

Aus dem Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Der HCN4 Kanal – Genetische Variation und posttranslationale Modifikation

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Franziska Wohlfarth

2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Zweitgutachterin: PD Dr. rer. nat. Doreen Floss

Drittgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Stefan Gründer

Für Frida, Charlotte und Thorben

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Erlenhardt, N., Kletke, O., Wohlfarth, F., Komadowski, M. A., Clasen, L., Makimoto, H., Rinne, S., Kelm, M., Jungen, C., Decher, N., Meyer, C. & Klöcker, N., (2020), Disease-associated HCN4 V759I variant is not sufficient to impair cardiac pacemaking, *Pflugers Archiv*, 472, 1733-1742, <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02481-3>.

Erlenhardt, N., Wohlfarth F., Moussavi-Torshizi, S., Koch, a., Strasdeit T., Scherschel, K., Ehsan, A., Anstötz, M., Meyer, C., Klöcker, N., (2026), IGF-1 promotes cell surface expression of HCN4 pacemaker channels contributing to tachycardia, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 210:165-174, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2025.10.015>.

Auszüge dieser Arbeit wurden im Rahmen einer Posterpräsentation auf dem 95. Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2016 in Lübeck vorgestellt.

Zusammenfassung

Die Gruppe der *Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated* (HCN) Kanäle gehört zur Familie der spannungsabhängigen Kationenkanäle. In erregbaren Zellen des Herzens und des Nervensystems generieren HCN Tetramere den durch Hyperpolarisation aktivierten Schrittmacherstrom I_f/I_h . Im Herzen von Säugetieren wird hauptsächlich die Isoform HCN4 exprimiert. Dort leistet I_f einen wichtigen Beitrag zur spontanen Depolarisation kardialer Sinusknotenzellen während der Diastole und reguliert die Herzfrequenz. Als Teil eines makromolekularen Kanalkomplexes modulieren Interaktionspartner auf unterschiedliche Weise I_f *in vivo* und tragen zur Funktionsweise von HCN Kanälen bei. Darüber hinaus passen Signalwege mithilfe von Enzymen wie Proteinkinasen die Kanalaktivität an veränderte Bedingungen der Zelle an und können sowohl das *gating* als auch die Expression regulieren. In den letzten Jahren wurden Mutationen des HCN4 Gens zunehmend in Verbindung mit einer Sinusknotendysfunktion gebracht. Sowohl *loss-of-function* aber auch *gain-of-function* Mutationen beeinträchtigten in heterologen Expressionssystemen I_f und konnten mit kardialen Arrhythmien assoziiert werden.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde in einer molekulargenetischen Analyse des HCN4 Gens die monoallelische Missense-Mutation V759I bei einer Patientin mit symptomatischer Sinusknotendysfunktion und auffälliger Familienanamnese identifiziert. V759I war zuvor in Fällen von maligner Epilepsie beschrieben worden und galt somit als potenziell pathogen. In heterologen Expressionsanalysen in CHO-Zellen zeigte sich eine signifikant reduzierte Oberflächenexpression der Variante ohne signifikanten Einfluss auf die Gesamtexpression. Diese Beobachtung ließ sich in an diese Arbeit anschließenden Analysen an nativen Zellen nicht reproduzieren, sodass möglicherweise CHO-Zellspezifische Mechanismen den subzellulären Transport der Variante beeinträchtigen. Funktionelle Untersuchungen der genetischen Variation von Erlenhardt *et al.* (2020) in *Xenopus laevis* Oozyten zeigten keine Änderung des *gating*, weder in Spannungsabhängigkeit, cAMP-abhängiger Modulation noch in der Interaktion mit dem neuronalen Bindungspartner PEX5R/Trip8b. Damit übereinstimmend konnte in dieser Arbeit eine Zunahme der Oberflächenexpression des HCN4 Wild-Typs und der Variante durch PEX5R/Trip8b in CHO-Zellen beobachtet werden. In der Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit sowie von Erlenhardt *et al.* erscheint die Missense-Mutation V759I nicht hinreichend, um die Funktion des HCN4 Kanals zu beeinträchtigen und so den Phänotyp der Indexpatientin zu erklären.

Eine Phosphoproteom-Analyse an HL-1 Kardiomyozyten der Ratte hatte vier Serin-Reste im N-Terminus des HCN4 Proteins identifiziert, die in Abhängigkeit der Proteinkinase AKT phosphoryliert werden. Im Rahmen eines zweiten Projekts wurde der Einfluss einer Phosphorylierung dieser Aminosäurereste auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des HCN4 Stroms in *Xenopus laevis* Oozyten untersucht. Es konnte keine Änderung der spannungsabhängigen Kanalaktivierung und ihrer Kinetik zwischen phosphomimetischen und phosphoablative HCN4 Konstrukten detektiert werden. Eine kurzfristige Behandlung mit dem Wachstumsfaktor *Insulin-like-growth-factor-1* (IGF-1), einem bekannten Aktivator der Proteinkinase AKT, führte jedoch auf einer Zeitskala von Minuten zu mindestens einer Verdoppelung der HCN4 Stromexpression. Ein vergleichbarer Effekt blieb bei den genannten phosphomimetischen und phosphoablative Kanalkonstrukten aus. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine akute Regulation der Stromamplitude des HCN4 Kanals durch den IGF-1/AKT-Signalweg hin.

Abstract

Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels are members of the voltage-gated cation channel family. In excitable cells of the heart and the central nervous system, tetrameric HCN channels conduct the hyperpolarization-activated pacemaker current I_f/I_h . HCN4 is the main subtype in the mammalian heart. In cardiac sinoatrial cells, the voltage-dependent channel activation contributes to the spontaneous diastolic depolarization and regulates the heart rate. As part of a macromolecular channel complex, interaction partners modulate features of I_f *in vivo* and contribute to HCN channel function. Signaling pathways adapt *via* protein kinases the activity of I_f to different cellular conditions and regulate gating and expression. Lately several screening analyses revealed mutations of the HCN4 gene linked to sinus node dysfunction. Both loss-of-function and gain-of-function mutations modulate I_f in heterologous expression systems and are associated with alterations of cardiac rhythm.

In the present work, a genetic analysis of the HCN4 gene of a female patient diagnosed with symptomatic sinus node dysfunction and a positive family history identified the monoallelic missense mutation V759I. Since HCN4 V759I had been described in cases of malignant epilepsy the mutant was classified as likely pathogenic. In Chinese Hamster Ovary (CHO) cells, the genetic variant showed a reduced cell surface expression without significantly affecting total protein expression. However, surface expression levels in native cells were unaffected comparing wild-type and mutant channel indicating a CHO cell-specific impairment of channel trafficking. In addition, electrophysiological characterization of the variant by Erlenhardt *et al.* (2020) did not reveal any disturbances of channel gating, neither in voltage-dependence, cAMP-modulation nor interaction with the auxiliary subunit PEX5R/Trip8b. These findings were in line with the concomitant increase in surface expression levels of wild-type and variant cotransfected with PEX5R/Trip8b observed in this work. In summary, the results of this dissertation and from Erlenhardt *et al.* demonstrate that the missense mutation V759I seems neither sufficient to impair HCN4 channel function nor to explain the phenotype of the index patient.

A phosphoproteom analysis of HL-1 rat cardiomyocytes identified four N-terminal serine residues in HCN4, which are phosphorylated in a protein kinase AKT-dependent manner. The second part of this study examined the impact of phosphorylation of these four residues on the electrophysiological properties of HCN4 current in *Xenopus laevis* oocytes. No effects on voltage-gated channel activation and activation kinetics could be detected between phosphomimetic and constitutively dephosphorylated HCN4 constructs. However, short-term treatment with the known AKT activator insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1) at least doubled HCN4 current amplitudes within minutes. IGF-1 exerted no comparable effect on current amplitudes in the respective phosphomimetic or phosphoablative HCN4 mutants. These results indicate an acute modulation of HCN4 current amplitude by activation of the IGF-1/AKT signaling pathway.

Abkürzungsverzeichnis

SI-Einheiten und gebräuchliche Nicht-SI-Einheiten werden nicht aufgelistet.

aa	<i>aminoacid</i>
Abb.	Abbildung
ad	bis zu einem Endvolumen von
AK	Antikörper
AP	Aktionspotenzial
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AV-Knoten	Atrioventrikulärer Knoten
bp	Basenpaar
bpm	<i>beats per minute</i> , Schläge pro Minute
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , Riderserumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	<i>cyclic adenosinmonophosphat</i> , zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
cGMP	<i>cyclic guanosinmonophosphat</i> , zyklisches Guanosinmonophosphat
CHO	<i>chinese hamster ovaries</i>
CNBD	<i>cyclic nucleotid binding domain</i>
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphat gepufferte Salzlösung
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ERK	<i>extracellular-regulated kinase</i>
et al.	<i>et aliae/ et alii</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
fw	<i>forward</i>
gDNA	genomische DNA
GF	<i>growth factor</i> , Wachstumsfaktor
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GH	<i>growth hormone</i> , Wachstumshormon
GHRH	<i>growth hormone releasing hormone</i> , Wachstumshormon releasing-Hormon

HA	Hämagglutinin
HCN	<i>Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IAA	Indol-3-Essigsäure
I _{Ca}	Strom spannungsgesteuerter Calcium-Kanäle
I _f /I _h	Strom der HCN Kanäle
IGF-1	<i>Insulin-like-growth-factor-I</i>
IGF-1R	<i>Insulin-like-growth-factor-I-Rezeptor</i>
IGF-2	<i>Insulin-like-growth-factor-2</i>
<i>in vitro</i>	außerhalb eines lebendigen Organismus
<i>in vivo</i>	am lebenden Objekt (beobachtet oder durchgeführt)
IR	Insulin-Rezeptor
IR-A	Insulin-Rezeptor A
IR-B	Insulin-Rezeptor B
IRAG	<i>inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated guanylate kinase substrate</i>
kb	Kilobase
KCNE	<i>potassium voltage-gated channel subfamily E</i>
kDa	Kilodalton
LB	<i>Luria Broth</i>
LD	<i>Loading Dye</i>
LRMP	<i>lymphoid-restricted membrane protein</i>
MiRP1	<i>Mink-related peptide 1</i>
mTORC2	<i>mammalian target of rapamycin complex 2</i>
mV	Millivolt
NE	Norepinephrin
NGS	<i>normal goat serum, Ziegenserum</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaktion, Polymerase-Kettenreaktion</i>
PDK1	<i>phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
PFA	Paraformaldehyd
PH domain	<i>Pleckstrin-Homologie-Domäne</i>
PHLPP	<i>PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase</i>
PI	Phosphatase Inhibitor
PI3K	<i>phosphoinositide-3-Kinase</i>
PIP	Phosphatidylinositol
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLD2	Phospholipase D2
PP2A	Protein-Phosphatase 2A
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>

R	Rezeptor
<i>rev</i>	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SCN5A	<i>sodium voltage-gated channel alpha subunit 5</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SSS	Sick-Sinus-Syndrom
TAE	<i>Tris-Acetat-EDTA</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline with Tween® 20</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Trip8b	<i>tetratricopeptide repeat-containing Rab8b-interacting protein</i>
TRPV1	<i>transient receptor potential channel 1</i>
u.a.	unter anderem/n
$V_{1/2}$	Spannung bei halbmaximaler Kanalaktivierung
VE	vollentsalzt
<i>via</i>	über
<i>well</i>	Vertiefung einer 6/96- <i>well</i> -Zellkulturschale
WT	Wild-Typ
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	HCN Kanäle	1
1.1.1	Struktur und Eigenschaften von HCN Kanälen	1
1.1.2	Expressionsmuster der Schrittmacherkanäle.....	3
1.1.3	Zusammensetzung des HCN Kanalkomplexes und Modulation von I_f	4
1.1.4	Physiologische Rolle kardialer HCN Kanäle.....	6
1.1.5	Sinusknotendysfunktion	7
1.2	Wachstumshormon IGF-1	9
1.3	Proteinkinase AKT	10
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Materialien	13
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	13
2.1.2	Puffer und Lösungen	15
2.1.3	Kulturmedien.....	17
2.1.4	Bakterienstämme und Zelllinien	17
2.1.5	Plasmide und Konstrukte	18
2.1.6	Enzyme für die Molekularbiologie	18
2.1.7	Antikörper	19
2.1.8	Primer	19
2.1.9	Kits	21
2.1.10	Geräte	21
2.1.11	Software Programme	22
2.2	Molekularbiologische Methoden	23
2.2.1	Isolierung der genomischen DNA aus einer Vollblutprobe	23
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion	23
2.2.3	Standardprotokoll <i>Phusion</i> DNA Polymerase.....	24
2.2.4	Standardprotokoll <i>Q5 High Fidelity</i> DNA Polymerase	24
2.2.5	Einfügen von Mutationen mit der Overlap-PCR.....	25
2.2.6	Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten	27
2.2.7	Restriktionsendonuklease-Reaktion	28
2.2.8	Ligation	28
2.2.9	Einfügen von Mutationen mit dem QuikChange II XL <i>Site-Directed Mutagenesis</i> Kit.....	29
2.2.10	Bakterien und Plasmide.....	29
2.2.11	Sequenzierung von DNA	30
2.2.12	<i>In vitro</i> Transkription	31
2.2.13	RNA-Agarosegelelektrophorese	32
2.3	Zellbiologische Methoden	32
2.3.1	Kultivierung von CHO-Zellen	33
2.3.2	Transfektion von CHO-Zellen	33
2.3.3	Oberflächenexpressionsfärbung	34
2.4	Biochemische Methoden	35
2.4.1	Herstellung von Zelllysaten	35
2.4.2	Herstellung von Polyacrylamidgelen	35
2.4.3	Western Blotting	35
2.5	Elektrophysiologie	36
2.5.1	Injektion der cRNA in <i>Xenopus</i> Oozyten.....	37
2.5.2	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme	37

2.5.3	Messprotokoll zur Bestimmung der Aktivierungskurve	39
2.5.4	Messprotokolle zur Bestimmung von I_{Max} während einer Behandlung mit IGF-1	39
2.5.5	Auswertung der Aktivierungskurve und der Stromamplitude I_{Max}	40
2.5.6	Auswertung der Zeitkonstante τ_{Akt}	41
2.5.7	Statistik	42
2.6	Formelle Voraussetzungen	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Identifizierung und zellbiologische Charakterisierung der Variante HCN4 V759I	43
3.1.1	Fallvorstellung einer Patientin mit symptomatischer Sinusbradykardie	43
3.1.2	Identifizierung der Missense-Mutation V759I im HCN4 Protein	44
3.1.3	Einfluss von V759I auf die Expression des HCN4 Kanals in CHO-Zellen	46
3.1.4	Interaktion des Bindungspartners PEX5R/Trip8b mit dem HCN4 Kanal	49
3.2	Einfluss des IGF-1/AKT-Signalweges auf elektrophysiologische Eigenschaften des HCN4 Stroms	51
3.2.1	Einfügen von Punktmutationen in HCN4-pGem-He zur Imitation einer AKT-abhängigen Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung des Kanals	51
3.2.2	Eine AKT-vermittelte Phosphorylierung beeinflusst die spannungsabhängige Aktivierung des HCN4 Stroms in <i>Xenopus</i> Oozyten nicht	54
3.2.3	Die maximale Stromamplitude des HCN4 Kanals nimmt durch IGF-1 zu	58
3.2.4	Die maximale Stromamplitude der phosphoablative und phosphomimetischen HCN4 Konstrukte ist gegenüber IGF-1 Applikation unempfindlicher	61
3.2.5	In <i>Xenopus</i> Oozyten ändert IGF-1 die spannungsabhängige Aktivierung des HCN4 Wild-Typs nicht	63
4	Diskussion	64
4.1	Identifizierung und zellbiologische Charakterisierung der Variante HCN4 V759I	64
4.2	Einfluss des IGF-1/AKT-Signalweges auf elektrophysiologische Eigenschaften des HCN4 Stroms	70
4.2.1	Keine Änderung der spannungsabhängigen Kanalaktivierung zwischen AKT-abhängig phosphomimetischen und phosphoablative HCN4 Konstrukten	70
4.2.2	Eine akute Applikation von IGF-1 erhöht I_{Max} des HCN4 im heterologen Expressionssystem der <i>Xenopus</i> Oozyte	72
4.2.3	IGF-1-vermittelte Steigerung der Stromexpression	73
4.2.4	Beteiligung eines AKT-abhängigen Signalwegs an der IGF-1-vermittelten Regulation von I_{HCN}	76
4.2.5	Ausblick und pathophysiologische Bedeutung	78
4.3	Schlussfolgerungen	80
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	81
6	Anhang	89

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Membrantopologie einer HCN Kanaluntereinheit.	3
Abb. 2: Schematische Darstellung einiger Interaktionspartner und der β -Untereinheit PEX5R/Trip8b des HCN Kanals.	5
Abb. 3: Schematische Darstellung des sinuatrialen Schrittmacherpotenzials.	7
Abb. 4: Identifizierte Mutationen des HCN4 Kanals und des putativen Interaktionspartners MiRP1.	8
Abb. 5: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von IGF-1 am Herzen.	10
Abb. 6: Aktivierung der Serin-/Threoninkinase AKT.	11
Abb. 7: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte einer Overlap-PCR.	27
Abb. 8: Schematische Darstellung des Messstandes der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme.	38
Abb. 9: Angewandtes Spannungsprotokoll zur Auswertung der Aktivierungskurve des HCN4 Kanals.	39
Abb. 10: Spannungsprotokoll zur Charakterisierung der Stromamplitude bei maximaler Kanalaktivierung während einer Inkubation mit IGF-1.	40
Abb. 11: Spannungsprotokoll zur Bestimmung der Stromamplitude bei maximaler Kanalaktivierung.	40
Abb. 12: EKG-Aufzeichnungen der 49-jährigen Patientin mit rezidivierenden Schwindelattacken.	44
Abb. 13: Die identifizierte Mutation in Exon 8 des HCN4 Gens führt zu einem Aminosäureaustausch von Valin nach Isoleucin an Position 759.	45
Abb. 14: V759I wird in CHO-Zellen vermindert an der Zelloberfläche exprimiert.	47
Abb. 15: Gesamtexpression des Wild Typs und der Variante V759I in CHO-Zellen.	48
Abb. 16: Zunahme der Oberflächenexpression von WT und V759I durch die Koexpression von PEX5R/Trip8b.	50
Abb. 17: AKT-vermittelte Phosphorylierung von vier Serinresten im N-Terminus des HCN4.	51
Abb. 18: Klonierung der Punktmutationen S14A, S14D, S99-102A und S139A in HCN4-pGem-He.	52
Abb. 19: Klonierung der Punktmutationen S99-102D und S139D in HCN4-pGem-He.	53
Abb. 20: Zwischen den phosphoablatischen und phosphomimetischen HCN4 Konstrukten besteht kein Unterschied in der Spannungsabhängigkeit während der Kanalaktivierung.	55
Abb. 21: Aktivierungskinetiken der phosphomimetischen und phosphoablatischen HCN4 Kanalkonstrukte.	56
Abb. 22: Die Imitation einer AKT-abhängigen Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung der vier Serin-Reste zeigt keine Auswirkung auf die spannungsabhängige Kanalaktivierung.	57
Abb. 23: I_{Max} des HCN4 WT, nicht aber des AKT-vermittelt phosphomimetischen Konstrukts, nimmt unmittelbar während einer Behandlung mit IGF-1 deutlich zu.	59
Abb. 24: I_{Max} des phosphoablatischen und -mimetischen Konstrukts steigt durch IGF-1 nur gering an.	62
Abb. 25: Eine IGF-1 Behandlung führt nicht zu einer Änderung der spannungsabhängigen Aktivierung des HCN4 Wild-Typs in Xenopus Oozyten.	63
Abb. 26: In Kardiomyozyten beeinträchtigt V759I die Oberflächenexpression nicht.	68
Abb. 27: V759I beeinflusst die spannungsabhängige Aktivierung, die Aktivierungskinetik sowie die cAMP-Abhängigkeit des HCN4 Kanals nicht.	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.....	13
Tabelle 2: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungsansätze.....	15
Tabelle 3: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien.....	17
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Bakterienstämme und Zelllinien	17
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Plasmide	18
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Konstrukte	18
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Enzyme.....	18
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper.....	19
Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Primer für das Einfügen von Mutationen in HCN4 Plasmide.....	19
Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Primer zur Amplifizierung und Sequenzierung des HCN4 Gens	19
Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Primer zur Sequenzierung der generierten HCN4 Konstrukte.....	20
Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Kits	21
Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Geräte für molekularbiologische Analysen.....	21
Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Zentrifugen.....	21
Tabelle 15: Auflistung der verwendeten Geräte für die Zellkultur.....	22
Tabelle 16: Auflistung der verwendeten Geräte in der Elektrophysiologie	22
Tabelle 17: Auflistung der verwendeten Softwareprogramme.....	22
Tabelle 18: Ansatz für eine Standard-PCR mit der <i>Phusion</i> DNA Polymerase	24
Tabelle 19: Temperaturzyklusprotokoll <i>Phusion</i> DNA-Polymerase	24
Tabelle 20: Standardisierter Ansatz für eine PCR mit der Q5 <i>High Fidelity</i> DNA Polymerase	25
Tabelle 21: Temperaturzyklusprotokoll Q5 DNA-Polymerase	25
Tabelle 22: Standardisierter Ansatz einer Overlap-PCR	26
Tabelle 23: Temperaturzyklusprotokoll Overlap-PCR.....	26
Tabelle 24: Temperaturzyklusprotokoll PCR nach Overlap-PCR.....	26
Tabelle 25: Standardisierter Ansatz einer Restriktionsendonukleasereaktion.....	28
Tabelle 26: Standardisierter Ansatz einer Ligation	29
Tabelle 27: Standardansatz einer Linearisierung.....	31
Tabelle 28: Standardisierter Ansatz einer <i>in vitro</i> Transkription.....	32
Tabelle 29: Standardprotokoll der verwendeten Ansätze für die Transfektion von CHO-Zellen auf einer 6-well-Platte/3,5 cm-Ø Deckglas	33

1 Einleitung

1.1 HCN Kanäle

Die Gruppe der *Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated* (HCN) Kanäle gehört zur Familie der spannungsabhängigen Kationenkanäle. In erregbaren Zellen des Herzens und des Nervensystems generieren sie den durch Hyperpolarisation aktivierten Schrittmacherstrom I_f . Erstmals wurde I_f im Jahre 1979 von Brown *et al.* erwähnt. Sie beschrieben einen Strom in sinuatrialen Zellen, der bei Hyperpolarisation der Zellmembran zu beobachten war, und bezeichneten ihn aufgrund seiner unerwarteten Spannungsabhängigkeit als „funny“¹. Alternativ wird der Strom „ I_h “ genannt, wobei der Buchstabe „h“ für *hyperpolarization-activated* steht und vor allem den Strom neuronal vorkommender HCN Kanäle adressiert. In Säugetieren konnten insgesamt vier Isoformen des HCN Kanals (HCN1-HCN4) identifiziert werden²⁻⁵.

In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf der Isoform HCN4. Diese wird außerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) hauptsächlich im Sinusknoten des Herzens exprimiert und spielt dort eine wichtige Rolle bei der Entstehung der elektrischen Herzaktion.

