153
NM_001146007	Trim12c	0,0182562	1,55974

Tab. 2: herunterregulierte Transskripte im Sinusknoten von HCN1^{-/-}-Mäusen

Bezeichnung	Gen Symbol	p-Wert	Fold-change
NM_001033324	Zbtb16	0,00710825	-1,5523
NM_001113550	4833420G17Rik	0,00798642	-1,57907
NM_001252057	Ly6c1	0,0245944	-1,61768
NR_037297	Mir3110	0,0380998	-1,62142
NM_153502	Ankrd23	0,0413793	-1,64579
ENSMUST00000121887	Fam107a	0,0202383	-1,6873
ENSMUST00000114792	Fkbp5	0,0449762	-1,71764
AK034234	Fut11	0,0128125	-1,72975
NM_007669	Cdkn1a	0,0138576	-1,73095
NM_172648	Ifi205	0,00468679	-1,76978
NM_007749	Cox7c	0,0126134	-1,97584
XR_108081	LOC100504898	0,0305362	-2,33442
NM_001013373	Tmprss13	0,0198162	-2,46718

Tab. 3: Echokardiographische Parameter

Parameter	WT	n (WT)	KO	n (KO)	p-Wert
IVSd [mm]	0,74 ± 0,04	12	0,81 ± 0,04	12	ns
IVSs [mm]	1,11 ± 0,06	12	1,16 ± 0,04	12	ns
LVIDd [mm]	4,26 ± 0,06	12	4,25 ± 0,13	12	ns
LVIDs [mm]	3,01 ± 0,11	12	2,97 ± 0,14	12	ns
LVPWd [mm]	0,80 ± 0,06	12	0,82 ± 0,05	12	ns
LVPWs [mm]	1,07 ± 0,09	12	1,08 ± 0,06	12	ns
LV Mass [mg]	123,64 ± 5,75	12	133,33 ± 6,41	12	ns
EF [%]	50,79 ± 2,44	12	49,49 ± 1,66	12	ns
FS [%]	17,08 ± 1,71	12	16,46 ± 1,22	12	ns
CO [ml/min]	14,54 ± 1,62	12	10,00 ± 0,76	12	*
SV [μl]	33,15 ± 2,10	12	30,70 ± 2,10	12	ns
HR [bpm]	432,15 ± 35,07	12	323,99 ± 8,39	12	***
MV A	400,22 ± 56,20	7	372,65 ± 41,33	6	ns
MV E	528,27 ± 51,43	7	538,79 ± 88,01	6	ns
MV E/A	1,40 ± 0,12	7	1,45 ± 0,18	6	ns

Mittelwert ± Standardfehler; * p < 0,05; **p < 0,01; ns: nicht signifikant

Abkürzungen:

Parameter zur Bestimmung der Abmessungen des linken Ventrikels

IVSs	Dicke des interventrikulären Septums (Systole)
LVIDd	Linksventrikulärer Innendurchmesser (Diastole)
LVIDs	Linksventrikulärer Innendurchmesser (Systole)
LVPWd	Dicke der linksventrikulären Hinterwand (Diastole)
LVPWs	Dicke der linksventrikulären Hinterwand (Systole)
LV Mass	Masse des linken Ventrikels

Parameter zur Analyse der systolischen Funktion

- EF** Ejektionsfraktion
 - FS** Fractional Shortening (Fraktionelle Verkürzung)
 - CO** Cardiac Output (Herzzeitvolumen)
 - SV** Stroke Volume (Schlagvolumen)
 - HR** Heart rate (Herzfrequenz)
-

Parameter zur Analyse der diastolischen Funktion

- HR** Herzfrequenz (stark abhängig von der Narkosesteuerung)
 - MV A** Flussgeschwindigkeit über Mitralklappe bei Ventrikelrelaxation
 - MV E** Flussgeschwindigkeit über Mitralklappe bei Vorhofkontraktion
 - MV E/A** Ein Index unter 1 steht für eine diastolische Dysfunktion des linken Ventrikels
-