1.1.1 Struktur und Eigenschaften von HCN Kanälen

Ein funktioneller HCN Kanalkomplex wird aus insgesamt vier HCN Untereinheiten mit zentral gelegener Pore gebildet und kann sich sowohl aus homotetrameren als auch aus heterotetrameren Untereinheiten zusammensetzen. Eine Kanaluntereinheit besteht aus sechs hoch konservierten, α -helikalen Transmembrandomänen (Segment S1-S6) und einer C-Terminal lokalisierten Bindestelle für zyklische Nukleotide (CNBD, *cyclic nucleotide binding domain*), (Abb. 1)^{6,7}. Die porenbildende Region befindet sich zwischen den Transmembransegmenten S5 und S6. Sie beinhaltet mit der Aminosäuresequenz Glycin-Tyrosin-Glycin (GYG) einen für Kaliumkanäle typischen Selektivitätsfilter⁸. Da HCN Kanäle sowohl permeabel für Kalium- als auch Natrium-Ionen sind, scheint das GYG-Motiv nicht ausreichend für eine hohe K^+ -Selektivität zu sein⁹. Denn obwohl eine etwa vierfach höhere Leitfähigkeit zugunsten von K^+ besteht, ist die K^+ -Selektivität der HCN Kanäle gegenüber der Na^+ -Selektivität eher gering¹⁰. Unter physiologischen Bedingungen fließt durch den geöffneten Kanal aufgrund der unterschiedlichen Triebspannungen ein *netto* Einwärtsstrom von Na^+ in die Zelle¹⁰. Dieser hat eine Depolarisierung der Zellmembran zur Folge.

Im teils positiv geladenen Segment S4 der jeweiligen Kanaluntereinheiten befindet sich der Spannungssensor¹¹. Eine einwärtsgerichtete Bewegung dieses Sensors während der Hyperpolarisation der Zellmembran führt zur Öffnung der Porenregion¹².

HCN Kanäle öffnen bei hyperpolarisierenden Spannungen¹³. Mit stärkerer Membranhypolarisation nimmt die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle exponentiell zu und erreicht bei maximaler Aktivierung einen *steady-state* Zustand, der bei anhaltender Hyperpolarisation nicht inaktiviert. Als charakterisierender Parameter der spannungsabhängigen Aktivierung dient meist die Spannung der halbmaximalen Kanalaktivierung $V_{1/2}$. Bei dieser

Spannung sind die Hälfte der HCN Kanäle geöffnet. Sie kann der Aktivierungskurve entnommen werden und variiert zwischen den einzelnen Isoformen sowie zwischen verschiedenen Expressionssystemen oder Messkonfigurationen. Die Aktivierung des Ionenkanals erfolgt vergleichsweise langsam. Die Geschwindigkeit, mit der HCN Kanäle aktiviert werden, wird durch die Aktivierungszeitkonstante (τ_{Akt}) beschrieben und hängt maßgeblich von der vorherrschenden Membranspannung ab. Bei zunehmend hyperpolarisierender Spannung werden HCN Kanäle schneller und vermehrt aktiviert.

In heterologen Expressionssystemen liegt τ_{Akt} der Isoform HCN4 zwischen wenigen hundert Millisekunden und mehreren Sekunden¹⁴. HCN4 ist die Isoform, die am langsamsten aktiviert, gefolgt von HCN3 und HCN2^{15, 16}. HCN1 zeigt die schnellste Kanalaktivierung^{4, 17}. Somit unterscheiden sich die jeweiligen HCN Isoformen in ihrer Aktivierungskinetik (τ_{Akt}) und der Spannung bei halbmaximaler Kanalöffnung ($V_{1/2}$). Diese biophysikalischen Parameter des Schaltverhaltens (*gating*), insbesondere die Öffnungsgeschwindigkeit, hängen auch von weiteren Faktoren wie Temperatur und pH-Wert ab⁹. Ein unmittelbarer Vergleich der Werte von $V_{1/2}$ und τ_{Akt} aus verschiedenen Publikationen ist daher nicht immer möglich.

Jenseits der Transmembrandomänen besitzt jede HCN Kanaluntereinheit einen intrazellulär gelegenen C- und N-Terminus. Beide unterscheiden sich innerhalb der vier Isoformen in Länge und Aminosäuresequenz. Der proximale C-Terminus beinhaltet die CNBD, eine ~120 Aminosäuren (AS) umfassende Region, die über den C-Linker mit dem Transmembransegment S6 verbunden ist¹⁸. CNBD und C-Linker sind innerhalb der HCN Familie konserviert. Die Bindung zyklischer Nukleotide (cAMP, *cyclic adenosinmonophosphat* und cGMP, *cyclic guanosinmonophosphat*) an die CNBD führt zu einer Verschiebung der Aktivierungskurve hin zu positiveren Membranspannungen und zu einer Beschleunigung der Kanalöffnung¹⁹. cAMP bewirkt dabei eine Konformationsänderung des HCN Kanals, wodurch die autoinhibitorische Wirkung der CNBD aufgehoben wird und der Kanal rascher und bei positiverer Membranspannung öffnet^{7, 18, 20, 21}. Insbesondere die Isoformen HCN2 und HCN4 sind sensibel für diese Modulation, die das autonome Nervensystem nutzt, um durch Aktivierung der Adenylatzyklase *via* G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die intrazelluläre Konzentration des *second messengers* cAMP zu steigern und I_f zu beeinflussen⁷.

Ein weiterer grundlegender Mechanismus, der das *gating* von HCN Kanälen reguliert, erfolgt über membrangebundene Phosphoinositide. Phosphatidylinositolphosphat (PIP), Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) und Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP₃) fungieren unabhängig von cAMP als allosterische Aktivatoren und führen zu einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit in Richtung positivere Potenziale^{22, 23}.

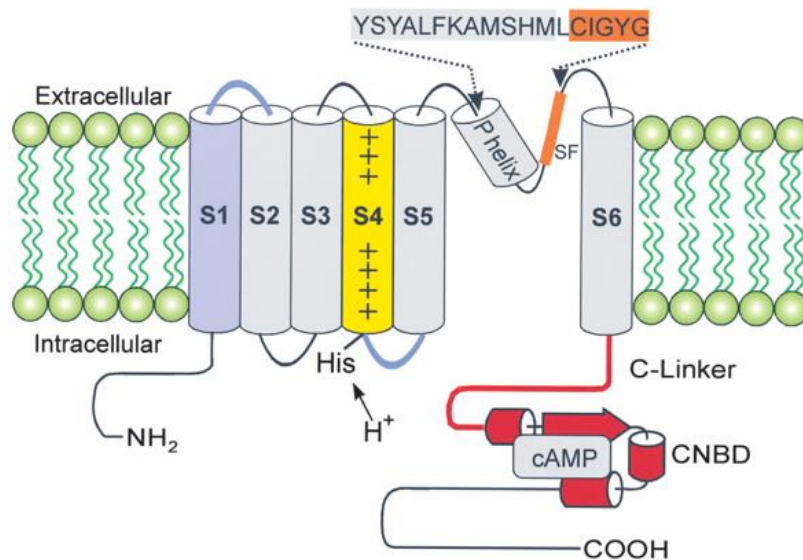


Abb. 1: Membrantopologie einer HCN Kanaluntereinheit.

Eine HCN Kanaluntereinheit besteht aus 6 Transmembransegmenten (S1-S6) sowie dem N- und C-Terminus. Zwischen S5 und S6 befindet sich die Kanalpore, die einen Kaliumkanal-typischen Selektivitätsfilter beinhaltet. Der Spannungssensor ist im vierten Segment S4 lokalisiert. S1, der extrazelluläre S1-S2 Linker und der intrazelluläre S4-S5 Linker spielen ebenfalls eine Rolle im Schaltverhalten des HCN Kanals. N- und C-Terminus befinden sich intrazellulär. Die Bindestelle für zyklische Nukleotide (CNBD) im proximalen C-Terminus wird über den C-Linker mit S6 verbunden. Diese Region vermittelt die charakteristische Modulation der Kanalaktivität durch zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Vier der abgebildeten Untereinheit bilden einen funktionellen, tetrameren Kanalkomplex um eine zentral gelegene Pore; Abb. mit freundlicher Genehmigung des Verlages unverändert übernommen aus Biel *et al.*⁹

1.1.2 Expressionsmuster der Schrittmacherkanäle

Alle vier HCN Isoformen (HCN1-4) können im adulten Herz nachgewiesen werden. Unter physiologischen Bedingungen hängt das Ausmaß der Expression von der jeweiligen Untereinheit, der Region des Herzens sowie der analysierten Spezies ab²⁴. Im Sinusknoten mehrerer Säugetiere ist HCN4 die häufigste Isoform^{25, 26}. Dies gilt ebenso für den AV-Knoten und die Purkinje-Fasern, die jeweils wichtige Strukturen der kardialen Erregungsleitung darstellen^{27, 28}. Dennoch tragen auch HCN1 und HCN2 zu der Generierung von I_f in Sinusknotenzellen bei²⁸. In atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten sind hauptsächlich HCN2 und HCN4 vorzufinden^{26, 29, 30}. Wird das Niveau der Transkription und Proteinexpression verglichen, so ist jedoch die Gesamtmenge an HCN Kanälen in Zellen des Erregungsleitungssystems um ein Vielfaches höher als im arbeitenden Myokard^{27, 31}.

Neben dem gehäuften Vorkommen im Herzen werden HCN Kanäle vornehmlich im ZNS exprimiert. HCN2 kommt hier nahezu ubiquitär vor³². Die weiteren HCN Isoformen zeigen auch im ZNS ein zellspezifisches Verteilungsmuster. Wichtige Regionen der HCN1 Expression stellen der Neocortex, die Kleinhirnrinde, der Hippocampus, der Hirnstamm sowie das Rückenmark dar³³. HCN4 wird hauptsächlich im *Bulbus olfactorius*, im Thalamus und in der *Substantia nigra* exprimiert^{2, 34}. Auch im peripheren Nervensystem, insbesondere in Spinalganglien, kann ein Vorkommen aller vier Isoformen beobachtet werden¹³. In weitaus geringerem Maße als im Herzen und ZNS werden HCN

Kanäle im enterischen Nervensystem, in β -Zellen des Pankreas, in glatten Muskelzellen und in den Testes exprimiert¹³.

Die unterschiedlichen biophysikalischen Eigenschaften von I_f in verschiedenen nativen Zellsystemen können teilweise mit dem Expressionsmuster der Isoformen erklärt werden. Beispielsweise zeigt I_f der Sinusknotenzellen, in denen der langsam aktivierende HCN4 Kanal überwiegt, ebenfalls eine langsame Aktivierung^{14, 15}. Andererseits fallen Zellen mit vornehmlicher Expression rasch aktivierender HCN1 Kanäle, wie CA1 Neurone des murinen Hippocampus, durch eine schnelle Aktivierungskinetik von I_f bzw. I_h auf¹⁷.

1.1.3 Zusammensetzung des HCN Kanalkomplexes und Modulation von I_f

HCN Isoformen, außer HCN2 mit HCN3, bilden gemeinsam funktionelle Heterotetramere, die aus verschiedenen HCN Kanaluntereinheiten zusammengesetzt sind³⁵. In Neuronen und embryonalen Kardiomyozyten der Maus interagieren und koassemblieren HCN2 und HCN4³⁶. Zudem weist das Heterotetramer HCN2/HCN4, unabhängig der Mengenverhältnisse zwischen den beiden Isoformen, ein verändertes *gating* im Vergleich zum Strom des homotetrameren HCN4 auf³⁷.

Die Formation heterotetramerer Kanaleinheiten *in vivo* reicht als alleinige Erklärung für die Diskrepanz der biophysikalischen Eigenschaften zwischen rekombinant gemessenen HCN Strömen in heterologen Expressionssystemen und dem nativen I_f nicht aus. Der gemessene Strom koassemblierter Kanaluntereinheiten kommt dem nativen I_f zwar näher, bildet diesen jedoch nicht genau ab³⁸.

Eine weitere maßgebliche Regulation von I_f *in vivo* erfolgt durch Interaktionspartner und Transportproteine, die mit dem Kanaltetramer einen Komplex bilden, I_f modulieren und über Zellsignalwege in ihrer Funktion beeinflusst werden können³⁹.

Ein Beispiel dafür stellt *Mink-related peptide 1* (MiRP1) dar. MiRP1 wird durch das KCNE2 Gen (*potassium voltage-gated channel subfamily E member 2*) kodiert und gehört zur Gruppe der KCNE-Proteine, die als Bindungspartner für viele Kationenkanäle agieren⁴⁰. Über eine Interaktion mit dem distalen C-Terminus kardialer HCN Kanäle beeinflusst MiRP1 das spannungsgesteuerte Schaltverhalten, die Stromdichte sowie die Oberflächenexpression der Isoformen HCN1, HCN2 und HCN4⁴¹⁻⁴³.

Ein weiterer Interaktionspartner des kardialen Ionenkanals ist Caveolin. HCN4 Kanäle sind bevorzugt in sackförmigen Einstülpungen der Zellmembran, sogenannten *Caveolae*, lokalisiert⁴⁴. Diese sind vor allem in Sinusknotenzellen zu finden und bilden eine spezialisierte Mikrodomäne der Zelloberfläche, die Ionenkanäle in direkte Nähe zu regulatorischen Proteinen, Transportern und Signalwegen bringt^{39, 45}. Über eine N-Terminale *caveolin-binding-domain* interagiert HCN4 mit den Gerüstproteinen der *Caveolae*, Caveolin-1 (Cav-1) und Caveolin-3 (Cav-3)⁴⁶. Eine Störung dieser Bindung modifiziert das *gating* des HCN4 Stroms⁴⁶. Da der Ionenkanal zudem durch eine solche intrazellulär im Golgi Apparat akkumuliert und seine Expression an der Zelloberfläche reduziert wird, spielen Caveoline möglicherweise in der Translokation oder Retention von HCN4 Kanalproteinen an der Zelloberfläche eine Rolle⁴⁶.

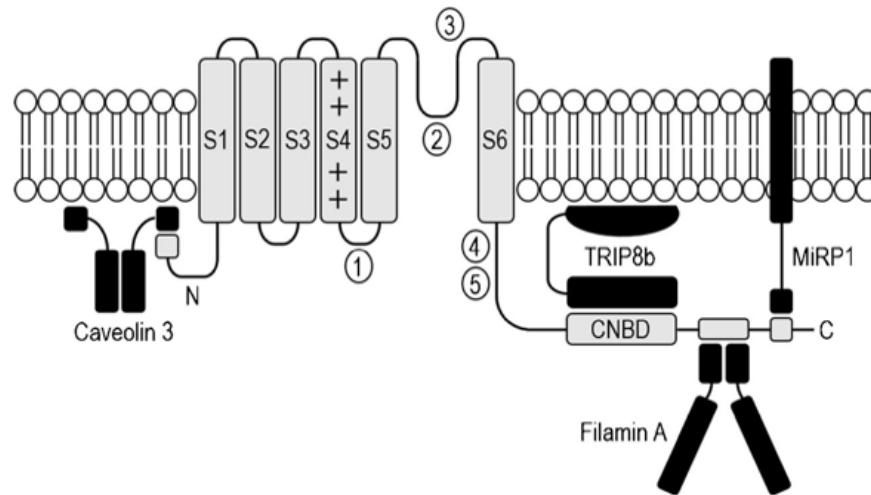


Abb. 2: Schematische Darstellung einiger Interaktionspartner und der β -Untereinheit PEX5R/Trip8b des HCN Kanals.

Abgebildet werden einige der bisher identifizierten Interaktionspartner des HCN Kanals. Diese stellen einen wichtigen Teil des makromolekularen Kanalkomplexes dar. Die neuronale Hilfsuntereinheit PEX5R/Trip8b (*Peroxin-5-related protein/tetratricopeptide repeat-containing Rab8b-interacting protein*) interagiert neben Filamin A und der kardialen β -Untereinheit MiRP1 (*Mink-related peptide 1*) mit dem C-Terminus des HCN. Nicht abgebildet ist die zweite Interaktionsstelle von PEX5R/Trip8b distal der CNBD (*cyclic nucleotide binding domain*). Der N-Terminus von HCN Kanälen kann mit Caveolin-3 (Cav-3) interagieren. Cav-3 ist eine Leitstruktur von *Caveolae*, spezialisierte Membranbereiche, die vermehrt in Sinusknotenzellen vorkommen; Abb. mit freundlicher Genehmigung des Verlages unverändert übernommen aus Rivolta *et al.*⁴⁷

Neben MiRP1 und Caveolin wurden weitere Interaktionspartner von HCN Kanälen beschrieben (Abb. 2)³³. Insbesondere der neuronale Interaktionspartner Trip8b (*tetratricopeptide repeat-containing Rab8b-interacting protein*) bzw. PEX5R (*Peroxin-5-related protein*) (PEX5R/Trip8b) wurde im Rahmen vieler Studien untersucht und gilt als β -Untereinheit des Kanals im ZNS. Durch Bindung u.a. an den distalen C-Terminus und die CNBD des HCN Kanals antagonisiert PEX5R/Trip8b die Wirkung von cAMP und ändert entsprechend die Spannungsabhängigkeit und Öffnungsgeschwindigkeit⁴⁸⁻⁵⁰. Zudem reguliert PEX5R/Trip8b Isoform-abhängig die Oberflächenexpression des Ionenkanals⁵¹. Die Frage, ob ein Einfluss von PEX5R/Trip8b auf I_f auf das ZNS begrenzt ist oder auch die Funktion des Herzens moduliert, ist Gegenstand aktueller Forschung⁵².

Signaltransduktionsprozesse der Zelle stellen einen weiteren Mechanismus dar, der die Funktionalität von I_f moduliert. Mithilfe von Enzymen wie Proteinkinasen oder Phosphatasen beeinflussen Neurotransmitter und Hormone über ihre Signalwege den Phosphorylierungsstatus von Ionenkanälen oder ihrer Bindungspartner und passen darüber deren Aktivität an veränderte Bedingungen der Zelle an⁵³. Eine Phosphorylierung der HCN Kanäle wird dabei meist in Verbindung mit Änderungen des *gating* gebracht. Beispielsweise vermittelt die Tyrosinkinase Src die Phosphorylierung zweier Aminosäurereste im C-Terminus der HCN Kanäle. Eine solche führt zu einer beschleunigten Aktivierung von HCN2 und HCN4 und zu einer bisher kontrovers diskutierten Verschiebung von $V_{1/2}$ des HCN4⁵⁴. Darüber hinaus wurden mehrere Aminosäurereste des HCN4 im Sinusknoten der Maus beschrieben, die putative Zielstrukturen der Proteinkinase A (PKA)

darstellen⁵⁵. Eine Aktivierung der PKA führt zu einer Aktivierung des HCN4 Stroms bei positiveren Spannungen⁵⁵. Somit regulieren Interaktionspartner und Signalwege auf unterschiedliche Weise I_f .

Ionenkanäle, wie auch HCN Kanäle, bilden mit assoziierten Bindungspartnern, Transportern und Rezeptoren funktionelle Mikrodomänen, die als Teil eines komplexen makromolekularen Signalnetzwerks mit weiteren Proteinen interagieren und über zahlreiche Signalwege reguliert werden können³⁹. Die Identifizierung und Untersuchung weiterer Komponenten und Modulatoren des HCN Kanalkomplexes wird das Verständnis der Funktionsweise von I_f verbessern.

1.1.4 Physiologische Rolle kardialer HCN Kanäle

Der Sinusknoten befindet sich im rechten Vorhof, im Bereich des *Sulcus terminalis* und der Mündung der *Vena cava superior*. Er stellt den Ursprungsort der rhythmischen Herzaktion dar. Seine Aktivität beruht auf einer spontanen Membrandepolarisation der Sinusknotenzellen während der Diastole. Dafür werden verschiedene Ionenkanäle aktiviert bzw. geschlossen, die die Zellmembran in Richtung des Schwellenpotenzials depolarisieren⁹. Erst dann kann ein erneutes Aktionspotenzial ausgelöst werden. Der Schrittmacherstrom I_f , generiert durch HCN Kanalkomplexe, liefert hierbei einen wichtigen Beitrag.

Die spannungsabhängige Aktivierung der HCN Kanäle während hyperpolarisierender Spannungen führt durch den *netto* einwärtsgerichteten Strom positiver Ladung zu einer langsamen Depolarisation der Sinusknotenzellen^{9, 56}. Dadurch werden spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle aktiviert, deren Strom (I_{Ca}) durch eine rasche Depolarisation ein Aktionspotenzial auslöst (Abb. 3). Die im Sinusknoten generierte elektrische Erregung wird über das Erregungsleitungssystem auf den AV-Knoten und anschließend über das His-Bündel, die Tawara-Schenkel und die Purkinje-Fasern auf das arbeitende Herzgewebe übertragen. Eine koordinierte Kontraktion wird ausgelöst. Daher beeinflusst die zeitliche Dauer der langsamen diastolischen Depolarisation maßgeblich die Herzfrequenz. Über β -adrenerge Rezeptoren (β_1 - und β_2 -Rezeptoren) erhöhen sympathische Neurotransmitter die Konzentration des zytosolischen *second messenger* cAMP, wodurch HCN Kanäle bei positiveren Spannungen schneller aktivieren. So verkürzt sich die Phase der langsamen Depolarisation der Sinusknotenzellen (Abb. 3). Die rhythmische Frequenz der elektrischen Aktivität nimmt zu und die Herzfrequenz steigt an. Der parasympathische Botenstoff Acetylcholin verlangsamt im Gegensatz dazu die Herzfrequenz durch Suppression des cAMP-Levels über muskarinerge M2-Rezeptoren. Diese cAMP-abhängige Modulation der HCN Kanäle ermöglicht eine Einflussnahme auf die Herzfrequenz.

In Sinusknotenzellen des Hasen sind β_2 -Adrenorezeptoren und HCN4 Kanäle kolokalisiert und womöglich Teil eines makromolekularen Kanalkomplexes⁵⁷. Die räumliche Kopplung dieser beiden Rezeptoren ermöglicht ein enges Zusammenspiel der Regulationswege zur Steigerung der Chronotropie³⁹. Da cAMP ein allosterischer Aktivator der PKA ist, wird I_f vermutlich direkt *via* cAMP als auch über eine cAMP-abhängige PKA-Phosphorylierung reguliert^{55, 58}. Neben cAMP scheinen PKA und insbesondere die vorhandene Mikrodomäne, welche die lokale Verteilung von cAMP beeinflusst, einen Einfluss auf die β -adrenerge Stimulation von I_f zu haben³⁹.

Im Hinblick auf die Modulation der kardialen Schrittmacherfunktion und deren Einfluss auf die Herzfrequenz sind weitere Mechanismen, die I_f regulieren, von hohem Interesse der aktuellen Forschung⁵⁹.

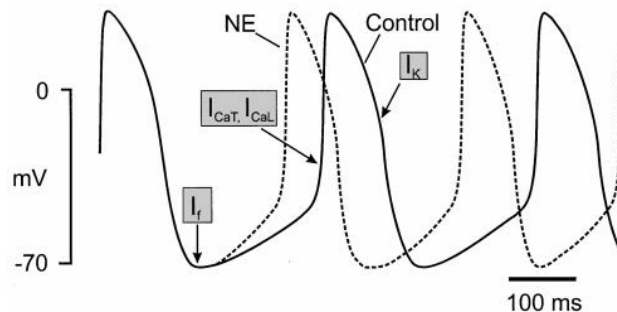


Abb. 3: Schematische Darstellung des sinuatrialen Schrittmacherpotenzials.

Während der Diastole depolarisiert I_f die Schrittmacherzellen des Sinusknotens. Dadurch werden T-Typ und L-Typ Calcium-Kanäle aktiviert und die Zellmembran durch I_{CaT} und I_{CaL} rasch depolarisiert (*Control*). Eine β -adrenerge Stimulation mit Norepinephrin (NE, Noradrenalin) beschleunigt die Depolarisation der Membran, die Steigung der diastolischen Depolarisation nimmt zu und die Dauer der Diastole wird verkürzt. Die rhythmische Frequenz der elektrischen Aktion der Sinusknotenzellen steigt an; mV: Millivolt, ms: Millisekunden; Abb. mit freundlicher Genehmigung des Verlages unverändert übernommen aus Biel *et al.*⁹

Die Funktion der HCN Kanäle in ventrikulären Kardiomyozyten konnte bisher nicht ausreichend geklärt werden. Da die Zellen des arbeitenden Myokards in der Regel keine spontane Aktivität zeigen, scheinen HCN Kanäle in dieser Region eine andere Funktion als im Sinusknoten einzunehmen⁶⁰. Der depolarisierende Strom I_f könnte aufgrund der sehr langsamen Deaktivierung der HCN Kanäle während der späten Phase der Repolarisation die Dauer des Aktionspotenzials im arbeitenden Myokard verlängern⁶¹.

1.1.5 Sinusknotendysfunktion

Die Sinusknotendysfunktion (Sick-Sinus-Syndrom, SSS) umfasst eine Gruppe von Herzrhythmusstörungen, die auf einer Funktionsbeeinträchtigung des Sinusknotens beruhen. Eine Störung der Generierung oder Weiterleitung der elektrischen Aktion manifestiert sich u.a. in Form von symptomatischen Sinusbradykardien, supraventrikulären Tachykardien, kombinierten Brady-Tachykardien oder einer chronotropen Insuffizienz⁶². In vielen Fällen liegt dieser eine strukturelle Schädigungen des Sinusknotens zugrunde, beispielsweise durch eine narbige Degeneration, einen ischämischen Myokardinfarkt oder einen angeborenen Herzfehler⁶². Betroffen sind überwiegend ältere Patienten. Neben kardialen Auslösern können auch metabolische Störungen, Medikamente oder Drogen ein SSS hervorrufen. Da die Erkrankung meist irreversibel verläuft, stellt die Implantation eines Herzschrittmachers die Therapie der Wahl dar. Mit etwa 50% ist die Sinusknotendysfunktion die häufigste Indikation für eine Schrittmacherimplantation und somit von hoher sozioökonomischer Bedeutung⁶³.

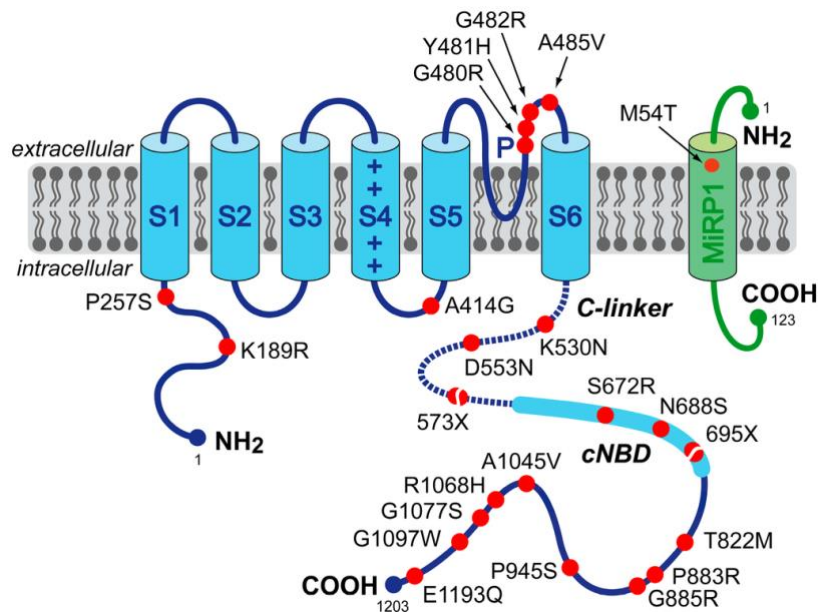


Abb. 4: Identifizierte Mutationen des HCN4 Kanals und des putativen Interaktionspartners MiRP1.

Dargestellt sind die Membrantopologien des HCN4 Kanals sowie des putativen Interaktionspartners MiRP1. Die schematisch abgebildeten 23 Mutationen stellen meist Punktmutationen des C-Terminus dar. Sie sind jedoch auch vereinzelt im N-Terminus und im Linker zwischen den Transmembransegmenten S5 und S6 zu finden. Viele von ihnen gehen mit einer klinisch bestätigten oder dem Verdacht auf eine Sinusknotendysfunktion einher; Abb. mit freundlicher Genehmigung des Verlages unverändert übernommen aus Verker & Wilders.⁶⁴

In den letzten Jahren haben Ionenkanalerkrankungen im Rahmen von Sinusknotendysfunktionen zunehmend an Aufmerksamkeit gewonnen. Insbesondere *loss-of-function* Mutationen des HCN4 Kanals sind mit diesem Krankheitsbild in Verbindung gebracht worden. Den ersten Hinweis für einen solchen Zusammenhang lieferten Schulze-Bahr *et al.* Sie identifizierten bei einer Indexpatientin mit idiopathischer Sinusknotendysfunktion die heterozygote Mutation HCN4 573X⁶⁵. Es folgten weitere Veröffentlichungen von SSS-assoziierten Mutationen des Ionenkanals sowie des Interaktionspartners MiRP1⁶⁴. Bei den betroffenen Patienten fielen neben den typischen Symptomen wie wiederkehrenden Synkopen, Schwindelattacken oder Palpitationen eine auffällige Familienanamnese oder eine vorzeitige Herzschrittmacherimplantation in jungem Alter auf^{66, 67}. Die meisten der entdeckten Kanalvarianten beruhen auf heterozygoten Punktmutationen, die zu einer funktionellen Einschränkung des Ionenkanals führen. Dabei zeigen die HCN4 Mutanten eine Beeinträchtigung der spannungsabhängigen Aktivierung, der cAMP-Sensitivität und/oder der Oberflächenexpression in heterologen Expressionssystemen⁶⁴. Die Identifikation und Charakterisierung dieser Mutationen trägt neben der Ursachenforschung der Sinusknotendysfunktion maßgeblich zum Verständnis von Rolle und Funktionsweise kardialer HCN4 Kanäle bei.

Im Rahmen dieser Arbeit wird eine genetische HCN4 Variante, die bei einer Patientin mit symptomatischer Sinusbradykardie vorliegt, vorgestellt und analysiert.

1.2 Wachstumshormon IGF-1

Der Wachstumsfaktor *Insulin-like-growth-factor-1* (IGF-1) spielt als Hormon der *growth hormone* (GH)-IGF-1-Achse bei der Differenzierung, der Proliferation, den Überlebensmechanismen sowie der Regulation des Metabolismus von Zielzellen eine wichtige Rolle. Über den somatotropen Regelkreis vermittelt es anabole und wachstumsstimulierende Prozesse in nahezu allen Organen und Geweben. Nach Stimulation durch hypothalamisches GH wird der Wachstumsfaktor überwiegend in der Leber produziert und hemmt nach dem Prinzip des negativen Feedback-Mechanismus dessen Freisetzung.

IGF-1 ist Teil des IGF-1/Insulin-Systems, zu dem u.a. die beiden Wachstumsfaktoren IGF-1 und IGF-2, das Hormon Insulin, die Rezeptoren IGF-1-Rezeptor und IGF-2-Rezeptor sowie zwei Insulin-Rezeptoren (IR) gehören⁶⁸⁻⁷⁰. Der Wachstumsfaktor ist ein Polypeptid aus 70 Aminosäuren, das zu Pro-Insulin, der Vorstufe des metabolischen Hormons Insulin, eine hohe Sequenzhomologie (~50 %) vorweist. IGF-1 agiert vornehmlich über den heterotetrameren IGF-1-Rezeptor (IGF-1R). Dieser gehört zur Familie der Tyrosinkinaserzeptoren. Nach Ligandenbindung an die beiden extrazellulär lokalisierten α -Untereinheiten erfolgt eine Autophosphorylierung der hauptsächlich intrazellulär gelegenen β -Untereinheiten des Rezeptors. Eine anschließende Tyrosin-Phosphorylierung zytosolischer Adaptermoleküle rekrutiert und aktiviert ein komplexes Netzwerk nachfolgender Signalkaskaden.

Die beiden klassischen Signalwege des aktivierten IGF-1R sind die Phosphoinositide-3-Kinase (PI3K)-AKT-Signalkaskade sowie der *extracellular-regulated kinase* (ERK)-Weg^{70, 71}. Aufgrund einer hohen Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von IGF-1 und Insulin sowie des IGF-1R mit IR besitzen beide Hormone die Fähigkeit zur wechselseitigen Aktivierung der jeweiligen Rezeptoren (IGF-1R oder IR). Trotz zum Teil unterschiedlicher biologischer Wirkungen, aktivieren IGF-1 und Insulin gemeinsame Signaltransduktionskaskaden, wie den in dieser Arbeit besprochenen PI3K-AKT-Signalweg. Ein weiterer Aspekt der überschneidenden Wirkungen der Signalnetzwerke von IGF-1 und Insulin beruht auf der Bildung sogenannter Rezeptorhybride, die aus verschiedenen zusammengesetzten Untereinheiten von IGF-1R und IR bestehen. Die Komplexität des IGF-1/Insulin-Systems geht somit weit über die beiden klassischen Signalwege hinaus.

Neben der Synthese in Hepatozyten, wird IGF-1 u.a. im Myokard gebildet, wo es als autokrines und parokrines Hormon wirkt^{68, 69}. Am Herzen spielt der Wachstumsfaktor eine wichtige Rolle in der Vermittlung des physiologischen Wachstums. Die beiden klassischen Signalwege des IGF-1R, PI3K-AKT und ERK, sind daran beteiligt. Darüber hinaus erhöht IGF-1 die Kontraktilität des Myokards, fördert Stoffwechselprozesse und unterstützt durch Hemmung von Apoptose und Autophagie das Überleben kardialer Zellen.

Niedrige IGF-1 Level gehen mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse einher^{72, 73}. Experimentelle Studien liefern Hinweise dafür, dass IGF-1 die Schäden einer kardialen Ischämie und

Reperfusion reduziert⁷⁴. Die kardioprotektive Rolle von IGF-1 steht daher zunehmend im Fokus der Forschung zu Therapiemöglichkeiten von kardiovaskulären Erkrankungen.

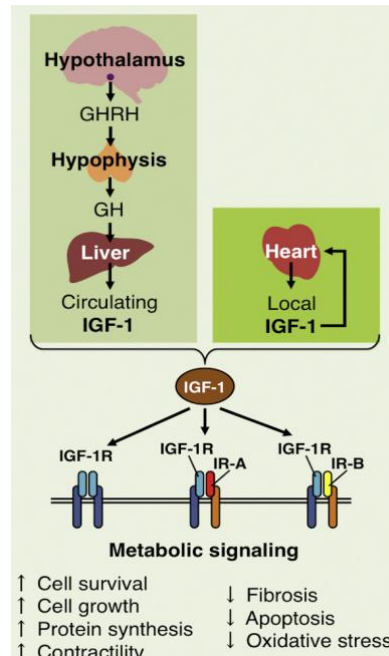


Abb. 5: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von IGF-1 am Herzen.

Insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1) wird nach Stimulation durch hypothalamisches *growth hormone* (GH) überwiegend in der Leber freigesetzt. In vielen Organen, u.a. am Herzen wird, der Wachstumsfaktor auch lokal synthetisiert und wirkt dort als autokrines und parakrines Hormon. IGF-1 aktiviert sowohl IGF-1-Rezeptoren (IGF-1R) als auch Insulin-Rezeptoren (IR) aber auch Rezeptorhybride aus unterschiedlichen Untereinheiten des IGF-1R und IR. Am Herzen besitzt das Wachstumshormon eine Vielzahl an Wirkungen und steigert u.a. Zellwachstum, Kontraktilität und Zellüberleben; GHRH: *growth hormone releasing hormone*; Abb. mit freundlicher Genehmigung des Verlages unverändert übernommen aus Westermeier *et al.*⁶⁹

1.3 Proteinkinase AKT

Die Proteinkinase AKT, auch bekannt als Proteinkinase B (PKB), ist als Serin-/Threoninkinase ein zentraler Regulator zahlreicher Signalkaskaden in nahezu allen Zellen und gemeinsamer Knotenpunkt der IGF-1/Insulin-Signaltransduktion⁷⁵. Eine Aktivierung von AKT stimuliert das Wachstum und die Proliferation der Zielzellen. Darüber hinaus beeinflusst AKT den Metabolismus und reguliert überlebensnotwendige Mechanismen der Zelle.

Die klassische Aktivierung der Proteinkinase erfolgt über Rezeptoren mit Rezeptortyrosinkinase-Aktivität, wie IGF-1R und IR, oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren⁷⁶. Diese aktivieren die Lipidkinase PI3K, die PIP₂ zu PIP₃ phosphoryliert. AKT wird daraufhin zur Plasmamembran rekrutiert und PIP₃-abhängig von der *phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1) an T308 phosphoryliert. Eine vollständige Aktivierung von AKT erfolgt über eine weitere Phosphorylierung an Position S473 durch *mammalian target of rapamycin complex 2* (mTORC2). Anschließend dissoziiert AKT von der Plasmamembran und transloziert in das Zytosol bzw. in Richtung Zellkern,

um *via* Phosphorylierung weitere, in der Signaltransduktion nachfolgend gelegene, Substrate zu aktivieren. Die Zielstrukturen der aktiven AKT-Kinase sind u.a. weitere Kinasen, metabolische Enzyme und Transkriptionsfaktoren sowie Regulatoren des vesikulären Transports (*trafficking*). Sie beinhalten eine gemeinsame Konsensussequenz R-X-R-X-X-S/T-φ, wobei φ für einen großen hydrophoben Rest, X für eine beliebige Aminosäure und R für Arginin steht. Als Serin-/Threoninkinase aktiviert oder inhibiert AKT seine Substrate durch Phosphorylierung eines oder mehrerer Serin- oder Threoninreste.

Von den drei Isoformen AKT1, AKT2 und AKT3 werden im Herzen vorwiegend AKT1 und AKT2 exprimiert⁷⁷. Die Proteinkinasen spielen dort eine zentrale Rolle in der Regulation von Wachstumsprozessen, des Metabolismus und der Kontraktilität des Herzens sowie bei der Vermittlung kardioprotektiver Mechanismen, die teilweise durch IGF-1 oder Insulin stimuliert werden können⁷⁸. *In vitro* ähneln sich die Wirkungsweisen von AKT1 und AKT2⁷⁷. *Knock-out*-Modelle zeigten jedoch, dass AKT1 vorwiegend im Rahmen der physiologischen Hypertrophie des Myokards eine Rolle spielt⁷⁹. AKT2 greift hingegen vor allem in die Regulation von Stoffwechselprozessen und Überlebensmechanismen nach einer Ischämie von Kardiomyozyten ein⁸⁰.

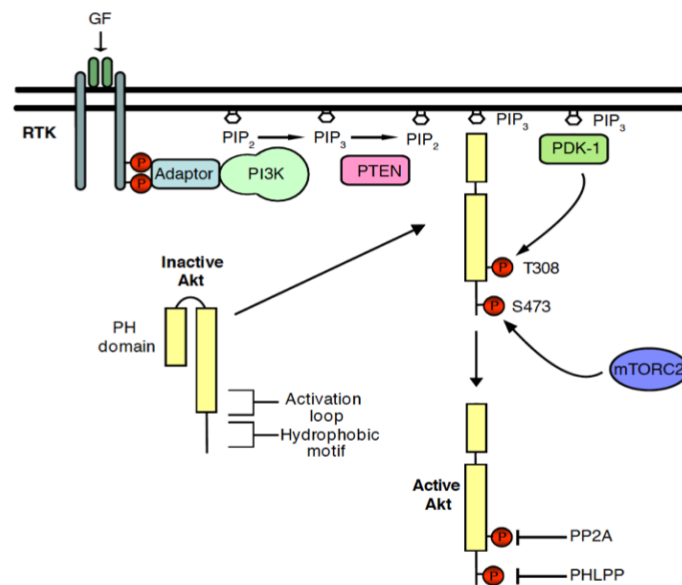


Abb. 6: Aktivierung der Serin-/Threoninkinase AKT.

Schematische Darstellung der Aktivierung der Proteinkinase AKT. Wachstumshormone (*GF*, *growth factor*) stimulieren membranöse Tyrosinkinase-Rezeptoren (RTK), die zytosolische Adaptermoleküle mobilisieren. Diese aktivieren wiederum die Lipidkinase Phosphoinositide-3-Kinase (PI3K), die Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP₃) phosphoryliert. AKT wird daraufhin zur Plasmamembran rekrutiert und PIP₃-abhängig von *phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1) an T308 phosphoryliert. Eine weitere Phosphorylierung von S473 durch *mammalian target of rapamycin complex 2* (mTORC2) führt zur vollständigen Aktivierung. Die aktivierte Proteinkinase dissoziiert anschließend von der Plasmamembran in das Zytosol bzw. in Richtung Zellkern, um *via* Phosphorylierung von Serin- bzw. Threoninresten weitere Proteine zu regulieren oder nachfolgende Signalwege zu aktivieren; PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), PP2A (Protein-Phosphatase 2A), PHLPP (*PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase*); Abb. mit freundlicher Genehmigung des Verlages unverändert übernommen aus Hers *et al.*⁸¹

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Es sind verschiedene Mutationen des HCN4 Kanals bekannt, die die Funktionsweise des Ionenkanals beeinträchtigen und in Verbindung mit dem Krankheitsbild der Sinusknotendysfunktion stehen⁶⁴.

Ziel im ersten Teil der vorliegenden Arbeit war die molekulargenetische Untersuchung des HCN4 Gens einer Patientin mit symptomatischer Sinusknotendysfunktion und einer auffälligen Familienanamnese. Dabei konnte die genetische Variante HCN4 V759I identifiziert werden. Um zu analysieren, ob V759I ursächlich für die Symptomatik der Patientin sein könnte, sollte im Rahmen dieser Arbeit das Expressionsmuster der Variante zellbiologisch in einem heterologen Expressionssystem untersucht werden. Da V759I bereits mit Fällen von maligner Epilepsie in Verbindung stand, war die Oberflächenexpressionsanalyse des HCN4 Kanals insbesondere vor dem Hintergrund der Interaktion mit dem neuronalen Bindungspartner PEX5R/Trip8b ein weiteres Vorhaben dieser Dissertation.

Signalwege beeinflussen auf verschiedene Weise die Funktion von Ionenkanälen und ermöglichen eine dynamische Anpassung der Kanalaktivität an veränderte Bedingungen der Zelle. Eine Phosphoproteom-Analyse von HL-1 Kardiomyozyten der Ratte hatte zuvor vier Serinresten des HCN4 Proteins (S14, S99, S102 und S139) identifiziert, deren Phosphorylierung AKT-abhängig reguliert wird⁷⁵. Aus diesen Erkenntnissen ergab sich die Fragestellung, ob und wie die Proteinkinase AKT HCN4 Kanäle beeinflusst.

Ziel im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit war die Generierung und Charakterisierung phosphomimetischer und phosphoablativer HCN4 Mutanten, die eine AKT-abhängige Phosphorylierung der identifizierten Serinreste des HCN4 Kanals imitierten. Mithilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme sollten die biophysikalischen Eigenschaften der entsprechend modifizierten Ionenkanäle in *Xenopus laevis* Oozyten analysiert werden. Daran anschließend folgte die Untersuchung des Einflusses des Wachstumsfaktors IGF-1, neben Insulin ein kompetenter Aktivator der AKT, auf die Funktion des Ionenkanals⁷⁶.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

In Tabelle 1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien mit Angabe des Herstellers aufgeführt.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
(2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
2- Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Acrylamid 30 %	Bio Rad , Hercules, USA
AgarAgar (<i>high gel strength</i>)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Life Science, Amersham, GB
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ampuwa Spüllösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Antibiotic antimycotic solution (Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Antibiotic Antimycotic Solution (Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B), (100x)	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, USA
Bis Tris Puffer	Applchem, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Calciumchlorid Dihydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO), steril	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Applchem, Darmstadt, Deutschland
DNase zap	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dulbecco's Phosphat gepufferte Salzlösung (DPBS)	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, USA
Ethanol 70 %	VWR, Radnor, USA
Ethanol absolut	VWR, Radnor, USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FastDigest Green Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FastDigest Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Formaldehyd 36,5-38 %	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Fötales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i> , FBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland

GC-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gene Ruler 1 kb	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gene Ruler 1000 bp	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gibco® MEM α	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, USA
Glucose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
H ₂ O steril	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HF-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Indol-3-essigsäure (IAA)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Insulin-Like-Growth-Factor-1 (IGF-1)	Millipore, Merck, Darmstadt, Deutschland
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
JetPEJ	Polyplus transfection, Illkirch, Frankreich
Kaliumbicarbonat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kanamycin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Loading Dye (LD), (6x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Magermilchpulver, Instant	Frema, Heirler Cenovis, Radolfzell, Deutschland
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Millipore Wasser	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mineralöl, <i>heavy</i>	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Mineralöl, <i>light</i>	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumchlorid 150 nM	Polyplus Transfection, Illkirch, Frankreich
Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
NZ Amine	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Oligonukleotide (dNTP)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phosphatase Inhibitor Mix (PI)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Precision Plus Protein All Blue Standard	Bio Rad, Hercules, USA
Precision Plus Protein Dual Color Standard	Bio Rad, Hercules, USA
ProLong Gold Antifade Mountant	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Proteinase K, RNase-frei	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i> , BSA)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

RNase zap	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SuperSignal™ELISA Femto Maximum Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SYBR Safe DNA gel stain	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
t-Octylpheoxypolyethoxyethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
T4 DNA Ligase Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TAE-Puffer, (50x)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Hydrogenchlorid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trisbase (TRIZ)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trypsin	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, USA
Ziegenserum (<i>normal goat serum</i> , NGS)	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, USA

2.1.2 Puffer und Lösungen

Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer wird in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungsansätze

Puffer	Zusammensetzung	
Barth ⁺ -Medium	NaCl	88 mM
	KCl	1 mM
	CaCl ₂	0,4 mM
	CA(NO ₃) ₂	0,33 mM
	NaHCO ₃	2,4 mM
	MgSO ₄	0,8 mM
	HEPES	5 mM
	pH 7,2	
HCN4 Ringerlösung	NaCl	17,5 mM
	KCl	115 mM
	CaCl ₂	1,8 mM
	HEPES	10 mM
	pH 7,3	
Laemmlipuffer (5x)	Tris-HCl (pH 6,8)	312,5 mM
	Glycin	1,9 M
	SDS	1 %
	DTT	500 mM
	Bromphenolblau	0,05 %
Lysepuffer	Tris (pH 7,4)	20 mM
	EDTA	1 mM
	NaCl	150 mM
	IAA	1 mM
	PI Mix	0,1 %

PBS (10x)	Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
	KH ₂ PO ₄	1,6 mM
	NaCl	150 mM
	KCl	2,7 mM
	pH 7,4	
RNA <i>premix</i>	10x MOPS <i>running buffer</i>	0,129 ml
	Formaldehyd 37 %	0,226 ml
	Formamide	0,645 ml
	H ₂ O	ad 1 ml
Sammelgel 5 %	30 % Acrylamid	0,67 ml
	4x Trenngelpuffer (pH 6,8)	1 ml
	H ₂ O	2,3 ml
	TEMED	4 µl
	10 % APS	10 µl
Sammelgelpuffer (4x)	Tris-HCl (pH 6,8)	0,5 M
	SDS	0,40 %
SDS-Laufpuffer (10x)	Tris-HCl	250 mM
	Glycin	1,92 M
	SDS	1 %
TAE (1x)	Trisbase (pH 8,0)	40 mM
	Acetat	20 mM
	EDTA	1 mM
	pH 8,5	
TBS-T (10x)	Tris-HCl	24,2 g/l
	NaCl	80 g/l
	Tween	10 g/l
	pH 7,6	
Transferpuffer (1x)	Tris-HCl (pH 6,8)	25 mM
	Glycin	192 mM
	Ethanol	20 %
Trenngel 10 % (für 2 Gele)	30 % Acrylamid	3,33 ml
	4x Trenngelpuffer (pH 8,8)	2,5 ml
	H ₂ O	4,16 ml
	TEMED	4 µl
	APS 10 %	100 µl
Trenngelpuffer (4x)	Tris-HCl pH 8,8	1,5 M
	SDS	0,40 %

2.1.3 Kulturmedien

In Tabelle 3 werden die verwendeten Kulturmedien und deren Zusammensetzung aufgelistet.