Tab. 4A: Feuerfrequenz in isolierten Sinusknotenzellen

	WT	n (WT)	KO	n (KO)	Reduktion um	p
Basal	289,4 ± 12,9	19	251,3 ± 10,6	18	13,2 ± 3,7%	*
2 nM Isoprenalin	334,5 ± 15,3	18	293,7 ± 8,9	22	12,2 ± 2,7%	*
10 µM Isoprenalin	367,9 ± 20,2	11	319,8 ± 8,4	18	13,1 ± 2,3%	*

Tab. 4B: Feuerfrequenz der Sinusknotenpräparation

	WT	n (WT)	KO	n (KO)	Reduktion um	p
Basal	289,6 ± 20,0	3	205,1 ± 6,0	4	29,2 ± 2,1	**
2 nM Isoprenalin	300,6 ± 2,9	3	209,9 ± 20,0	4	30,0 ± 6,6	*
10 µM Isoprenalin	366,9 ± 15,6	3	289,0 ± 19,2	4	21,2 ± 5,2	*

Tab. 4C: Feuerfrequenz der isolierten Herzen

WT	n (WT)	KO	n (KO)	Reduktion um	p
392,9 ± 23,1	5	313,4 ± 11	6	20,2 ± 2,8	**

Tab. 4D: Variabilität der Intervalle zwischen zwei Aktionspotentialen

	WT	n (WT)	KO	n (KO)	p
Basal	5,7 ± 0,5	3	29,0 ± 7,5	3	*
2 nM Isoprenalin	1,7 ± 0,3	3	32,8 ± 3,8	3	**
10 µM Isoprenalin	1,6 ± 0,7	3	7,8 ± 1,5	3	*

Mittelwert ± Standardfehler * p < 0,05; **p < 0,01

Tab. 5: Sinusknoten-Erholungszeit in Sinusknotenpräparationen

	WT	n (WT)	KO	n (KO)	p
SZL	266,22 ± 12,4	13	333,0 ± 34,2	9	*
SNRT	369,5 ± 21,9	13	520,7 ± 43,9	9	**
cSNRT	98,0 ± 16,7	13	187,7 ± 20,8	9	**

Mittelwert ± Standardfehler; * p < 0,05; **p < 0,01

SZL	Sinuszykluslänge
SNRT	(sinoatrial recovery time) Sinusknoten-Erholungszeit
cSNRT	(corrected SNRT) korrigierte SNRT

Tab. 6A: Herzfrequenz

	WT	n (WT)	KO	n (KO)	Reduktion um	p
Basal	547,9 ± 10,0	3	459,6 ± 9,3	4	16,1 ± 1,7%	**
Isoprenalin	743,5 ± 9,7	3	604,7 ± 12,4	4	18,7 ± 1,7%	***
Carbachol	254,7 ± 35,6	3	233,3 ± 8,28	4	9,1 ± 1,4%	ns

Mittelwert ± Standardfehler; ** p < 0,01; ***p < 0,001; ns: nicht signifikant

Tab. 6B: dynamische Breite (dB) und Grad der Regulation (GdR)

	WT	n (WT)	KO	n (KO)	p
dB (max HF-min HF)	448,3 ± 22.9	3	426,0 ± 92,6	4	ns
GdR (max HF/min HF)	2,3 ± 0.1	3	2,1 ± 0,2	4	ns

Mittelwert ± Standardfehler; ns: nicht signifikant

Tab. 7: intrakardiale Parameter der Sinusknotenfunktion

Parameter [ms]	WT	n (WT)	KO	n (KO)	p-Wert
SNRT₁₁₀	172,21 ± 15,23	7	282,30 ± 24,65	9	**
SNRT₁₀₀	185,38 ± 27,50	8	286,45 ± 20,77	10	**
SNRT₉₀	183,69 ± 30,63	8	287,19 ± 26,55	8	*
SNRT₈₀	169,50 ± 12,83	7	220,08 ± 34,96	7	ns
cSNRT₁₁₀	43,45 ± 10,13	6	114,12 ± 17,65	10	*
cSNRT₁₀₀	53,23 ± 14,27	8	119,59 ± 11,78	11	**
cSNRT₉₀	50,98 ± 19,86	7	125,89 ± 14,79	10	*
cSNRT₈₀	51,14 ± 12,34	7	104,83 ± 17,08	8	ns
SACT	16,10 ± 1,90	9	28,34 ± 2,38	10	**
SNERP	48,80 ± 3,10	9	51,20 ± 2,40	10	ns