Tabelle 3: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien

Medium	Zusammensetzung	
LB-Medium	NaCl	10 g
	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	H ₂ O	Ad 1000 ml
LB-Agar	NaCl	10 g
	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	Agar	15 g
	H ₂ O	Ad 1000 ml
NZY+-Medium	NZ Amine	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O	ad 1000 ml
	pH 7,5	
	autoklaviert	
	<u>Anschließende Zugabe von:</u>	
	MgCl 1 M	12,5 ml
	MgSO ₄ 1 M	12,5 ml
	20 % Glukose	20 ml
CHO-Zell-Kulturmedium	MEM alpha	89 %
	FBS <i>Supplementary</i>	10 %
	Penicillin/ Streptomycin	1 %

2.1.4 Bakterienstämme und Zelllinien

Tabelle 4 zeigt die verwendeten Zelllinien und den genutzten Bakterienstamm.

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Bakterienstämme und Zelllinien

Bakterienstamm oder Zelllinie	Hersteller
<i>Escherichia coli</i> XL1-blue	Stratagene, LaJolla, USA
<i>Escherichia coli</i> XL-10 Gold Zellen	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
CHO-Zellen (<i>chinese hamster ovaries</i> Zellen)	Leibniz Institute, DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Braunschweig, Deutschland
<i>Xenopus laevis</i> Oozyten	EcoCyte Bioscience, Castrop-Rauxel, Deutschland

2.1.5 Plasmide und Konstrukte

In Tabelle 5 und Tabelle 6 sind die verwendeten Plasmide und Konstrukte gelistet.

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Plasmide

Plasmid	Resistenz	Hersteller
pcDNA3.1+	Ampicillin	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
pEGFP-N1	Kanamycin	Clontech Mountain View, USA
pGem-He	Ampicillin	Liman <i>et al.</i> , 1992 ⁸²

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Konstrukte

Konstrukte	Resistenz
HCN4-HAex in pEGFP-N1	Kanamycin
HCN4 in pEGFP-N1	Kanamycin
HCN4 in pGem-He	Ampicillin
HCN4 in pcDNA3.1+	Ampicillin
HCN4 V759I-HAex in pEGFP-N1	Kanamycin
HCN4 V759I in pEGFP-N1	Kanamycin
PEX5R/Trip8b in pEGFP-C2	Kanamycin
HCN4 S14A in pGem-He	Ampicillin
HCN4 S14D in pGem-He	Ampicillin
HCN4 S99-102A in pGem-He	Ampicillin
HCN4 S99-102D in pGem-He	Ampicillin
HCN4 S139A in pGem-He	Ampicillin
HCN4 S139D in pGem-He	Ampicillin
HCN4 S14-99-102-139A in pGem-He	Ampicillin
HCN4 S14-99-102-139D in pGem-He	Ampicillin
pEGFP-C1	Kanamycin
pEGFP-C2	Kanamycin

2.1.6 Enzyme für die Molekularbiologie

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in Tabelle 7 aufgelistet. Alle verwendeten Restriktionsenzyme und entsprechenden Puffer stammten von der Firma Thermo Fisher Scientific.

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Enzyme

Enzym	Hersteller
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	New England BioLabs, Frankfurt am Main, Deutschland
RNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fast AP (Alkalische Phosphatase)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.7 Antikörper

In Tabelle 8 werden die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper aufgelistet.

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller
Anti-HCN4	Kaninchen	Alomone Labs, Jerusalem, Israel
Anti- β -Aktin	Kaninchen	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Anti-HA tag F7	Maus	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Goat Anti-mouse IgG HRP	Ziege	Santa Cruz, Dallas, USA
Goat Anti-rabbit IgG HRP	Ziege	Santa Cruz, Dallas, USA

2.1.8 Primer

In Tabelle 9, Tabelle 10 und Tabelle 11 sind die verwendeten Primer für das Einfügen von Mutationen sowie die Amplifizierung und Sequenzierung des HCN4 Gens und der HCN4 Konstrukte aufgelistet.

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Primer für das Einfügen von Mutationen in HCN4 Plasmide

Bezeichnung	Sequenz	Länge (bp)	Orientierung
Mut V759I <i>forward</i>	5'-gcgcaccgcacccaggtctgcctctgc-3'	29	Sense
Mut V759I <i>reverse</i>	5'-agcagcctggatgcggcgccgcagtgagg-3'	29	Antisense
S14A <i>forward</i>	5'-ctgctgcgggaggcgtagagccgcttg-3'	28	Antisense
S14A <i>reverse</i>	5'-caagcggctctacgccctccgcagcag-3'	28	Sense
S99-102A <i>forward</i>	5'-ctgcccagcgcggccaggccccgcggaag-3'	30	Antisense
S99-102A <i>reverse</i>	5'-cttccgcggggccctggccgcgctgggcag-3'	30	Sense
S139A <i>forward</i>	5'-tcgccggggccgcgtcgccc-3'	21	Antisense
S139A <i>reverse</i>	5'-gggcgacgcggccccggcga-3'	21	Sense
S14D <i>forward</i>	5'-gcaagcggctctacgacctccgcagcagg-3'	30	Sense
S14D <i>reverse</i>	5'-cctgtcgcgggaggtcgtagaccgcttg-3'	30	Antisense
S99-102D <i>forward</i>	5'-gcgcttccgcgggacctggccgatctgggcagccggg-3'	38	Sense
S99-102D <i>reverse</i>	5'-cccggctgcccacatcgccaggtccccgcggaagccg-3'	38	Antisense
S139D <i>forward</i>	5'-gagggcgacgcggaccccgagga-3'	26	Sense
S139D <i>reverse</i>	5'-tcctcgccgggtccgcgtcgccctc-3'	26	Antisense
T7	5'-taatacgactcactatagg-3'	20	Sense
HCN4_Kpn1	5'-aggagttgtcaccatgttg-3'	20	Antisense

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Primer zur Amplifizierung und Sequenzierung des HCN4 Gens

Bezeichnung	Sequenz	Länge (bp)	Orientierung
Exon 1-1 <i>forward</i>	5'-aagcatggggcctgaggctg-3'	21	Sense
Exon 1-1 <i>forward</i> II	5'-actcgagcgggactaggatc-3'	21	Sense
Exon 1-1 <i>reverse</i>	5'-aactggcgctgcatgaagc-3'	19	Antisense
Exon 1-2-1 <i>forward</i>	5'-cggcagcagtcgggacacctgc-3' ¹	23	Sense
Exon 1-2-1 <i>reverse</i>	5'-acatccttagggagaattttgtg-3'	23	Antisense

Exon 1-2-2 <i>forward</i>	5'-tggacaccgctatcaaagtgg-3'	21	Sense
Exon 1-2-2 <i>reverse</i>	5'-ggaaagttaactccggctgggaggc-3' ¹	25	Antisense
Exon 2 <i>forward</i>	5'-tctctcttctggcgactgaccc-3' ¹	23	Sense
Exon 2 <i>reverse</i>	5'-ggcaagaacttactagatttgtcc-3' ¹	26	Antisense
Exon 3 <i>forward</i>	5'-gagcagtgtcccaccagcagctc-3' ¹	22	Sense
Exon 3 <i>reverse</i>	5'-gccaccctaaatctggagagc-3' ¹	21	Antisense
Exon 4 <i>forward</i>	5'-aggttgaggtgagtaggtggcagg-3' ¹	24	Sense
Exon 4 <i>reverse</i>	5'-ctgaaactcagattctcatctcagagg-3' ¹	27	Antisense
Exon 5 <i>forward</i>	5'-agatctcaaggaaccaagttagcc-3' ¹	25	Sense
Exon 5 <i>reverse</i>	5'-agggtggattgggacaggggaagg-3' ¹	24	Antisense
Exon 6 <i>forward</i>	5'-ccttcccgtgtcccaatccaccct-3' ¹	24	Sense
Exon 6 <i>reverse</i>	5'-ccctaccctgggctcacagacacc-3' ¹	24	Antisense
Exon 7 <i>forward</i>	5'-tatgtcccaaagatgggaaagtctg-3'	25	Sense
Exon 7 <i>reverse</i>	5'-aacaggcactcagggcagagc-3'	21	Antisense
Exon 7 <i>reverse</i>	5'-aggaggatggagtcttcttg-3'	21	Antisense
Exon 8-1 <i>forward</i>	5'-cccgtctgcctgagtgctgt-3' ¹	23	Sense
Exon 8-1 <i>reverse</i>	5'-ccgaggtgcccagcccagatcc-3' ¹	23	Antisense
Exon 8-2 <i>forward</i>	5'-acttctgtgcctatgccctcac-3' ¹	23	Sense
Exon 8-2 <i>reverse</i>	5'gtcggaggaggacagggacaaacc-3' ¹	24	Antisense
Exon 8-3 <i>forward</i>	5'-tcccacaccatcagctggcgtagc-3' ¹	24	Sense
Exon 8-3 <i>reverse</i>	5'-tgccacaagggacggcgataagg-3' ¹	24	Antisense
Exon 8-4 <i>forward</i>	5'-cggggagttgtccctaggtctgg-3' ¹	23	Sense
Exon 8-4 <i>reverse</i>	5'-ctggggaagagcgggaaggcagc-3' ¹	23	Antisense
Exon 8-5 <i>forward</i>	5'-ctcaggacggggcgagactctc-3' ¹	23	Sense
Exon 8-5 <i>reverse</i>	5'-gagagaaaagaagaagaagagggaag-3' ¹	27	Antisense

¹aus Schulze-Bahr *et al.*, 2003⁶⁵

Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Primer zur Sequenzierung der generierten HCN4 Konstrukte

	Sequenz	Länge	Orientierung
Sequenzierung HCN4	5'-aagtccagcacgaacggcg-3'	19	Sense
Sequenzierung HCN4	5'-atgctgctgctgatggtg-3'	18	Sense
Sequenzierung HCN4	5'-acatggtgaacaactctg-3'	19	Sense
Sequenzierung HCN4	5'-tggacaacttcaatgagg-3'	18	Sense
Sequenzierung HCN4	5'-ttggccacttcacaagg-3'	18	Sense
Sequenzierung HCN4	5'-tcccacggatccttgctc-3'	18	Sense
T7	5'-taatacgactcactataggg-3'	20	Sense
SP6	5'-atttaggtgacactatagaa-3'	20	Antisense
CMV-F	5'-cgtcagatcgccctggagacg-3'	20	Sense
pEGFP-N	5'-aggcgtgtacgggtgggag-3'	18	Sense
pEGFP-N	5'-acgctgaactgtggccg-3'	18	Antisense

2.1.9 Kits

Folgende Kits wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet (Tabelle 12).

Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Kits

Kits	Hersteller
QIAamp DNA <i>Blood Mini</i> Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
QIAgen MinElute <i>Gel Extraction</i> Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
QIAgen PCR <i>Purification</i> Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
QIAgen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
QIAgen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
QuikChange II XL <i>Site-Directed Mutagenesis</i> Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
mMESSAGE mMACHINE T7 <i>Transcription</i> Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.10 Geräte

Folgende Geräte wurden in der Molekularbiologie, Zellbiologie sowie Elektrophysiologie verwendet (Tabelle 13, Tabelle 14, Tabelle 15, Tabelle 16).

Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Geräte für molekularbiologische Analysen

Gerät	Hersteller
Elektrophoresis Power Supply EPS 301	GE Healthcare, Amersham, GB
Elektrophoresis Power Supply EPS 601	GE Healthcare, Amersham, GB
Gelelektrophorese Kammer	Stephan Schätz, Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie Düsseldorf, Deutschland
Mastercycler ep Gradient S	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mastercycler pro S	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Safe Imager™ 2.0 Blue Light Transilluminator	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
UV Transilluminator UV Solo TS	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Seven Easy S20 pH-Meter	Mettler Toledo, Columbus, USA

Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Zentrifugen

Gerät	Hersteller
Centrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5424R Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mini Spin Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 15: Auflistung der verwendeten Geräte für die Zellkultur

Gerät	Hersteller
Vakuum-controller CVC 3000	vacuubrand, Wertheim, Deutschland
GloMax® 20/20 Single Tube Luminometer	Progamma, Mannheim, Deutschland
Axiovert 40 CFL	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
HBO 50	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Brutschrank BBD 6220	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Observer.Z1	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Sonifier 250	Branson Ultrasonics/Emerson, St. Louis, USA
LSM510 Meta microscope	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio Rad, Hercules, USA
Mini ProteanTetra Cell System	Bio Rad, Hercules, USA
Fusion FX	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland

Tabelle 16: Auflistung der verwendeten Geräte in der Elektrophysiologie

Geräte	Hersteller
IntruTECH LIH 8+8 data acquisition system, inkl. Headstage	HEKA Electronics, Lambrecht, Deutschland
Turbe Tec-CHS	npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland
Turbe Tec-03X	npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland
KL-200 LED	Olympus Life Science, Tokyo, Japan
SZ51, Mikroskop	Olympus Life Science, Tokyo, Japan
DMZ-Universal micropipette puller	Zeitz Instruments GmbH, Martinsried, Deutschland
MF-830 Micro Forge	Narishige, Tokyo, Japan
MM 33, Mikromanipulator, rechts bzw. links	Märzhäuser Wetzlar, Wetzlar, Deutschland
Brutschrank für Oozyten	Memmert, Schwabach, Deutschland
Four Channel Micro Controller for Micro Syringe Pumps	World Precision Instruments, Sarasota, USA
Injektor Nanoliter 2010	World Precision Instruments, Sarasota, USA
Wine Case SC-06A	Caso Germany, Arnsberg, Deutschland

2.1.11 Software Programme

Folgende Programme wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet (Tabelle 17).

Tabelle 17: Auflistung der verwendeten Softwareprogramme

Software	Hersteller
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Vektor NTI Software	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ImageJ	NIH, Bethesda, USA
PatchMaster v2x65	HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland
FitMaster	HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland
Parallels Desktop for Mac	Parallels, Bellvue, USA
OriginPro	OriginLab Corp., Guangzhou, China

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung der genomischen DNA aus einer Vollblutprobe

Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der genomischen DNA (gDNA) einer symptomatischen Patientin auf Mutationen des HCN4 Gens. Dafür erfolgte zunächst die Isolation der gDNA aus kernhaltigen Blutbestandteilen der Vollblutprobe der Patientin unter Verwendung des QIAamp DNA *Blood Mini Kits* entsprechend des Standardprotokolls des Herstellers. Das Prinzip des Kits beruht auf der spezifischen Bindung der gDNA an eine im Reaktionsgefäß sitzende Silikat-Membran. Dafür müssen die zellulären Blutbestandteile zuerst lysiert werden. Nach zwei Reinigungsschritten kann die gDNA aus der Membran isoliert werden.

Die gewonnene gDNA wurde mit 200 µl AE-Puffer (QIAamp DNA *Blood Mini Kit*) aus der Membran eluiert. Zur weiteren Verwendung wurden die Konzentration und die Reinheit mittels des Spektrophotometers Nanodrop bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine molekulargenetische Methode zur gezielten Vervielfältigung (Amplifikation) von DNA-Sequenzen. Die für das HCN4 Protein kodierenden Bereiche auf der isolierten gDNA, die sogenannten Exons, wurden mithilfe dieser Methode vervielfältigt, um anschließend sequenziert zu werden. Darüber hinaus wurde die PCR zur gezielten Amplifikation von cDNA-Sequenzen und zum Einfügen von Punktmutationen in rekombinante DNA-Plasmide angewandt.

Der Prozess der Amplifikation besteht im Wesentlichen aus drei temperaturabhängigen Schritten. Zunächst wird das doppelsträngige DNA-Template in seine beiden Einzelstränge aufgetrennt. Dieser Schritt der Denaturierung ermöglicht anschließend die spezifische Anlagerung zweier, zu den DNA-Fragmenten komplementären, Primern. Die Primer sind einzelsträngige Nukleotidsequenzen in 5'-3'-Richtung, die den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankieren. Sie dienen einer thermostabilen Polymerase als Ausgangsposition. Die Polymerase verlängert anschließend die Primer während der Elongationsphase in 5'-3'-Richtung und kopiert die Zielsequenz, die zwischen beiden Primern liegt. Pro Zyklus wird somit die Anzahl des DNA-Templates verdoppelt. Die einzelnen temperaturabhängigen Schritte werden mithilfe eines standardisierten Temperaturzyklusprotokolls mehrmalig durchlaufen (Tabelle 19, Tabelle 21). Sie sind an die Eigenschaften der verwendeten Polymerase sowie die Länge der Sequenz angepasst. Die gewünschte DNA-Sequenz liegt nach Abschluss einer PCR vervielfältigt und in doppelsträngiger Form vor.

In dieser Arbeit wurden die *Phusion* DNA Polymerase und die *Q5 High Fidelity* Polymerase verwendet. Für weitere Schritte mussten die amplifizierten DNA-Sequenzen isoliert und aufgereinigt werden.

2.2.3 Standardprotokoll *Phusion* DNA Polymerase

Die Standard-PCR unter Verwendung der *Phusion* DNA Polymerase wurde nach folgendem Protokoll angesetzt:

Tabelle 18: Ansatz für eine Standard-PCR mit der *Phusion* DNA Polymerase

DNA Template	1 pg-250 ng
dNTPs 10mM	1 µl
5' Primer 5 µM	3 µl
3' Primer 5 µM	3 µl
<i>Phusion</i> DNA Polymerase	1 µl
HF-/GC-Puffer (10x)	10 µl
H ₂ O (autoklaviert)	ad 50 µl

Sollten GC-reiche DNA-Fragmente amplifiziert werden, wurde dem Ansatz zusätzlich 5-8 % DMSO hinzugegeben und anschließend mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt. Die Dauer der Elongation und die Anlagerungstemperatur des Protokolls wurden an die Eigenschaften der zu amplifizierenden DNA-Sequenz und der Primer angepasst. Die Berechnung der spezifischen Anlagerungstemperatur T_m der Primer an die komplementäre DNA-Sequenz erfolgte mit folgender Formel:

$$T_m = \frac{((4^\circ\text{C} \times \text{GC} + 2^\circ\text{C} \times \text{AT}) \text{ 5'-Primer} - 4) + ((4^\circ\text{C} \times \text{GC} + 2^\circ\text{C} \times \text{AT}) \text{ 3'-Primer} - 4)}{2}$$

Tabelle 19 zeigt das verwendete Temperaturzyklusprotokoll.

Tabelle 19: Temperaturzyklusprotokoll *Phusion* DNA-Polymerase

1.	Initiale Denaturierung	98 °C	30 Sekunden	} 40 Zyklen
2.	Denaturierung	98 °C	10 Sekunden	
3.	Primer Anlagerung	55-75 °C	25 Sekunden	
4.	Elongation	72 °C	1 Minute/kb	
5.	Finale Elongation	72 °C	2 Minuten	
6.	Kühlung	4 °C	∞	

2.2.4 Standardprotokoll Q5 *High Fidelity* DNA Polymerase

Alternativ wurde die Polymerase Q5 *High Fidelity* DNA Polymerase verwendet. Tabelle 20 listet den standardisierten PCR-Ansatz hierfür auf.

Tabelle 20: Standardisierter Ansatz für eine PCR mit der Q5 *High Fidelity* DNA Polymerase

DNA-Template	1 pg - 1 ng
dNTPs 10mM	1 µl
5' Primer 10 µM	2,5 µl
3' Primer 10 µM	2,5 µl
Q5 <i>High Fidelity</i> DNA Polymerase	0,5 µl
Q5 Reaktion Puffer (5x)	10 µl
Q5 <i>High GC</i> -Enhancer (5x)	10 µl
H ₂ O (autoklaviert)	ad 50 µl

Die Anlagerungstemperatur der Primer wurde mithilfe des NEB *T_m Calculator* (<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>) berechnet. Die Schritte des Temperaturzyklusprotokolls sind Tabelle 21 zu entnehmen.

Tabelle 21: Temperaturzyklusprotokoll Q5 DNA-Polymerase

1.	Initiale Denaturierung	98 °C	30 Sekunden	} 35 Zyklen
2.	Denaturierung	98 °C	10 Sekunden	
3.	Primer Anlagerung	50-75 °C	30 Sekunden	
4.	Elongation	72 °C	20-30 Sekunden/kb	
5.	Finale Elongation	72 °C	2 Minuten	
6.	Kühlung	4 °C	∞	

2.2.5 Einfügen von Mutationen mit der Overlap-PCR

Durch die sogenannte Overlap-PCR können gezielt Mutationen in ein rekombinantes DNA-Plasmid eingefügt werden. Dafür werden zwei rekombinante Primer generiert, die die gewünschte Mutation bzw. Mutationen beinhalten und sich im Bereich der zu mutierenden Sequenz überlappen (20-25 bp). Im Rahmen von zwei unabhängigen PCRs wird die Mutation anschließend mithilfe dieser beiden Primer in das sich überlappende und sequenzidentische Ende der DNA-Fragmente eingefügt und amplifiziert. Die Mutation befindet sich nun an den komplementären Abschnitten der beiden DNA-Fragmente. Im Anschluss werden diese Fragmente in einem Temperaturzyklusprotokoll aneinander angelagert (Tabelle 23) und in der Overlap-PCR (Tabelle 24) zu einem durchgängigen DNA-Fragment transkribiert und vervielfältigt (Abb. 7).

Tabelle 22 beschreibt den hierfür verwendeten PCR-Ansatz. Diesem wurde gegebenenfalls 5-8 % DMSO hinzugegeben.

Tabelle 22: Standardisierter Ansatz einer Overlap-PCR

DNA Fragment 1	10 µl
DNA Fragment 2	10 µl
dNTPs 10 mM	1 µl
<i>Phusion</i> DNA Polymerase	0,5 µl
HF-/GC-Puffer (10x)	10 µl
H ₂ O (autoklaviert)	ad 50 µl

Das Temperaturzyklusprotokoll zur Anlagerung der bereits die Mutation beinhaltenden DNA-Stränge ist Tabelle 23 zu entnehmen.

Tabelle 23: Temperaturzyklusprotokoll Overlap-PCR

1.	Denaturierung	98 °C	5 Minuten	} 3 Zyklen
2.	Primer Anlagerung	50-75 °C	5 Minuten	
3.	Elongation	72 °C	5 Minuten	

Anschließend wurden dem Ansatz zwei Primer (jeweils 0,2 µl bei einer Konzentration von 100 pmol/µl) hinzugefügt, die an das 5'- bzw. 3'-Ende des DNA-Produkts banden und das Temperaturzyklusprotokoll der Overlap-PCR zur Transkription des vollständigen DNA-Produkts wurde durchlaufen (Tabelle 24).

Tabelle 24: Temperaturzyklusprotokoll PCR nach Overlap-PCR

1.	Initiale Denaturierung	98 °C	5 Minuten	} 30-35 Zyklen
2.	Denaturierung	98 °C	10 Sekunden	
3.	Primer Anlagerung	50-75 °C	30 Sekunden	
4.	Elongation	72 °C	20-30 bzw. 60 Sekunden/kb	
5.	Finale Elongation	72 °C	2 Min	
6.	Kühlung	4 °C	∞	

Die Dauer der einzelnen Zyklen und die Anlagerungstemperatur T_m wurden analog zur Standard-PCR an die Länge des DNA-Fragments und die verwendeten Primer angepasst. Für eine Overlap-PCR wurde entweder die *Phusion* DNA Polymerase oder die *Q5 High Fidelity* DNA Polymerase verwendet.

Im Anschluss wurde das DNA-Fragment, das nun die gewünschte Mutation beinhaltet, in einer Restriktionsendonuklease-Reaktion an seinen beiden Enden geschnitten und in ein mit denselben Restriktionsenzymen verdautes DNA-Plasmid eingefügt.

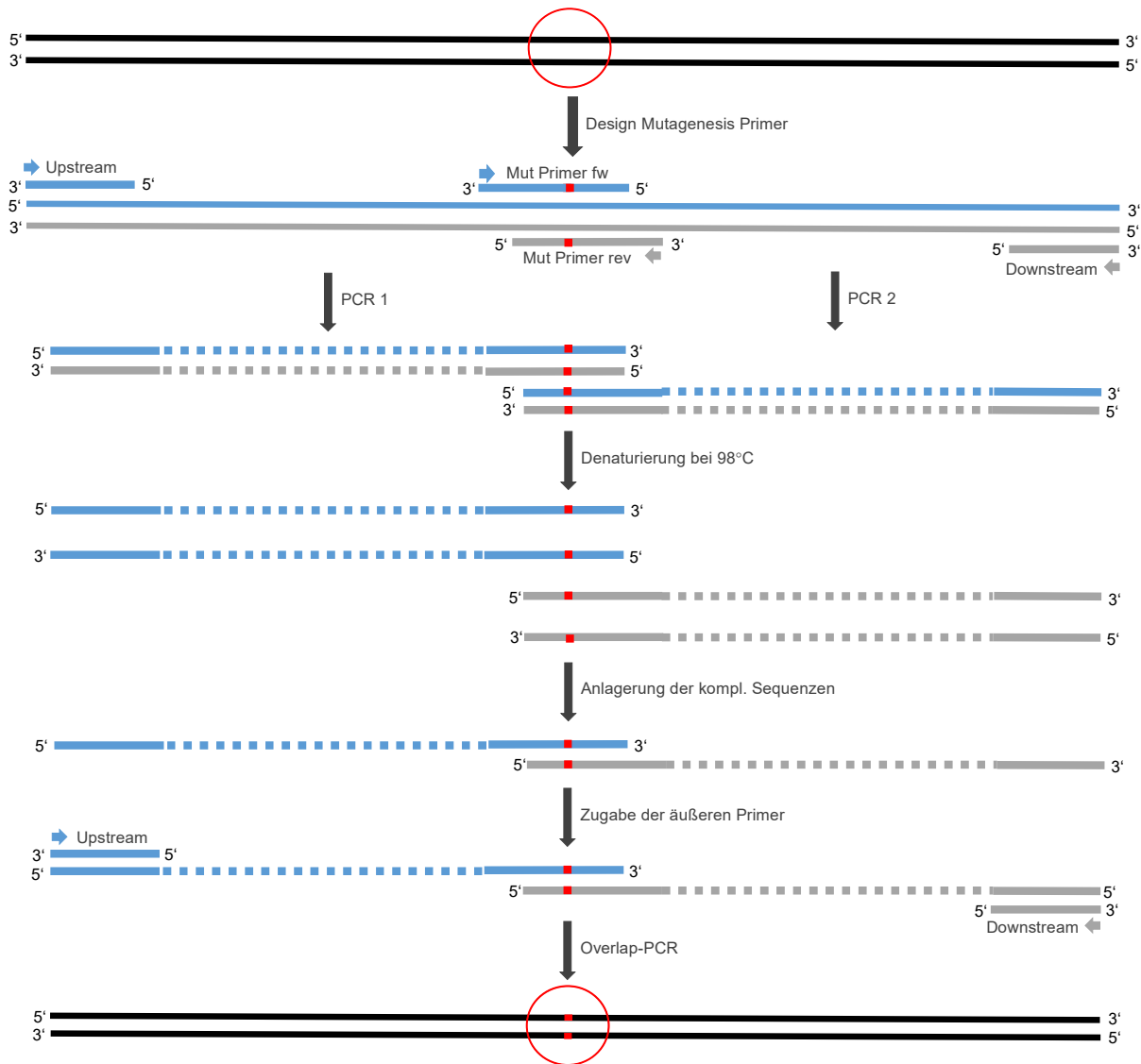


Abb. 7: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte einer Overlap-PCR.

2.2.6 Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten

Agarosegelelektrophorese

Um spezifische DNA-Fragmente zu isolieren, wurden diese mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass kleinere DNA-Fragmente in einem angelegten Spannungsfeld rascher zur positiv geladenen Anode wandern, als größere Fragmente. Auf diese Weise trennen sich die negativ geladenen DNA-Fragmente ihrer Größe nach auf.

Hierfür wurde ein 1-1,5%iges Agarosegel aus Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) hergestellt. Für Fragmente unter 1000 bp diente ein 1,5%iges Agarosegel und für größere Fragmente über 1000 bp ein 1%iges Agarosegel zur Auftrennung. Der Gelansatz wurde für wenige Minuten in der Mikrowelle aufgekocht und der DNA-Farbstoff SYBR Safe (1:10.000) zum Nachweis einzelsträngiger und aufgetrennter DNA-Fragmente hinzugegeben. Die flüssige Agarose-Lösung wurde in eine abgedichtete Gelkammer eingegossen. Mit einem Kamm wurden Geltaschen für die entsprechenden DNA-Proben ausgespart. Sobald das Agarosegel auspolymerisiert war, wurde zu den

DNA-Proben 1/6 ihres Volumens an 6x konzentriertem Ladepuffer hinzugegeben und die Proben in die Geltaschen gefüllt. Als Laufpuffer diente einfach konzentrierter TAE-Puffer, der die Gelkammer vollständig bedeckte. Daraufhin wurden die DNA-Fragmente für 30 bis 40 Minuten bei einer Spannung von 130-140 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenmarker diente eine 100 bp oder 1 kb DNA-Leiter. Mithilfe des im Gel enthaltenen DNA-Farbstoffes konnten die aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV- oder Blaulicht dargestellt werden.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde das Gel bei einer Wellenlänge von 470 nm mit dem Safe Imager beurteilt. Die anhand ihrer Größe identifizierte Bande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten. Eine Aufnahme des Gels in einer UV-Lichtkammer diente der Dokumentation. Da eine UV-Exposition DNA-Mutationen hervorrufen kann, sollte eine solche nicht vor der Extraktion der DNA-Bande geschehen. Das ausgeschnittene Fragment wurde mit dem QIAGEN MinElute *Gel Extraction* Kit nach dem Herstellerprotokoll aufgereinigt und mit 20-30 µl H₂O eluiert.

Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten, die zuvor nicht elektrophoretisch aufgetrennt wurden, wurde das QIAGEN PCR *Purification* Kit von Qiagen benutzt. Es wurde entsprechend des Herstellerprotokolls verfahren und die DNA mit 20-30 µl H₂O eluiert.

2.2.7 Restriktionsendonuklease-Reaktion

Mittels der Restriktionsendonuklease-Reaktion konnten DNA-Plasmide und -Fragmente an spezifischen Positionen enzymatisch gespalten werden.

Tabelle 25 listet die Zusammensetzung eines Restriktionsverdaus auf. Der Ansatz wurde für 30 bis 60 Minuten bei 37°C restringiert. Um eine Re-Ligation des Zielvektors zu verhindern, wurde dieser für 10 Minuten bei 37°C mit Fast-AP, einer alkalischen Phosphatase, dephosphoryliert. Die Fragmente wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und aufgereinigt.

Tabelle 25: Standardisierter Ansatz einer Restriktionsendonukleasereaktion

Plasmid-DNA (1µg/µl)	1 µl
Fast Digest Puffer (10x)	1 µl
Restriktionsenzym	1 µl
H ₂ O (autoklaviert)	Ad 10 µl

2.2.8 Ligation

Im Rahmen von Klonierungen wird mithilfe der Ligation ein verdautes DNA-*insert* in einen ebenfalls restringierten und dephosphorylierten Zielvektor eingefügt. In Tabelle 26 ist der standardisierte Ansatz einer Ligation mit der T4 DNA Ligase aufgeführt.

Tabelle 26: Standardisierter Ansatz einer Ligation

Verdauter DNA-Vektor	1 µl
Verdautes DNA- <i>insert</i>	16 µl
T4 DNA Ligase Puffer (10x)	2 µl
T4 DNA Ligase	1 µl

In einem Kontrollansatz wurde das Insert durch 16 µl H₂O ersetzt. Der Ligationsansatz inkubierte bei 16°C über Nacht. Zur Vervielfältigung des DNA-Plasmids erfolgte im Anschluss die Transformation des Plasmids in kompetente *Escherichia coli* Bakterien (*E. coli*).

2.2.9 Einfügen von Mutationen mit dem QuikChange II XL *Site-Directed Mutagenesis* Kit

Unter Verwendung des QuikChange II XL *Site-Directed Mutagenesis* Kits der Firma Agilent Technologies konnten eine bzw. mehrere Mutationen in einer einzigen PCR direkt in ein rekombinantes DNA-Plasmid eingefügt werden. Dies wurde als alternative Methode zu einer Overlap-PCR eingesetzt.

Dazu wurden zwei Primer mit der gewünschten Mutation mithilfe des QuikChange *Primer Design Program* (<http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pageId=7100004>) nach den empfohlenen Kriterien entwickelt. Die Primer waren an ihrem 5'-Ende komplementär zueinander und besaßen annähernd gleiche Anlagerungstemperaturen und Basenpaare. Das Einfügen von Mutationen wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurde die Pfu Ultra HF Polymerase verwendet. Nach einem einmaligen Restriktionsverdau der PCR-Produkte erfolgte direkt die Transformation in kompetente *E. coli* XL-10 Gold Zellen mit Ampicillin-Resistenz. Anstelle von LB-Medium wurde NYZ+-*Broth* verwendet.

2.2.10 Bakterien und Plasmide

Standardprotokoll Transformation

Ziel einer Transformation ist das Einbringen und die Vervielfältigung eines cDNA-Plasmids in Bakterien.

Dafür wurden pro Ansatz 70 µl kompetente *E. coli* XL1-blue Zellen, welche bei -80 °C gelagert wurden, auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde den Bakterien 5 µl eines Ligationsansatzes hinzugegeben und für 40 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem 45 Sekunden langen Hitzeschock bei 42°C und einer weiteren Inkubation für 2 Minuten auf Eis, wurden 400 µl steriles LB-Medium hinzugefügt. Im Anschluss wurde der Transformationsansatz bei 37 °C im Brutschüttler für 30 Minuten (bei Ampicillin-Resistenz) oder 1 Stunde (bei Kanamycin-Resistenz) geschüttelt und auf eine Ampicillin- bzw. Kanamycin-haltige LB-Agarplatte ausgestrichen. Die Platten inkubierten bei 37 °C im Brutschrank über Nacht.

Bei einer erfolgreichen Klonierung sollten einige Kolonien auf der Agarplatte gewachsen sein. Die Kontrollplatte sollte möglichst frei von Bakterienkolonien sein.

Kultivierung von Bakterien

Um größere Mengen des cDNA-Plasmids herzustellen, wurde nach der Transformation antibiotikahaltiges LB-Medium mit einzelnen Bakterienkolonien beimpft und für 12-16 Stunden bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Je nach gewünschter Ausbeute wurden 3 ml (Minikultur), 100 ml (Midikultur) oder 200 ml (Maxikultur) LB-Medium beimpft.

Isolation von DNA-Plasmiden aus Bakterien

Zur Isolation der cDNA-Plasmide aus den Bakterienkulturen wurden die Plasmid Präparation Kits des Herstellers Qiagen verwendet. Je nach Menge der angesetzten Bakterienkultur, wurde zwischen dem QIAprep Spin Miniprep Kit, dem QIAgen Plasmid Midi Kit und dem QIAgen Plasmid Maxi Kit unterschieden. Es wurde entsprechend des Herstellerprotokolls verfahren.

Die Bakterien wurden zunächst lysiert, um anschließend die Bindung der cDNA-Plasmide an eine Silikat-Membran durch Zentrifugation zu ermöglichen. Die Silikat-Membran befand sich in einem vom Hersteller gelieferten Reaktionsgefäß. Nach mehreren Reinigungsschritten konnte die Plasmid-DNA mit 50 µl bzw. 100-200 µl EB-Puffer aus der Membran gelöst werden.

Zur Kontrolle des Plasmids wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt und mittels Agarosegelelektrophorese ausgewertet. Anhand der Schnittstellen konnte die Größe des gesuchten Fragments berechnet werden. War der Verdau korrekt, wurde der erste Abschnitt des DNA-Plasmids sequenziert. Bestätigte die Sequenzierung den Erfolg der Umklonierung, wurde in einer Midi- bzw. Maxi-Präparation eine größere Menge des DNA-Plasmids hergestellt und das Plasmid in seiner vollen Länge sequenziert.

Aufbewahrung und Lagerung von Plasmiden

Alle DNA-Plasmide, die in EB-Puffer eluiert wurden, konnten bei 4 °C aufbewahrt werden. Wurde in H₂O eluiert, wurden sie bei -20 °C gelagert. Wenn möglich, wurden die Konzentrationen der Klone standardisiert auf 1 µg/µl eingestellt. Konzentration und Reinheit wurden stets mit dem Nanodrop bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm kontrolliert.

2.2.11 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA-Abschnitten oder -Plasmiden wurde von der Firma GATC nach dem Prinzip der Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Die genaue Nukleotidabfolge wird hierbei über Farbstoff-gekoppelte Didesoxynukleotide (ddNTPs) bestimmt. In mehreren PCRs wird die DNA-Matrize amplifiziert, wobei der Einbau eines ddNTPs zu einem basenspezifischen Kettenabbruch führt. Die einzelnen DNA-Fragmente werden anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Über einen Detektor können die unterschiedlichen Farbsignale der einzelnen Basen aufgezeichnet und auf diese Weise die Nukleotidsequenz der amplifizierten DNA bestimmt werden.

Zur Sequenzierung wurden die entsprechenden DNA-Abschnitte mit den dazugehörigen Primern in den angeforderten Konzentrationen versandt. Zur Gegenüberstellung und Analyse des Sequenzierungsergebnisses wurde das Programm Vector NTI des Herstellers Thermo Fisher Scientific verwendet.

Mit allen generierten DNA-Plasmiden wurde erst nach vollständiger Sequenzierung zur Kontrolle ihrer Richtigkeit weitergearbeitet. Die in Tabelle 11 aufgelisteten Primer wurden zur Sequenzierung der verwendeten HCN4 Konstrukte verwendet. Die amplifizierten Sequenzen der HCN4 Exons der vorgestellten Patientin wurden mit den in Tabelle 10 aufgelisteten Primern sequenziert.

2.2.12 *In vitro* Transkription

Um elektrophysiologische Messungen an *Xenopus laevis* Oozyten durchführen zu können, musste zunächst die DNA des zu untersuchenden Proteins in RNA umgeschrieben werden. Die RNA-Synthese erfolgte mittels *in vitro* Transkription. Dabei transkribiert eine DNA-abhängige RNA-Polymerase die gewünschte cDNA-Sequenz. Die cDNA-Sequenz befand sich hierfür stets in einem pGem-He-Vektor⁸². Dieser enthält stromaufwärts einen T7 Promotor, an den die T7-RNA-Polymerase spezifisch binden kann, um mit der Transkription zu starten.

Bei der Arbeit mit RNA wurde an einem RNA-Arbeitsplatz gearbeitet. Arbeitsfläche und verwendete Geräte wurden zuvor mit RNase Zap behandelt. Verbrauchsmaterialien waren stets steril.

Linearisierung

Zunächst musste die cDNA-Matrize linearisiert werden. Tabelle 27 ist der Ansatz für eine Linearisierung zu entnehmen.

Tabelle 27: Standardansatz einer Linearisierung

DNA-Plasmid in pGem-He	15 µg
Restriktionsenzym SphI	1 µl
Fast Digest Puffer (10x)	2 µl
H ₂ O (Nuklease-frei)	Ad 20 µl

Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37 °C restringiert und mit dem QIAGEN PCR *Purification* Kit nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Der nun linearisierte Vektor wurde in 25 µl H₂O eluiert und die Konzentration und Reinheit mittels Nanodrop bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt. Wenn möglich wurde die Konzentration für alle weiteren Schritte auf 200 ng/µl eingestellt.

In vitro Transkription

Ziel einer *in vitro* Transkription ist das Umschreiben eines linearisierten cDNA-Vektors in cRNA. Hierfür wurde mit dem Ambion mMESSAGE mMACHINE T7 *Transcription* Kit entsprechend des Protokolls des Herstellers gearbeitet. Der standardisierte Reaktionsansatz ist in Tabelle 28 aufgelistet. Nach einer Inkubation des Ansatzes für 1 Stunde bei 37 °C erfolgte die Fällung der cRNA über Nacht bei -20 °C mit 10 µl 10 M Ammoniumacetat.

Tabelle 28: Standardisierter Ansatz einer *in vitro* Transkription

Linearisierter DNA-Vektor	1 µg
NTP Cap (2x)	10 µl
Puffer (10x)	2 µl
T7 Promotor Enzym	2 µl
H ₂ O (Nuklease-frei)	Ad 20 µl

Aufreinigung und Elution

Nach der Fällung wurde der Ansatz auf Eis aufgetaut und für 15 Minuten bei 4 °C und 14.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, anschließend 20 µl 70 % Ethanol hinzugegeben und für weitere 15 Minuten bei 4 °C und 14.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Um das Ethanol vollständig zu entfernen, wurde bei geöffnetem Deckel des Reaktionsgefäßes bei 6.000 g für 1 Minute zentrifugiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass anschließend ein kleines weißes Pelett am Boden des Reaktionsgefäßes zu sehen war, bevor weiterverfahren wurde. Das RNA-Pelett wurde anschließend mit 20 µl RNase-freiem H₂O vorsichtig resuspendiert.

Die Konzentration und Reinheit der RNA wurden über den Nanodrop bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt und sofern möglich auf 1 µg/µl eingestellt. RNA wurde stets bei -80 °C gelagert.

2.2.13 RNA-Agarosegelelektrophorese

Bei Bedarf wurde zur Kontrolle der *in vitro* Transkription eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Zur Herstellung des Gels wurden 0,25 g Agarose mit 26,1 ml H₂O aufgeköcht. Anschließend wurden 3 ml 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS), 10-fach konzentrierter Laufpuffer, 0,9 ml 37 % Formaldehyd und 0,5 µl SYBR Green unter dem Abzug hinzugegeben. Der Ansatz wurde in eine Gelkammer gefüllt und benötigte etwa eine halbe Stunde zur Polymerisation. Währenddessen wurden 5 µl RNA mit 10 µl Premix auf Eis zusammengegeben. Als Marker wurden 3 µl 0,5-10.000 kb Marker mit 10 µl Premix eingesetzt. Sowohl RNA- als auch Marker-Ansatz wurden auf Eis angesetzt, 5-10 Minuten bei 65 °C im Heizblock inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nachdem 1 µl Ladepuffer hinzugegeben wurde, konnten die Ansätze auf das RNA-Gel aufgetragen werden. Die RNA wurde für 40 Minuten bei einer Spannung von 140 Volt aufgetrennt und im Anschluss unter UV-Licht in einer UV-Kammer beurteilt.

2.3 Zellbiologische Methoden

Zur rekombinanten Expressionsanalyse des HCN4 Kanals und der genetischen Variante wurden isolierte Zellen aus Ovarien des chinesischen Hamsters (*chinese hamster ovary cells*, CHO-Zellen) verwendet. Um möglichst keimarme Bedingungen zu schaffen und eine Kontamination zu verhindern, wurden Arbeiten mit CHO-Zellen unter einer Zellkulturbank durchgeführt. Alle verwendeten Medien und Lösungen wurden vor ihrer Verwendung auf 37 °C im Wasserbad erwärmt.

2.3.1 Kultivierung von CHO-Zellen

CHO-Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5 % in CHO-Kulturmedium (Tabelle 3) kultiviert. Täglich wurde die Konfluenz der Zellen und der pH des Mediums kontrolliert. Ein Wechsel des Kulturmediums wurde alle 2-3 Tage durchgeführt.

Um eine suffiziente Zellteilungsrate aufrechterhalten zu können, wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 90-100 % geteilt. Dafür wurde das Medium vorsichtig aus der Kulturflasche abgesaugt und die Zellen mit sterilem PBS vorsichtig gewaschen. Um anschließend die Zellen vom Flaschenboden zu lösen wurde für etwa 30 Sekunden eine Behandlung mit einfach konzentriertem Trypsin durchgeführt. Die Zellen konnten nun mit CHO-Zellmedium vom Boden der Flasche abgelöst und im gewünschten Verhältnis (meist 1:10, 1:20 oder 1:30) mit frischem Medium verdünnt und in eine neue Kulturflasche ausgesät werden.

Zur Durchführung zellbiologischer Experimente wurden die Zellen auf Deckgläschen in 6-*well*-Platten bzw. 3,5 cm-Deckgläschen in einer Dichte von 700.000 Zellen pro *well* oder Deckglas ausgesät.

2.3.2 Transfektion von CHO-Zellen

Vor jeder Transfektion wurde die Konzentration und Reinheit der Klone mit dem Nanodrop bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen und die Transfektionsvolumina an die entsprechende Konzentration angepasst. Da Expressionsniveaus miteinander verglichen wurden, konnte so sichergestellt werden, dass stets die gleiche Menge an DNA-Plasmiden eingesetzt wurde. Die am Vortag ausgesäten CHO-Zellen wiesen vor der Transfektion eine Konfluenz von 70-90 % auf.

Für jedes Deckglas bzw. *well* wurde ein einzelner Transfektionsansatz hergestellt. Als Transfektionsreagenz wurde jetPEI verwendet. In der verwendeten Transfektionsmethode werden die zu transfizierenden DNA-Plasmide in positiv geladene Komplexe verpackt. Diese interagieren und binden *via* Proteoglykane an die Plasmamembran der CHO-Zellen und werden von diesen endozytiert. jetPEI fungiert intrazellulär als pH-Puffer und verhindert den Abbau der DNA, die zur Transkription zum Nukleus transportiert wird.

Tabelle 29 listet einen standardisierten Transfektionsansatz entsprechend des Protokolls des Herstellers auf.