Mittelwert ± Standardfehler; * p < 0,05; **p < 0,01; ns: nicht signifikant

SNRT (sinoatrial recovery time) Sinusknoten-Erholungszeit

cSNRT (corrected SNRT) korrigierte SNRT

SACT (sinoatrial conduction time) Sinuatriale Leitungszeit

SNERP (effective sinoatrial refractory period) effektive Refraktärzeit des Sinusknoten

Tab. 8: intrakardiale Parameter der AV-Knoten Funktion

Parameter [ms]	WT	n (WT)	KO	n (KO)	p
AVNERP₁₀₀	61,00 ± 3,80	9	57,09 ± 2,40	11	ns
AVNERP₉₀	61,30 ± 3,49	9	58,36 ± 3,06	11	ns
AVERP₈₀	62,20 ± 3,78	9	62,73 ± 2,48	11	ns
WBP	73,00 ± 2,30	8	74,73 ± 1,69	11	ns
2:1 AV Block	61,50 ± 2,20	9	63,82 ± 1,25	11	ns
AVFRP	79,57 ± 2,81	8	81,5 ± 1,91	11	ns
A2V2₁₀₀	41,75 ± 1,90	8	44,55 ± 1,66	11	ns
A2V2₈₀	46,63 ± 2,73	8	51,09 ± 2,75	11	ns

Mittelwert ± Standardfehler; ns: nicht signifikant

AVNERP	(effective atrioventricular node refractory period) effektive Refraktärzeit des AV-Knotens
WBP	Wenckebachpunkt
AVFRP	(functional atrioventricular refractory period) funktionelle Refraktärzeit des AV-Knoten

Tab. 9: intrakardiale Parameter der Refraktärzeiten des Atriums und des Ventrikels

Parameter [ms]	WT	n (WT)	KO	n (KO)	p
AERP₁₀₀	25,33 ± 3,04	6	24,45 ± 2,70	11	ns
AERP₉₀	25,13 ± 2,28	8	23,20 ± 2,35	10	ns
AERP₈₀	27,14 ± 3,65	7	24,33 ± 1,53	9	ns
VERP₁₀₀	51,11 ± 2,95	9	49,64 ± 4,81	11	ns
VERP₉₀	51,56 ± 3,16	9	49,64 ± 4,23	11	ns
VERP₈₀	50,89 ± 2,31	9	49,82 ± 3,98	11	ns

AERP (effective atrial refractory period) effektive Refraktärzeit des Atriums

VERP (effective ventricular refractory period) effektive Refraktärzeit des
Ventrikels

Mittelwert ± Standardfehler; ns: nicht signifikant

8.3 Publikationen

Fenske S, **Krause S**, Biel M, Wahl-Schott C (2011) The role of HCN channels in ventricular repolarization. *Trends in cardiovascular medicine* **21**: 216-220

Zong X, **Krause S**, Chen C - C, Gruner C, Cao-Ehlker X, Fenske S, Wahl-Schott C, Biel M (2012) Regulation of HCN channel act -Monophosphate
Naunyn-Smiedebergs-Archives of Pharmacology Volume: 385 Suppl. 1. 78st Annual Meeting, German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, Dresden. Meeting Abstract: 478.

Zong X, **Krause S**, Chen CC, Kruger J, Gruner C, Cao-Ehlker X, Fenske S, Wahl-Schott C, Biel M (2012) Regulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel activity by cCMP. *The Journal of biological chemistry* **287**: 26506-26512

Fenske S, **Krause S**, Hassan S, Bernard R, Hammelmann V, Papparizos C, Biel M, Wahl-Schott A (2013) Sick sinus syndrome and chronotropic incompetence in HCN1-deficient mice *Naunyn-Smiedebergs-Archives of Pharmacology* Volume: 386 Suppl. 1. 79st Annual Meeting, German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, Halle. Meeting Abstract: 174.

Fenske S*, **Krause S***, Hassan S, Becirovic E, Auer F, Bernard R, Kupatt C, Lange P, Ziegler T, Wotjak C, Zhang H, Hammelmann V, Papparizos C, Biel M, Wahl-Schott C Sick sinus syndrome in HCN1-deficient mice. *Circulation* (revision submitted)