Tabelle 29: Standardprotokoll der verwendeten Ansätze für die Transfektion von CHO-Zellen auf einer 6-*well*-Platte/3,5 cm-Ø Deckglas

Menge DNA-Plasmid	2 ng (6- <i>well</i>) bzw. 3 ng (Deckglas)
NaCl 150 mM	100 µl
jetPEI	6 µl
NaCl 150 mM	100 µl

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde in einem Kontrollansatz ein *Green fluorescent protein* (GFP)-exprimierender Vektor transfiziert. Auf diese Weise konnte vor Beginn eines Experiments die Transfektionsrate unter einem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert werden.

Um eine toxische Schädigung der Zellen zu vermeiden, erfolgte 4 Stunden nach der Transfektion ein Wechsel des Kulturmediums. Nach 24 Stunden wurde mit den Experimenten begonnen.

2.3.3 Oberflächenexpressionsfärbung

Die Oberflächenexpressionsfärbung diente der selektiven Färbung und Quantifizierung der Oberflächenpopulation von HCN4 Membranproteinen. Die verwendeten Konstrukte beinhalteten hierfür ein extrazellulär gelegenes Hämagglutinin (HA)-tag im N-Terminus, welches spezifisch über einen monoklonalen HA-Antikörper markiert werden konnte⁸³. Zur Detektion des Primärantikörpers diente ein mit Meerrettichperoxidase (*Horseradish Peroxidase*, HRP) konjugierter Sekundärantikörper. Die Zugabe eines Luminol beinhaltenden Substrats, katalysierte anschließend eine Chemilumineszenzreaktion, die mit einem Luminometer quantifiziert werden konnte.

Die Oberflächenexpressionsfärbungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, erfolgten an CHO-Zellen. Die Zellen waren zuvor auf 3,5 cm-Deckgläschen ausgesät und transfiziert worden. Zunächst wurde das Zellmedium mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Zellen mit 1 ml kaltem 4 % Paraformaldehyd in phosphatgepufferter Salzlösung (*Phosphate buffered saline*, PBS) für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml einfach konzentriertem PBS drei Mal für 5 Minuten gewaschen und für eine Stunde mit 1 ml 10%igem Ziegerserum (*Normal Goat Serum*, NGS) in PBS blockiert. Nach einstündiger Inkubation des Primärantikörpers Anti-HA-tag (1 ml, Anti HA-tag F7 1:100 in PBS) wurden die Zellen drei Mal für 20 Minuten mit jeweils 2 ml PBS gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper inkubiert (1 ml, *Goat-Anti-Mouse* IgG-HRP, 1:5.000 in 10 % NGS in PBS).

Vor der Chemilumineszenzmessung wurden die Schälchen für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 2 ml PBS, das alle 15-20 Minuten gewechselt wurde, gewaschen. 1 ml der Chemilumineszenz-Reagenzien wurde auf die Zellen gegeben und die Lumineszenz nach 15, 30, 45 und 60 Sekunden mittels Luminometer quantifiziert.

Für die anschließende Auswertung wurden ausschließlich die entsprechenden Werte der Messungen nach 30 Sekunden verwendet. Die Kontrollschälchen mit leerem Vektor und GFP-Vektor dienten zur Bestimmung des Hintergrundsignals und als Transfektionskontrolle. Zur Analyse der Oberflächenexpressionsrate des Wild-Typs (WT) und der Variante im Heterotetramer war lediglich eines der beiden Konstrukte mit einem HA-tag konjugiert. Beispielsweise war zur Bestimmung des Oberflächensignals des WT im Heterotetramer WT/V759I, der WT mit einem HA-tag versehen (HCN4 WT-HA-ex in pEGFP-N1) und das Konstrukt der Variante ohne extrazelluläres HA-tag (HCN4 V759I in pEGFP-N1). Beide Konstrukte wurden zuvor in einem Mengenverhältnis von 1:1 transfiziert. Quantifiziert wurde in diesem Beispiel dann nur das Oberflächensignal des WT.

Die im Luminometer gemessenen Werte des Oberflächensignals wurden auf das Signal des WT normiert und der Mittelwert $\pm$ Standardfehler angegeben. Das Signifikanzniveau wurde mithilfe eines ungepaarten *Students T-Tests* bestimmt. P-Werte $<0,05$ wurden als signifikant gewertet.

2.4 Biochemische Methoden

Zur Beurteilung der Gesamtexpression des HCN4 WT und der Variante V759I wurden Lysate von CHO-Zellen hergestellt, die zuvor mit dem jeweiligen HCN4 Konstrukt transfiziert worden waren. Die exprimierten Proteine wurden mithilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und über das Western Blotting auf eine Membran übertragen. Durch eine Epitop-Antikörper-Reaktion konnte spezifisch das HCN4 Protein nachgewiesen werden.

2.4.1 Herstellung von Zelllysaten

24 Stunden nach der Transfektion wurden CHO- Zelllysate hergestellt. Das Zellmedium wurde dafür mit einer Vakuumpumpe vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 2 ml einfach konzentriertem PBS gewaschen. Mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen vorsichtig geerntet und die Zellsuspension aus drei 6-wells in ein 10 ml Falcon überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass möglichst alle Zellen abgetragen wurden, um pro Konstrukt eine annähernd gleiche Menge an Zellen zu verwenden. Die Suspension wurde für 2 Minuten bei 1.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Zellpelett mit 500 µl Lyse-Puffer resuspendiert und auf Eis mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (2 Durchgänge à 12 bzw. 8 Ultraschallstöße). Um Zellkerne und grobe Zelltrümmer zu entfernen, wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 1.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand entsprach nun dem Lysat und wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit Laemmli-Puffer und Dithiothreitol (DTT) versetzt und für 5 Minuten bei 37 °C denaturiert.

Die Zelllysate wurden weiterführend auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen oder bei -20 °C gelagert.

2.4.2 Herstellung von Polyacrylamidgelen

Zur Herstellung eines Polyacrylamidgels wurden die notwendigen Chemikalien für ein 10%iges Trenngel in einem Falcon zusammengeführt (Tabelle 2) und zwischen zwei Spacerplatten aus Glas bis etwa 1,5 cm unter den Rand gegossen. Vorsichtig wurde das Gel mit 5 bis 10 ml H₂O bedeckt. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde das Wasser mit einem Whatman-Papier vorsichtig entfernt. Die Chemikalien für das Sammelgel (Tabelle 2) wurden miteinander versetzt und auf das Trenngel gegeben. Mithilfe eines Kamms wurden Geltaschen für die späteren Proben ausgespart. Nach der Polymerisation des Sammelgels konnten die gegossenen Gele zwischen den Spacerplatten in feuchte Tücher eingepackt und im Kühlschrank für maximal 2 Wochen gelagert werden.

2.4.3 Western Blotting

Zur Beladung des Polyacrylamidgels wurde der Kamm entnommen und 10 µl der Zelllysate bzw. ein Größenmarker zur späteren Identifizierung der Proteine in die Aussparungen gefüllt. Anschließend wurde das Gel vertikal in die mit einfach konzentriertem Laufpuffer (Tabelle 2) befüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Eine Spannung von 80 Volt wurde für 10 Minuten

angelegt. Wurde das Auftrennen der Proben im Sammelgel beobachtet, konnte auf eine Spannung von 120 V für 80 Minuten gewechselt werden.

Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF-Membran) transferiert. Hierfür wurde zunächst eine der Größe des Gels entsprechende PVDF-Membran ausgeschnitten, in 96-100 % Ethanol aktiviert und in TBS-T inkubiert. Vorsichtig wurde das Polyacrylamid-Gel von den Glasplatten gelöst und auf die PVDF-Membran überführt und von außen mit Whatman-Papier und zwei Schwämmen bedeckt. Der Aufbau wurde nun in einer Kassette fixiert und in eine Blot-Kammer eingesetzt. Die Blot-Kammer war mit einfach konzentriertem Transferpuffer (Tabelle 2) und einem Kühlakku befüllt. Das Blotting, d.h. der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran, erfolgte bei einer Spannung von 100 V für 100 Minuten.

Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurde vor der Proteindetektion die Membran für eine Stunde in 5 % Laktat in TBS-T blockiert. Die Primärantikörper Anti-HCN4 und Anti- β -Aktin wurden in einer Konzentration von 1:1000 bzw. 1:5000 in 2 % Laktat-TBS-T verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C auf der Membran inkubiert. Danach wurde die Membran für 1 Stunde mit TBS-T gewaschen, wobei die Lösung alle 15 bis 20 Minuten gewechselt wurde. Der Sekundärantikörper (*Goat Anti-rabbit*-HRP, 1:15000 in 5 % Laktat-TBS-T) wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben und anschließend mit TBS-T für eine Stunde von der Membran gewaschen. TBS-T wurde alle 15 bis 20 Minuten gewechselt.

Zur Detektion wurden die Substrate des *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* in einem Verhältnis von 1:1 gemischt, auf die Membran gegeben und diese zwischen zwei Folien verpackt. Die Belichtung und Aufnahme erfolgte in der Fusion FX Kammer. Je nach Signalstärke wurden Belichtungszeiten zwischen 5 Sekunden und 4 Minuten gewählt. Die Aufnahmen wurden als tiff-Datei gespeichert und mit der Software ImageJ bearbeitet.

Die Bandenintensität wurde anschließend mit Hilfe von ImageJ quantifiziert. Hierfür wurde die Bande des WT und der Variante zunächst auf die jeweilige β -Aktin-Bande desselben Zelllysats normiert. Um WT und Variante miteinander vergleichen zu können, wurden die Werte anschließend auf den WT normiert. Angegeben wird der Mittelwert $\pm$ Standardfehler. Das Signifikanzniveau wurde mithilfe eines ungepaarten *Students T-Tests* bestimmt und ein P-Wert $<0,05$ als signifikant gewertet.

2.5 Elektrophysiologie

Zur Charakterisierung der biophysikalischen Eigenschaften des HCN4 WT und weiterer HCN4 Konstrukte wurde die Methode der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme angewandt. Als heterologes Expressionssystem dienten Oozyten des Krallenfroschs (*Xenopus laevis*) der Firma EcoCyte Bioscience. Die bereits defollikulierten Oozyten befanden sich im Entwicklungsstadium V-VI. Vor Injektion der cRNA wurde darauf geachtet, dass sich der helle und dunkle Pol der Oozyte deutlich voneinander abgrenzten.

Für die elektrophysiologischen Experimente erfolgte anschließend die Injektion von cRNA in die Oozyten. Zuvor musste die cDNA der zu untersuchenden Konstrukte in cRNA umgeschrieben werden (2.2.12). 2-3 Tage nach der Injektion wurde mit den elektrophysiologischen Messungen begonnen.

2.5.1 Injektion der cRNA in *Xenopus* Oozyten

Um HCN4 Konstrukte heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten zu exprimieren und elektrophysiologische Messungen durchzuführen, wurde cRNA in einzelne Oozyten injiziert.

Während die bei -80 °C aufbewahrte cRNA auf Eis auftaute, wurden die zur Injektion benötigten Glaskapillaren (3,5 nl *Glass replacement*, World Precision Instruments, Sarasota, USA) mit einem Vertikal-Elektrodenziehgerät ausgezogen. Die Spitzen der Glaskapillaren wurden unter einem Mikroskop gekürzt und mit einem Gemisch aus schwerem und leichtem Mineralöl in einem Verhältnis von 1:1 befüllt. Mithilfe eines Pastille-Injektors konnte stets das gleiche Volumen an cRNA pro Oozyte injiziert werden. Hierfür wurde die Glaskapillare auf dem Kolben des Injektors fixiert. Die aufgetaute cRNA wurde in den Deckel eines sterilen Reaktionsgefäßes pipettiert und aufgesogen, indem sich der Kolben um das entsprechende Volumen in den Injektor zurückzog. Für die anschließende Injektion lagen die Oozyten in einem mit Barth+-Medium bedeckten und mit Noppen überzogenen Kunststoffdeckel. Unter Sicht durch ein Mikroskop wurde die Glaskapillare auf dem Kolben des Injektors vorsichtig in jede Oozyte eingestochen und das gewünschte Volumen an cRNA appliziert. Pro Oozyte wurde eine Menge von 10-20 ng cRNA injiziert.

Nach der Injektion wurde jede Oozyte in 1 ml Barth+-Medium mit Antibiotika/Antimykotika-Lösung in einer *well* einer 24-*well*-Platte bei 18 °C gelagert. Elektrophysiologische Messungen erfolgten nach einer Inkubation von 2 bis 8 Tagen.

2.5.2 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Zur elektrophysiologischen Charakterisierung von HCN4 Konstrukten wurde die Methode der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an *Xenopus* Oozyten angewandt (Abb. 8). Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass zwei Elektroden, eine Potenzialelektrode und eine Stromelektrode, in die mit cRNA injizierte und nun HCN4 Kanäle an der Oberfläche exprimierende Oozyte eingestochen werden. Eine Potenzialelektrode und eine Referenzelektrode in der Umgebungslösung der Messkammer bestimmen das aktuelle Membranpotenzial der Oozyte. Mithilfe eines Verstärkers kann über die Stromelektrode eine gewisse Menge an Strom in die Oozyte appliziert werden. Dadurch wird das Membranpotenzial der Oozyte verändert bis ein vorgegebenes Membranpotenzial erreicht wird. HCN4 Kanäle gehören zur Gruppe der spannungsabhängigen Ionenkanäle. Die applizierte Menge an Strom, die notwendig ist, um ein bestimmtes Sollpotenzial zu erreichen, entspricht somit umgekehrt der negativen Strommenge, die bei diesem Membranpotenzial durch HCN4 Kanäle und andere (endogen exprimierte), ggf. offene Kanäle in der Membran fließt. Auf diese Weise erlaubt die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme einen Rückschluss auf den Ganzzellstrom der Oozyte bei einem bestimmten Membranpotenzial.

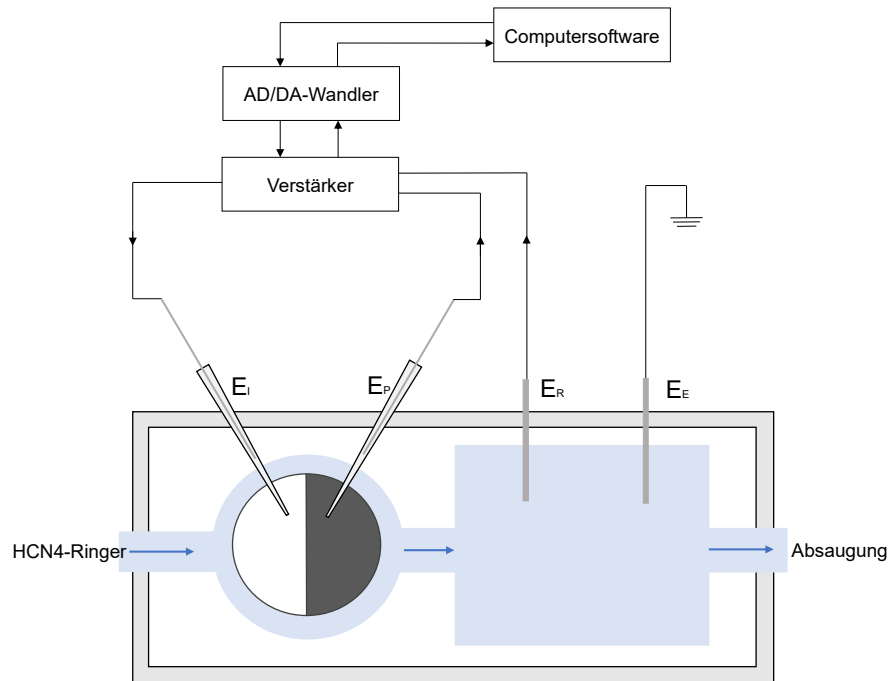


Abb. 8: Schematische Darstellung des Messstandes der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme.

Die Oozyte wurde zunächst in der Messkammer positioniert und die Potenzial- und Stromelektrode (E_P bzw. E_I) vorsichtig in die Oozyten gestochen. Anschließend wurde ein kontinuierlicher HCN4 Ringer-Zufluss hergestellt und das Spannungsprotokoll gestartet. Während der Messung wurden über den TURBO TEC-03X Verstärker, der an einen LIH8+8 AD/DA-Wandler gekoppelt war, die applizierten Strommengen und Membranpotenziale kontinuierlich aufgezeichnet und mit der Software PatchMaster v2x65 gespeichert. Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur; E_R : Referenzelektrode, E_E : Erdelektrode.

Zur Charakterisierung des Spannungsverhaltens der HCN4 Konstrukte wurde vor der Messung ein Spannungsprotokoll festgelegt, das mithilfe der Patchmaster v2x65 Software von HEKA durchlaufen wurde. Da das Messsystem anfällig für externe Störungen wie beispielsweise Vibrationen ist, befand sich der Messstand auf einem schwingungsgedämpften Tisch. Die Oozyte wurde in einer kleinen Vertiefung der Messkammer platziert und über ein Mikroskop bzw. eine Kamera vergrößert dargestellt. Ein Mehrwegeventil ermöglichte über einen kleinen Schlauch an der linken Seite der Kammer die Umspülung der Oozyte mit HCN4-Ringerlösung während der Messung. Auf der rechten Seite der Messkammer wurde die Lösung wieder abgesaugt. Somit war ein kontinuierlicher Fluss hergestellt, der ein Überlaufen der Messkammer vermied. Seitlich der Messkammer befanden sich zwei Mikromanipulatoren, die zur Fixierung und kontrollierten Bewegung der Messelektroden dienten. Die aus Silberdraht bestehenden chlorierten Elektroden wurden in eine mit 3 M KCl-Lösung befüllte Glaskapillare geschoben. Die Glaskapillaren wurden mit dem Vertikal-Elektrodenziehgerät aus Borosilikat-Glaskapillaren (GB150T-10, Science Products, Hofheim, Deutschland) gezogen. Ein Widerstand zwischen 0,5-1,5 MOhm wurde eingestellt und dieser zwischen den Messungen regelmäßig kontrolliert.

Nach dem Einführen der Messelektroden in die Oozyte wurde der Ringerfluss gestartet und das Messprotokoll begonnen. Dabei wurden Membranpotenzial und applizierte Strommenge mit der Software PatchMAster v2x65 aufgezeichnet und anschließend ausgewertet.

2.5.3 Messprotokoll zur Bestimmung der Aktivierungskurve

Zur Ermittlung der Aktivierungskurve und der Aktivierungszeitkonstanten wurde ein standardisiertes Messprotokoll durchgeführt (Abb. 9).

Die Oozyte wurde auf ein Haltepotenzial von -20 mV geklemmt. Von hier ausgehend erfolgte ein Potentialsprung auf Spannungen zwischen -150 und -20 mV für 5 Sekunden (variable Kommandospannung), der pro Messzyklus um 10 mV erhöht wurde. Anschließend wurde zur spezifischen Aktivierung des Stroms bei maximaler Hyperpolarisation eine Spannung von -150 mV für 2 Sekunden appliziert. Danach wurde auf das Haltepotenzial zurückgekehrt.

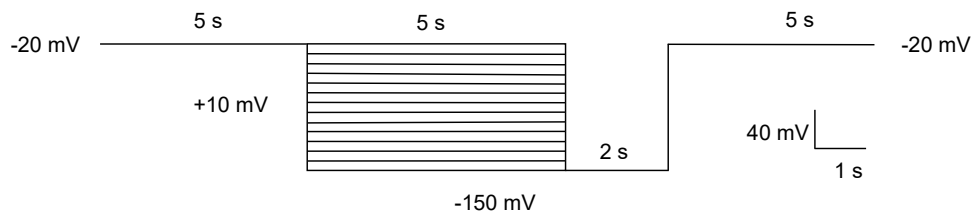


Abb. 9: Angewandtes Spannungsprotokoll zur Auswertung der Aktivierungskurve des HCN4 Kanals.

Ausgehend von einem Haltepotenzials bei -20 mV erfolgte ein Sprung auf Spannungen zwischen -150 und -20 mV für 5 s (variable Kommandospannung), der pro Zyklus um 10 mV erhöht wurde. Zur spezifischen Aktivierung des Stroms bei maximaler Hyperpolarisation wurde anschließend eine Spannung von -150 mV für 2 Sekunden appliziert. Danach wurde auf das Haltepotenzial zurückgekehrt. Maßstab: y-Achse 40 mV, x-Achse: 1 s; mV: Millivolt; s: Sekunde.

2.5.4 Messprotokolle zur Bestimmung von I_{Max} während einer Behandlung mit IGF-1

Zur Messung der Stromamplitude bei maximaler Kanalaktivierung (I_{Max}) wurde die Oozyte für 7 Sekunden auf eine Spannung von -150 mV geklemmt (Abb. 10, Abb. 11). Vor und nach diesem Spannungssprung betrug das applizierte Haltepotenzial jeweils -20 mV.

Um die Entwicklung von I_{Max} während einer kurzfristigen Inkubation mit IGF-1 wiederholt aufzuzeichnen, wurde der oben genannte Messzyklus 20 Mal durchlaufen, was einem Zeitraum von etwa 5 Minuten entsprach (Abb. 10, schwarze Spur). Unmittelbar zuvor wurden 500 μl 50 nM IGF-1 in HCN4-Ringer in die Messkammer gegeben. 500 μl entsprachen in etwa dem Volumen der Messkammer. Damit sichergestellt wurde, dass das Wachstumshormon nicht aus der Messkammer gewaschen wurde, war die Absaugung während der Messung pausiert.

In einer weiteren Untersuchung wurde die Zeit, in der die Oozyte auf das Haltepotenzial geklemmt wurde, verlängert (Abb. 10, schwarze + rote Spur). Auch dieser Messzyklus wurde während einer Inkubation mit IGF-1 20 Mal durchlaufen, um I_{Max} während einer ca. 10 minütigen Behandlung zu analysieren.



Abb. 10: Spannungsprotokoll zur Charakterisierung der Stromamplitude bei maximaler Kanalaktivierung während einer Inkubation mit IGF-1.

Zur Messung der Stromamplitude bei maximaler Kanalaktivierung während einer Inkubation mit IGF-1 wurde die Oozyte ausgehend von einem Haltepotenzial bei -20 mV für 7 s auf eine maximal hyperpolarisierende Spannung von -150 mV geklemmt und anschließend auf das Haltepotenzial zurückgekehrt (schwarze Spur). Zur Verlängerung des untersuchten Zeitraumes erfolgte eine Modifikation des Protokolls, indem die Applikationsdauer des Haltepotenzials nach maximaler Hyperpolarisation um 17 s (rote Spur) verlängert wurde. Ein solcher Messzyklus wurde insgesamt 20 Mal durchlaufen, sodass eine Inkubationszeit von etwa 5 Minuten (schwarze Spur) bzw. 10 Minuten (schwarze + rote Spur) untersucht wurde. Maßstab: y-Achse: 20 mV, x-Achse: 1 s; mV: Millivolt, s: Sekunde.

Zur Ermittlung von I_{Max} vor und nach einer 30-minütigen Inkubation mit IGF-1 wurde die Stromamplitude bei einer einmaligen, maximalen Hyperpolarisation bei -150 mV aufgezeichnet (Abb. 11). Die erste Messung erfolgte vor der Behandlung der Oozyte mit IGF-1. Anschließend wurde die Oozyte mithilfe einer Pipette vorsichtig aus der Messkammer entnommen und für 30 Minuten in 1 ml HCN4-Ringerlösung mit 50 nM IGF-1 inkubiert. Dasselbe Messprotokoll wurde nach der Behandlung erneut durchgeführt. So konnte I_{Max} einer einzelnen HCN4 exprimierenden Oozyte vor und nach einer Behandlung mit IGF-1 verglichen werden.

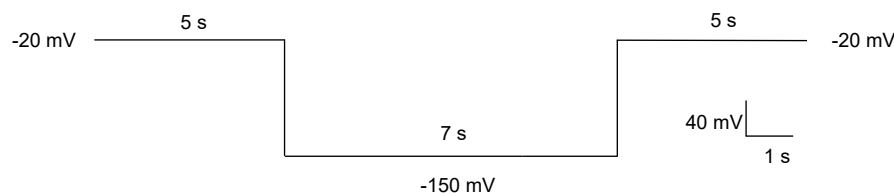


Abb. 11: Spannungsprotokoll zur Bestimmung der Stromamplitude bei maximaler Kanalaktivierung.

Zur Messung der Stromamplitude bei maximaler Kanalaktivierung vor und nach einer 30-minütigen Inkubation der Oozyte mit IGF-1 wurde die Oozyte für 7 Sekunden auf eine Spannung von -150 mV geklemmt. Vor und nach diesem Spannungssprung betrug das applizierte Haltepotenzial jeweils -20 mV. Maßstab: y-Achse: 40 mV, x-Achse: 1 s; mV: Millivolt, s: Sekunde.

2.5.5 Auswertung der Aktivierungskurve und der Stromamplitude I_{Max}

Um das spannungsabhängige Schaltverhalten der HCN4 Konstrukte beurteilen zu können, wurden die aufgezeichneten Stromkurven nach durchlaufenem Messprotokoll (erläutert in 2.4.3.1) ausgewertet und als Aktivierungskurve, auch bekannt als Strom-Spannungs-Kennlinie, dargestellt.

Ausgewertet wurde die Stromantwort während des Spannungssprungs auf -150 mV, ausgehend von der variablen Kommandospannung zwischen -150 und -20 mV bzw. -50 mV. Die initial gemessene Stromantwort I , unmittelbar nach Beginn des Spannungssprungs auf -150 mV, wurde auf den maximal gemessenen Strom I_{Max} bei -150 mV normiert und graphisch als Funktion der vorangegangenen Kommandospannung zwischen -150 und -20 mV aufgetragen. Die Normierung der Stromamplitude unmittelbar nach Applikation der variablen Spannung auf die maximale Stromamplitude (I/I_{Max}) sowie die anschließende Anpassung der Werte an eine modifizierte Boltzmann-Funktion (Gleichung 1) erfolgte mit den Softwareprogrammen Microsoft Excel bzw. OriginPro. Die Spannung bei halbmaximaler Kanalaktivierung $V_{1/2}$ und der Steigungsfaktor konnten der dargestellten Kurve aus OriginPro entnommen werden.

Zur Auswertung der Aktivierungskurve der HCN4 Konstrukte (HCN4 S14A bzw. -D, HCN4 S99-102A bzw. -D, HCN4 S139A bzw. -D) wurden Messungen mit einer Stromgröße zwischen 5 und 15,5 μA berücksichtigt. Dies galt nicht für den HCN4 WT ohne bzw. nach einer IGF-1 Behandlung und für die Konstrukte HCN4 S14-99-102-139A und HCN4 S14-99-102-139D. Die Aktivierungskurve für HCN4 S14-99-102-139A und HCN4 S14-99-102-139D umfasst ausschließlich Kommandospannungen zwischen -150 und -50 mV.

$$\frac{I}{I_{\text{Max}}} = \frac{\frac{I}{I_{\text{Max}}}}{\left(1 + e^{\left(\frac{z\delta F(V-V_{1/2})}{RT}\right)}\right)}$$

Gleichung 1: Modifizierte Boltzmannfunktion

Die maximale Stromamplitude I_{Max} wurde bei maximaler Hyperpolarisation während einer applizierten Spannung von -150 mV für 7 Sekunden gemessen und um den Leckstrom korrigiert, der während des Haltepotenzials von -20 mV gemessen wurde. Für die Auswertung der maximalen Stromamplitude während 5- bzw. 10-minütiger Inkubation mit IGF-1 wurde I_{Max} des jeweiligen Messzyklus ($I_{\text{Max}(X)}$) auf I_{Max} der ersten Messung normiert ($\text{rel. } I_{\text{Max}} = I_{\text{Max}(X)}/I_{\text{Max}(1)}$) und im Programm OriginPro grafisch dargestellt. I_{Max} nach 30 Minuten IGF-1 Behandlung wurde auf I_{Max} vor IGF-1 normiert. Die Boxplot Darstellung wurde in OriginPro generiert.

2.5.6 Auswertung der Zeitkonstante τ_{Akt}

Zur Auswertung der Öffnungsgeschwindigkeit der HCN4 Kanalkonstrukte wurde die Zeitkonstante der spannungsabhängigen Kanalaktivierung τ (τ_{Akt}) bestimmt. τ_{Akt} beschreibt die Zeit, bei der 66% des maximalen Stroms bei einer gewissen Spannung erreicht sind. Zur Berechnung von τ_{Akt} wurde die initiale Phase der Stromantwort während des Spannungssprungs auf Potenziale zwischen -150 und -100 mV mithilfe der FitMaster Software ausgewertet und an eine einfach-exponentielle Funktion angepasst. Anschließend wurden die Werte in Microsoft Excel ausgewertet und im Programm OriginPro logarithmisch dargestellt. Ausschließlich Messungen, die auch in die Bestimmung der Aktivierungskurve einfließen, wurden ausgewertet.

2.5.7 Statistik

Die elektrophysiologischen Ergebnisse dieser Arbeit beinhalten die Angabe des Mittelwertes von $V_{1/2}$, I_{Max} und τ_{Akt} mit Standardfehler. Das Signifikanzniveau wurde mithilfe eines *Students T-Tests* bestimmt. In Abhängigkeit des Versuchsaufbaus wurde ein gepaarter oder ungepaarter *Students T-Test* durchgeführt. P-Werte $<0,05$ wurden als signifikant gewertet.

2.6 Formelle Voraussetzungen

Von der in dieser Arbeit vorgestellten Indexpatientin liegt eine Einverständniserklärung vor. Für eine molekulargenetische Untersuchung des HCN4 Gens sowie die weitere experimentelle Analyse liegt ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vor (Studennummer: 4869)⁸⁴.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung und zellbiologische Charakterisierung der Variante HCN4 V759I

Der Schrittmacherstrom I_f spielt eine zentrale Rolle in der spontanen diastolischen Depolarisation des Sinusknotens⁸⁵. Eine veränderte Funktion von I_f kann Ursache kardialer Rhythmusstörungen sein. Mutationen des HCN4 Gens werden mit veränderten Eigenschaften des Ionenkanals in Verbindung gebracht und sind mit Erkrankungen assoziiert, die auf einer fehlerhaften Funktion des Sinusknotens beruhen⁶⁴.

Im folgenden Kapitel wird die Identifizierung der HCN4 Variante V759I bei einer Patientin mit symptomatischer Sinusknotendysfunktion vorgestellt. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag dabei auf molekulargenetischen und zellbiologischen Untersuchungen.

Die Ergebnisse entstanden in Zusammenarbeit mit Dr. Lukas Clasen aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, der die kardiologische Untersuchung durchführte, sowie Dr. Nadine Erlenhardt aus dem Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie der Universität Düsseldorf. Teile der aufgeführten Analysen wurden bereits veröffentlicht und werden in der folgenden Darstellung in Anlehnung an diese Publikation dargestellt⁸⁴.

3.1.1 Fallvorstellung einer Patientin mit symptomatischer Sinusbradykardie

In der kardiologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Düsseldorf stellte sich eine 49-jährige weibliche Patientin mit wiederkehrenden Schwindelanfällen und Übelkeit vor⁸⁴. Im aufgezeichneten 12-Kanal-Elektrokardiogramm (EKG) fiel eine bradykarde Herzfrequenz mit 37 Schlägen pro Minute (*beats per minute*, bpm) auf (Normbereich: 49-98 bpm, 2 % - 98 %⁸⁶) bei ansonsten unauffälligen Zeitintervallen (Abb. 12, A)⁸⁴. Während einer 24-Stunden-EKG-Aufzeichnung lag die Herzfrequenz mit Werten zwischen 27 und 117 bpm ebenfalls in einem niedrigen Bereich⁸⁴. In einer Belastungs-EKG-Untersuchung betrug die gemessene Herzfrequenz der Patientin während maximaler Belastung bei 225 Watt 146 bpm (Abb. 12, B)⁸⁴. 146 bpm liegen unterhalb des altersentsprechenden und geschlechtsadaptierten Normbereichs der Patientin⁸⁷. Normal konfigurierte P-Wellen, QRS-Komplexe und T-Wellen sowohl im Ruhe-EKG als auch im Belastungs-EKG ergaben keine Hinweise auf kardiale Depolarisations- oder Repolarisationsstörungen⁸⁴. Eine extern durchgeführte echokardiographische Untersuchung schloss Wandbewegungsstörungen oder eine Einschränkung der linksventrikulären systolischen Pumpfunktion aus⁸⁴. Im Rahmen eines Blutbildes und der Bestimmung relevanter biochemischer Laborparameter wurden metabolische Ursachen ausgeschlossen⁸⁴.

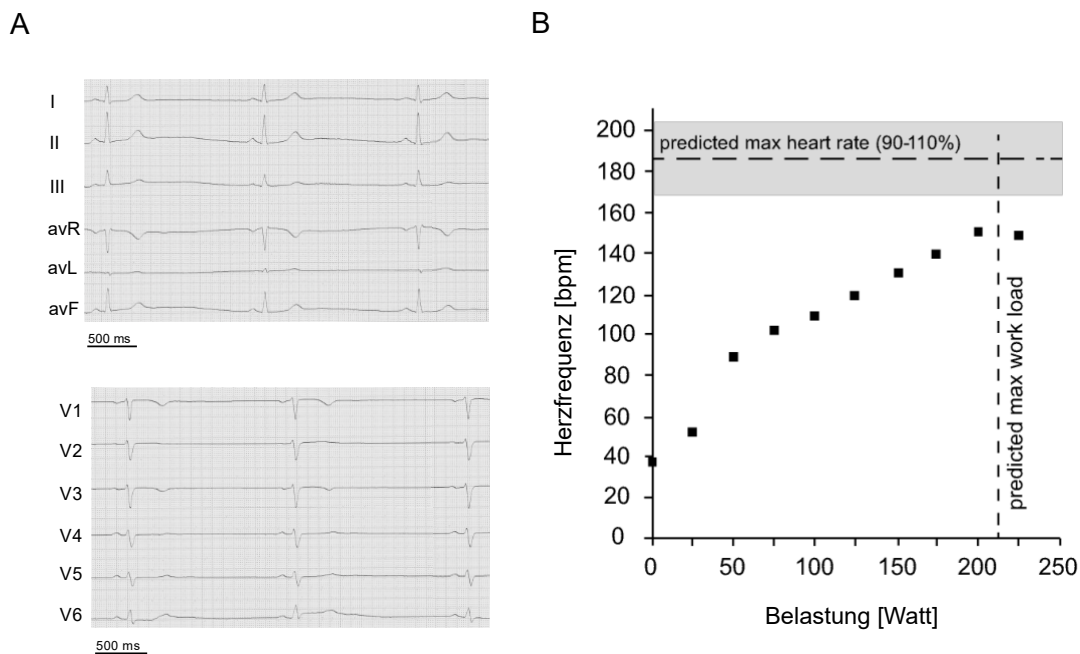


Abb. 12: EKG-Aufzeichnungen der 49-jährigen Patientin mit rezidivierenden Schwindelattacken.

A: Abschnitt aus der 12-Kanal-EKG-Ableitung der Patientin mit einer Herzfrequenz von 37 bpm bei ansonsten unauffälligen Zeitintervallen. PR-Intervall: 140 ms, QRS-Komplex: 100 ms, QT-Zeit: 440 ms (QTc: 348 ms), Skalierung: 500 ms; **B:** Auswertung des Belastungs-EKGs. Bei maximaler Belastung bei 225 Watt bleibt die Herzfrequenz mit 146 bpm unter der alters- und geschlechtsnormierten maximalen Herzfrequenz (grau markierter Bereich); ms: Millisekunde, bpm: *beats per minutes*. Daten und Abbildungen erstellt von Dr. L. Clasen; Abb. A (unverändert) + B (modifiziert) übernommen aus Erlenhardt *et al.* und reproduziert mit der freundlichen Genehmigung des Verlages.⁸⁴

Angeichts der symptomatischen Sinusbradykardie und des insuffizienten Herzfrequenzanstiegs bei Belastung wurde die Diagnose einer symptomatischen Sinusknotendysfunktion gestellt⁸⁴. Als Therapie erfolgte die Implantation eines Zwei-Kammer-Schrittmachers, die zu einer deutlichen Symptomreduktion führte⁸⁴. Da der Mutter der vorgestellten Indexpatientin aufgrund wiederkehrender Palpitationen und symptomatischer Sinusknotenpausen ebenfalls ein Herzschrittmacher implantiert worden war, lag die Vermutung nahe, dass es sich um eine familiäre Form der Sinusknotendysfunktion handelte⁸⁴.

3.1.2 Identifizierung der Missense-Mutation V759I im HCN4 Protein

Die auffällige Familienanamnese des vorgestellten Indexfalls wurde zum Anlass genommen, das HCN4 Gen der Patientin auf Mutationen molekulargenetisch zu untersuchen. Dabei konnte die monoallelische Variante HCN4 V759I identifiziert werden⁸⁴.

Um das HCN4 Gen im Rahmen einer Sequenzierung auf Mutationen untersuchen zu können, musste zunächst die genomische DNA (gDNA) aus dem Blut der Patientin gewonnen werden. Mithilfe des QIAgen *Blood Purification* Kit wurde gDNA aus den zellulären Blutbestandteilen des Vollbluts isoliert.

Zur Sequenzierung des HCN4 Gens nach der Sanger Methode, mussten die kodierenden Sequenzen aus der nun vorliegenden gDNA vervielfältigt werden. Im Allgemeinen werden Gene in kodierende, sogenannte Exons, und nicht-kodierende Abschnitte, sogenannte Introns, unterteilt. Abb. 13, A zeigt die Struktur von Introns und Exons des HCN4 Gens. Dieses umfasst insgesamt acht Exons, die jeweils für einen gewissen Bereich des Ionenkanalproteins kodieren. Dazwischen befinden sich Introns unterschiedlicher Größe.

Zur Amplifikation eines Exons wurden zwei Primer generiert, die spezifisch am Ende des davor liegenden bzw. am Anfang des darauffolgenden Introns banden und so das Exon an beiden Seiten flankierten. Im Rahmen einer PCR konnte dann die vollständige Sequenz eines Exons vervielfältigt werden. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 10 aufgelistet. Ein Großteil wurde in Anlehnung an eine bereits veröffentlichte molekulargenetische Analyse des HCN4 Gens erstellt⁶⁵.

Ein hoher Anteil von Guanin und Cytosin in der HCN Basensequenz kann eine PCR erschweren. Daher wurde zur Amplifikation einiger Abschnitte ein höherer Anteil an GC-Puffer bzw. DMSO verwendet. Aufgrund seiner Größe wurde Exon 8 in fünf (8-1, 8-2, 8-3, 8-4, 8-5) und Exon 1 in drei (1-1, 1-2-1, 1-2-2) Abschnitte unterteilt. Da sich mehrere Versuche zur Amplifikation von Exon 1 und Exon 7 als fehleranfällig erwiesen, mussten für Exon 1 und Exon 7 zusätzliche Primer generiert werden.

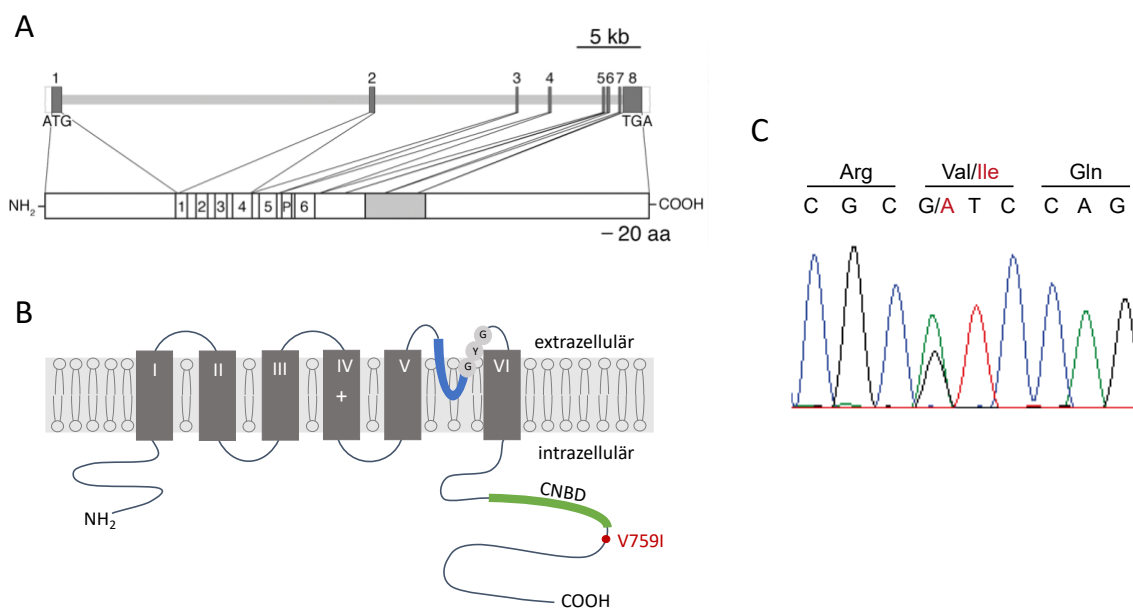


Abb. 13: Die identifizierte Mutation in Exon 8 des HCN4 Gens führt zu einem Aminosäureaustausch von Valin nach Isoleucin an Position 759.

A: Schematische Abbildung des humanen HCN4 Gens mit Darstellung von Exons und Introns. Insgesamt acht Exons (dunkelgrau) kodieren für das Protein. Die nicht-kodierenden Bereiche (Introns) befinden sich zwischen den jeweiligen Exons, kb: Kilobase, aa: *aminoacid*, Abb. mit freundlicher Genehmigung des Verlages unverändert übernommen aus Schulze-Bahr *et al.*⁶⁵ **B:** Struktur einer HCN4 Untereinheit sowie Lokalisation der identifizierten Variante. V759I befindet sich im C-Terminus hinter der Bindestelle für zyklische Nukleotide (CNBD), Abb. in Anlehnung an Biel *et al.*⁹ **C:** Ausschnitt des Chromatogramms der HCN4 Sequenz der Patientin. Die identifizierte Missense-Mutation befindet sich an Position c.2275G>A und führt im HCN4 Protein zu einem Aminosäureaustausch von Valin759 mit Isoleucin, A: Adenin, G: Guanin, C: Cytosin, T: Thymin, Val: Valin, Ile: Isoleucin, Arg: Arginin, Gln: Glutamin, Abb. mit freundlicher Genehmigung des Verlages unverändert übernommen aus Erlenhardt *et al.*⁸⁴

Die gewonnenen cDNA-Abschnitte der acht Exons wurden aufgereinigt und dienten als Ausgangsmaterial für die Sequenzierung nach der Sanger Methode. Diese wurde von der Firma GATC Biotech durchgeführt. Mithilfe der VectorNTI Software wurden die erhaltenen Sequenzen der Gensequenz des humanen HCN4 Wild-Typ gegenübergestellt.

Die Analyse identifizierte die monoallelische Missense-Mutation c.2275G>A auf Exon 8 des HCN4 Gens der Indexpatientin⁸⁴. Diese führt zu einem Basenaustausch von Guanin mit Adenin und befindet sich im C-Terminus des HCN4 Proteins, hinter der CNBD-Region⁸⁴. Im translatierten Protein resultiert daraus ein Austausch der Aminosäure Valin mit Isoleucin an Position 759 (Abb. 13, B+C)⁸⁴.

3.1.3 Einfluss von V759I auf die Expression des HCN4 Kanals in CHO-Zellen

HCN4 V759I war bereits als seltene Variante des HCN4 Kanals beschrieben und in genetischen Analysen in Verbindung mit Fällen des plötzlichen Kindstodes und des plötzlichen, unerwarteten Todes bei sogenannter maligner Epilepsie gebracht worden^{84, 88, 89}. Da Mutationen sowohl einen Einfluss auf die Funktionalität eines Ionenkanals ausüben können, als auch dessen Expressionsmuster verändern können, erfolgte zunächst eine Untersuchung der Oberflächen- und Gesamtexpression der HCN4 Variante in CHO-Zellen⁶⁴.

Die Oberflächenexpression von V759I ist in CHO-Zellen vermindert

Zur Analyse der Oberflächenexpression wurde die Mutation V759I in ein HCN4-Plasmid eingefügt. Das Konstrukt des HCN4 Wild-Typ (WT) und der Variante (V759I) war zwischen den Aminosäuren an Position 362 und 363 mit einem extrazellulär lokalisierten HA-Epitop (HA-tag) konjugiert⁸³. Die HCN4 Konstrukte wurden heterolog in CHO-Zellen exprimiert. Um Störungen der Expressionsrate durch die Verwendung unterschiedlicher Vektoren zu vermeiden, befanden sich die verwendeten Konstrukte in demselben Vektor (pEGFP-N1). Mit einem monoklonalen Anti-HA Antikörper wurde die Oberflächenpopulation der Konstrukte selektiv (d.h. ohne Zellpermeabilisierung) markiert. Durch eine Chemilumineszenzreaktion des verwendeten Sekundärantikörpers konnten anschließend die an der Zelloberfläche lokalisierten HCN4 Kanäle mithilfe eines Luminometers quantifiziert werden. Die gemessenen Chemilumineszenzsignale wurden auf den WT normiert (relative Oberflächenexpression, rel. OE = Oberflächenexpression_(x) / Oberflächenexpression_(WT)). Dargestellt wird der Mittelwert $\pm$ Standardfehler (Abb. 14). Zur Berechnung der P-Werte wurden ungepaarte *Students T-Tests* durchgeführt und Werte $<0,05$ als signifikant gewertet.

V759I zeigte in CHO-Zellen eine signifikante Reduktion des Oberflächensignals auf $65,5 \pm 3,7$ % (rel. OE_{WT} = $100,0 \pm 2,5$ %; $p=0,000001$), (Abb. 14, A).

Bei der identifizierten Variante handelte es sich um eine heterozygote Mutation des HCN4 Kanals, die sich bei einem homologen Chromosomensatz nur auf einem der beiden Allele befindet⁸⁴. Um die Heterozygotie *in vivo* in heterologen Zellen nachzubilden, wurde in einem nächsten Schritt die Oberflächenexpression des heterotetrameren Kanals aus den Untereinheiten WT und V759I in CHO-Zellen untersucht. Ziel war es, den Anteil der einzelnen Kanaluntereinheiten (WT oder V759I) im

Heterotetramer zu quantifizieren.

Neben den bereits oben beschriebenen Konstrukten mit HA-tag, wurden dafür HCN4 Konstrukte des WT und der Variante ohne extrazelluläres HA-tag in einem pEGFP-N1-Vektor generiert. Zur Untersuchung der unterschiedlichen Konstellationen (Homotetramer WT, Heterotetramer WT/V759I, Homotetramer V759I) wurden die beiden jeweiligen Konstrukte in einem Mengenverhältnis von 1:1 ko-transfiziert. Eines davon war mit einem HA-tag versehen, das andere nicht. Dadurch konnte das Konstrukt, das ein HA-tag trug, selektiv mittels Anti-HA Antikörper an der Zelloberfläche markiert und quantifiziert werden. Normiert wurde auf das gemessene Signalniveau des homotetrameren WT.

Zum besseren Verständnis sind im folgenden Abschnitt sowie in Abb. 14, B die Konstrukte, die mit einem HA-tag konjugiert waren und deren Oberflächenexpression quantifiziert wurde, unterstrichen (bspw. gilt für das Homotetramer WT/WT: WT mit HA-tag, WT ohne HA-tag und für das Heterotetramer WT/V759I: WT mit HA-tag, V759I ohne HA-tag).

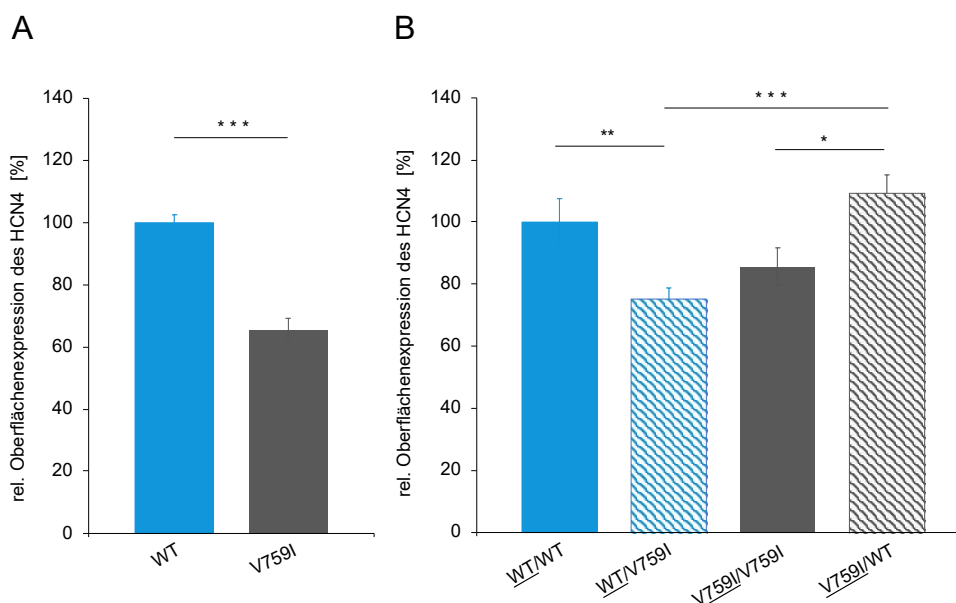


Abb. 14: V759I wird in CHO-Zellen vermindert an der Zelloberfläche exprimiert.

A: Quantifizierung der Oberflächenexpression des HCN4 Wild-Typs (WT) und der Variante (V759I) in CHO-Zellen. V759I zeigt eine Abnahme der Kanäle an der Zelloberfläche (rel. OE_{V759I}=65,5 ± 3,7 %). Normierung erfolgte auf die Oberflächenexpression des WT (rel. OE_{WT}=100,0 ± 2,5 %, p=0,000001); **B:** Quantifizierung der Oberflächenpopulation von WT und V759I im Heterotetramer. Unterstrichen ist das mit einem HA-tag versehene und quantifizierte Kanalkonstrukt. Im Heterotetramer (WT/V759I) zeigt der WT eine relative Oberflächenexpressionsrate von 75,2 ± 3,6 % (p=0,007). Das Niveau von V759I an der Zelloberfläche steigt im Heterotetramer (V759I/WT) leicht an (109,3 ± 6,1 %; p=0,3). Die relative Oberflächenexpression des Homotetramers von V759I liegt bei 85,8 ± 6,0 % (p=0,1). Die Normierung der gemessenen Signale erfolgte auf den WT (WT/WT) mit rel. OE_{WT}= 100,0 ± 7,1 %; n=9, N=3; angegeben wird der Mittelwert ± Standardfehler; P-Werte nach Durchführung eines ungepaarten *Students T-Tests*.

Das Oberflächensignal des WT im Heterotetramer (WT/V759I) war verglichen mit dem Signal des homotetrameren WT (WT/WT) auf 75,2 ± 3,6 % signifikant vermindert (p=0,007), (Abb. 14, B). V759I hingegen wies im Heterotetramer mit dem WT (V759I/WT) eine Oberflächenexpressionsrate

von $109,3 \pm 6,1$ % auf und zeigte damit eine leichte, jedoch nicht signifikante Zunahme der Oberflächenexpression im Vergleich zum WT ($p=0,3$).

V759I war im Heterotetramer (V759I/WT) um den Faktor 1,45 signifikant vermehrt an der Zelloberfläche als der WT im Heterotetramer (WT/V759I), ($p=0,0002$).

Die Oberflächenexpressionsrate des Homotetramers der Variante (V759I/V759I) lag in dieser Analyse bei $85,8 \pm 6,0$ % ($p=0,1$). Die Reduktion war nicht wie in Abb. 14, A signifikant, zeigte jedoch dieselbe abnehmende Tendenz.

Eine Analyse des Oberflächenexpressionsniveaus des Heterotetramers WT/V759I, die nicht zwischen WT und Variante differenzierte indem beide Konstrukte mit einem HA-tag versehen waren, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Die Gesamtexpression von V759I steigt in CHO-Zellen nicht signifikant an

Zur Beurteilung der Gesamtproteinexpression von WT und Variante erfolgten Western Blot Analysen (Abb. 15, A). Hierfür wurden Zelllysate aus CHO-Zellen hergestellt, die entweder HCN4 WT oder HCN4 V759I exprimierten. Die gewonnenen Lysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und über die Bindung eines Antikörpers gegen HCN4 im Western Blotting detektiert. Die HCN4 Proteine wurden stets bei einer Masse von 150 kDa markiert. Als Ladekontrolle diente das Strukturprotein β -Aktin (42 kDa).

In der Gesamtschau aller fünf durchgeführten Analysen deutete sich eine Zunahme der HCN4 Gesamtexpression durch V759I an. Eine Quantifizierung der Bandenintensität mit Hilfe der Software ImageJ ergab eine Zunahme der Gesamtexpression der Variante um den Faktor $2,9 \pm 1,5$. Diese fiel statistisch nicht signifikant aus ($p=0,62$). Die jeweils auf β -Aktin-normierte Bande der Variante wurde auf die β -Aktin-normierte Bande des WT normiert (Abb. 15, B). Zur Berechnung der P-Werte wurde ein ungepaarter *Students T-Test* durchgeführt und ein Wert $<0,05$ als signifikant gewertet.

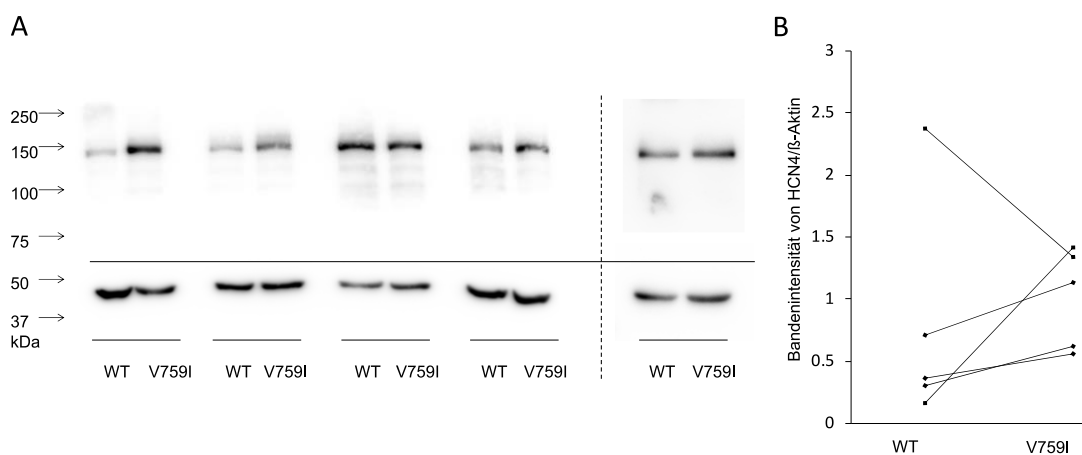


Abb. 15: Gesamtexpression des Wild Typs und der Variante V759I in CHO-Zellen.

A: Western Blot Analyse der Gesamtproteinexpression des HCN4 WT und der Variante V759I in CHO-Zellen. Die Detektion des HCN4 Proteins erfolgte bei 150 kDa mithilfe eines Anti-HCN4 Antikörpers. Als Ladekontrolle diente β -Aktin (42 kDa). Gezeigt sind fünf unabhängige Versuche; **B:** Quantifizierung der Bandenintensität aus A. Angegeben ist die Bandenintensität von WT und V759I, die zuvor auf die Intensität der jeweiligen β -Aktin-Bande normiert wurde. Es zeigt sich eine nicht signifikante Zunahme der Gesamtexpression der Variante um den Faktor $2,9 \pm 1,5$ ($p=0,6$); P-Wert nach Durchführung eines ungepaarten *Students T-Tests*; kDa: Kilodalton.

3.1.4 Interaktion des Bindungspartners PEX5R/Trip8b mit dem HCN4 Kanal

Das zytoplasmatische Protein PEX5R/Trip8b ist im ZNS eine Hilfsuntereinheit von HCN Kanälen⁴⁸. Durch Interaktion mit dem C-Terminus inhibiert PEX5R/Trip8b die cAMP-vermittelte Modulation der spannungsabhängigen Kanalaktivierung⁴⁸. Aufgrund eines ausgeprägten alternativen *splicing* des N-Terminus liegen verschiedene Varianten des Bindungspartners vor, die auf unterschiedliche Weise die Oberflächenexpression von HCN Kanälen beeinflussen⁹⁰.

Eine veröffentlichte Studie zeigte eine Verbindung von HCN4 V759I mit Fällen der malignen Epilepsie⁸⁹. Da V759I im C-Terminus hinter der CNBD lokalisiert ist und möglicherweise die Interaktion zwischen HCN4 und dem neuronalen Interaktionspartner PEX5R/Trip8b beeinflussen könnte, wurde in einem weiteren Schritt dieser Arbeit die Oberflächenexpression von WT und V759I während der Koexpression mit PEX5R/Trip8b untersucht⁸⁴. Hierzu wurde die PEX5R/Trip8b *splice* Variante 1a-4 verwendet. Diese beinhaltet Exon 1a sowie Exon 4 der variablen Exons von PEX5R/Trip8b⁹¹.

Die Bestimmung der HCN4 Oberflächenexpression erfolgte heterolog in CHO-Zellen und wurde nach dem bereits unter 3.1.3 beschriebenen Prinzip durchgeführt. Angegeben ist der Mittelwert $\pm$ Standardfehler. P-Werte wurden nach Durchführung eines ungepaarten *Students T-Tests* bestimmt und Werte $<0,05$ als signifikant gewertet.

Die gemessenen Oberflächensignale wurden auf das Signal des WT ohne Koexpression von PEX5R/Trip8b normiert (rel. $OE_{WT}=100,0 \pm 4,5 \%$), (Abb. 16). Die Anzahl der HCN4 Kanäle an der Zelloberfläche nahm durch die Koexpression des Bindungspartners zu. Das relative Oberflächensignal des WT stieg mit PEX5R/Trip8b auf $126,2 \%$ ($\pm 17,5 \%$) an. Dieser Anstieg war statistisch nicht signifikant ($p=0,2$). Eine Zunahme der Oberflächenexpression konnte jedoch in drei der vier durchgeführten Experimente beobachtet werden. In einem Experiment lag das Signal von WT+PEX5R/Trip8b unterhalb des Signalniveaus des allein exprimierten WT.

Verglichen mit dem Oberflächenexpressionsniveau der Variante allein (rel. $OE_{V759I}=73,2 \pm 6,0 \%$), führte die Koexpression von PEX5R/Trip8b zu einem signifikanten Anstieg des Oberflächensignals von V759I um den Faktor 1,5 (rel. $OE_{V759I+PEX5R}=112,8 \pm 9,4 \%$; $p=0,002$). Sowohl V759I als auch WT nahmen durch die Koexpression von PEX5R/Trip8b an der Zelloberfläche zu.

Zudem konnte diese Analyse die Ergebnisse aus Abb. 14, A bestätigen. Das Oberflächensignal von V759I ohne PEX5R/Trip8b war gegenüber dem Signal des WT ohne PEX5R/Trip8b signifikant reduziert ($p=0,002$).

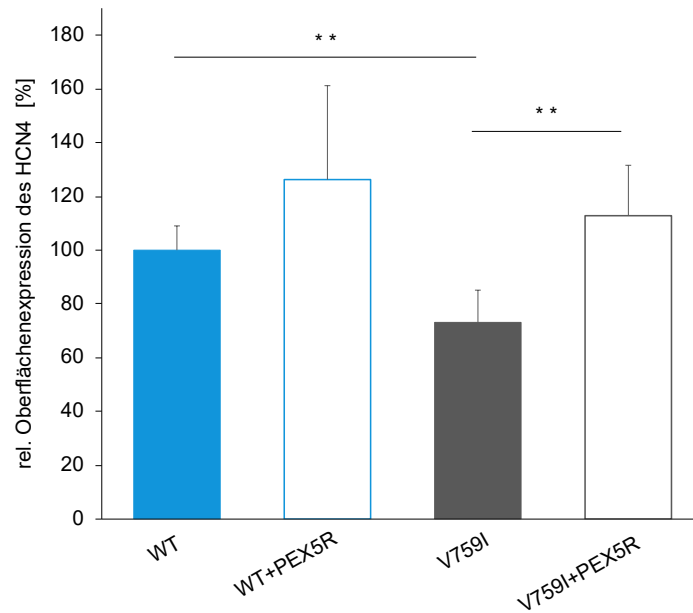


Abb. 16: Zunahme der Oberflächenexpression von WT und V759I durch die Koexpression von PEX5R/Trip8b.

Relative Oberflächenexpression von Wild-Typ (WT) und V759I in CHO-Zellen mit bzw. ohne die Koexpression des neuronalen Bindungspartners PEX5R/Trip8b (PEX5R). PEX5R führt zu einer Zunahme des relativen Oberflächensignals des WT (rel. OE_{WT+PEX5R}=126,2 ± 17,5 %; p=0,2). Die Oberflächenexpression von V759I steigt bei Koexpression mit PEX5R deutlich an (rel. OE_{V759I}=73,2 ± 6,0 %; rel. OE_{V759I+PEX5R}=112,8 ± 9,4 %; p=0,002). V759I ist verglichen mit dem WT signifikant an der Oberfläche reduziert, (p=0,002). Normiert wurde auf das Signal des WT (rel. OE_{WT}=100,0 ± 4,5 %; n=12, N=4). Angegeben wird der Mittelwert ± Standardfehler. P-Werte nach Durchführung eines ungepaarten *Students T-Tests*.

3.2 Einfluss des IGF-1/AKT-Signalweges auf elektrophysiologische Eigenschaften des HCN4 Stroms

Teile der im folgenden Abschnitt gezeigten Analysen wurden im Rahmen einer Veröffentlichung publiziert und werden in Anlehnung an diese Publikation dargestellt⁹².

3.2.1 Einfügen von Punktmutationen in HCN4-pGem-He zur Imitation einer AKT-abhängigen Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung des Kanals

Eine Phosphoproteom-Analyse an HL-1 Kardiomyozyten hatte durch spezifischen *knock-down* der AKT Isoformen AKT1 und AKT2 vier Serin-Reste im N-Terminus des HCN4 Kanals (S14, S99, S102 und S139) identifiziert, die AKT-vermittelt phosphoryliert werden⁷⁵. Im Rahmen dieser Dissertation wurde der Einfluss einer Phosphorylierung dieser Aminosäurereste auf elektrophysiologische Eigenschaften des HCN4 Stroms in einem heterologen Expressionssystem untersucht. Ziel war zunächst die Analyse der spannungsabhängigen Aktivierung während unterschiedlicher AKT-vermittelter Phosphorylierungszustände.

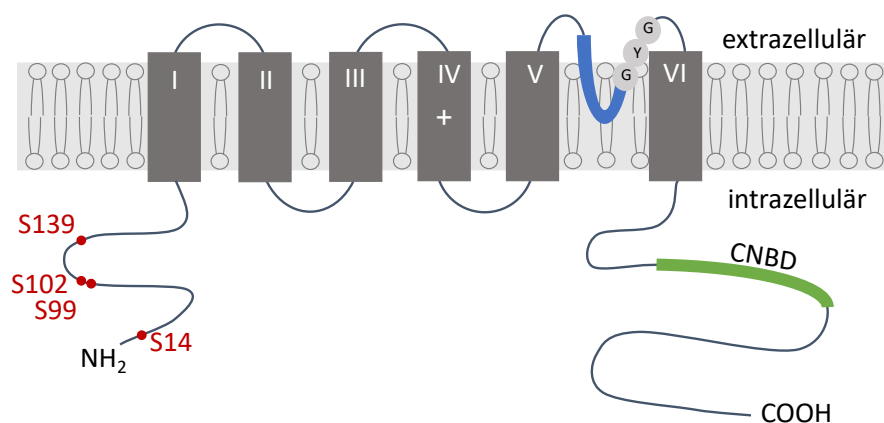


Abb. 17: AKT-vermittelte Phosphorylierung von vier Serinresten im N-Terminus des HCN4.

Schematische Darstellung einer HCN4 Kanaluntereinheit mit Lokalisation der vier Serinreste S14, S99, S102 und S139 (rot) im N-Terminus, die AKT-abhängig phosphoryliert werden. Diese wurden zuvor in einer Phosphoproteomanalyse an HL1-Kardiomyozyten mit spezifischem *knock-down* der AKT-Isoformen AKT1 und AKT2 identifiziert⁷⁵. Durch Punktmutationen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung dieser Aminosäuren imitiert. CNBD: *cyclic nucleotide binding domain*, Abb. in Anlehnung an Biel *et al.*⁹

Dafür wurden die jeweiligen Aminosäurereste S14, S99, S102 und S139 nach Aspartat (D) oder Alanin (A) mutiert (Abb. 17). Die Punktmutationen nach D (HCN4 S14D, HCN4 S99-102D, HCN4 S139D) dienten der Imitation des phosphorylierten Zustands des Kanals und werden im Folgenden als phosphomimetische Konstrukte bezeichnet. Die Mutationen nach A (HCN4 S14A, HCN4 S99-102A, HCN4 S139A) stellten den dephosphorylierten Zustand dar. Sie werden phosphoablative Konstrukte genannt. Aufgrund ihrer Nähebeziehung wurden die Mutationen der Aminosäuren S99 und S102 in einem Konstrukt kombiniert (Abb. 17).

Zur Generierung der HCN4 Konstrukte wurde das *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma Agilent Technologies verwendet bzw. Klonierungen mittels Overlap-PCRs durchgeführt. Als *template* diente HCN4 WT in einem pGem-He-Vektor, aus dem sich für weitere Schritte mittels *in vitro* Transkription RNA synthetisieren ließ. Um die jeweiligen Serinreste zielgerichtet zu mutieren, wurden überlappende *forward* und *reverse* Primer über das *QuikChange Primer Design Program* generiert (<http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pageId=7100004>). Diese beinhalteten die entsprechende Punktmutation (Tabelle 9). In einer PCR konnten mithilfe der Mutagenese Primer und der PfuUltra HF Polymerase die Punktmutationen S14A, S14D, S99-102A und S139A direkt in das Plasmid HCN4-pGem-He eingefügt werden. Das PCR-Produkt wurde anschließend in einem enzymatischen Verdau mit dem Restriktionsenzym DpnI restringiert und direkt in ultrakompetente *E. coli* XL-10 Gold Zellen transformiert. Die Transformationsansätze wurden auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen, um in einem weiteren Schritt die cDNA-Plasmide einzelner Bakterienkolonien in einer Mini-Präparation isolieren zu können. Nach einem korrekten Testverdau wurden ausgewählte Plasmide sequenziert. Abb. 18 zeigt das Ergebnis des Testverdaus der Konstrukte HCN4 S14A, -S14D, -S99-102A und -S139A nach einer Midi-Präparation mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XbaI. Die entsprechenden Banden ließen sich aus den Schnittstellen der Restriktionsenzyme ableiten und waren auf einer Höhe von 3.735 bp und 3.007 bp (Gesamtgröße 6.742 bp) zu sehen. Die große Bande zwischen 10.000 und 6.000 bp des Konstrukts S14D spiegelte am ehesten ungeschnittenen bzw. nur einmalig verdauten Vektor wider.

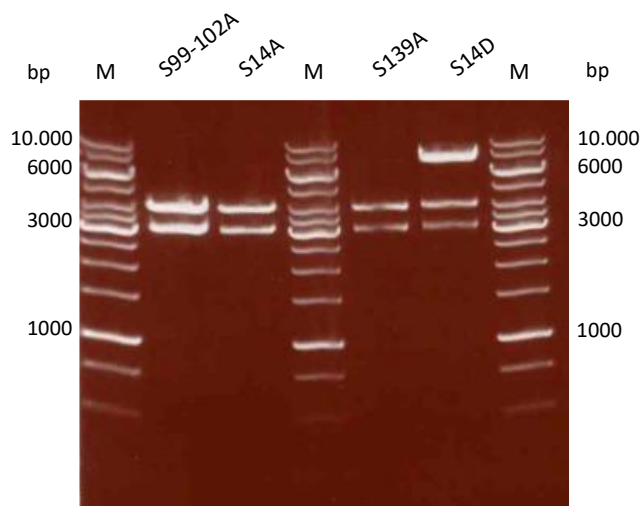


Abb. 18: Klonierung der Punktmutationen S14A, S14D, S99-102A und S139A in HCN4-pGem-He.

Agarosegelelektrophorese nach einem Testverdau der Midi-Präparation der neu generierten HCN4 Konstrukte HCN4 S14A, HCN4 S14D, HCN4 S99-102A und HCN4 S139A in einem pGem-He-Vektor. Die Punktmutationen wurden mithilfe des *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* eingefügt. Die DNA-Plasmide (Gesamtgröße 6742 bp) wurden zur Kontrolle der Klonierung mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XbaI restringiert. Die entsprechenden Banden verliefen auf einer Höhe von 3.007 und 3.735 bp. Als DNA-Größenstandard (M) diente *DualColor GeneRuler* 1 kb; bp: Basenpaare.

Für S99-102D und S139D erwies sich eine Klonierung nach der obigen Methode mehrfach als nicht erfolgreich. Auf den LB-Platten waren keine Bakterienkolonien gewachsen. Letztlich konnten mittels Overlap-PCR unter Verwendung der Q5 *High Fidelity* DNA Polymerase und der in Tabelle 9 aufgelisteten Mutagenese Primer die Punktmutationen eingebaut werden. Die gelelektrophoretisch aufgetrennten und aufgereinigten PCR-Produkte (*insert*) sowie der Zielvektor wurden mit dem Restriktionsenzym KpnI verdaut. Anschließend wurde der dephosphorylierte Zielvektor und das *insert* ligiert und in kompetente *E. coli XL1 blue* Bakterien transformiert. In einer Mini-Präparation konnten die cDNA-Plasmide aus zuvor ausgewählten Bakterienkolonien isoliert werden. Ein Testverdau wurde mit den Restriktionsenzymen NdeI und NotI durchgeführt. Ein zweiter Testverdau mit KpnI diente der Kontrolle, ob das *insert* in richtiger Orientierung in den Vektor eingebaut wurde. Die gesuchte Bande für einen Verdau des Plasmids mit KpnI befand sich in der Agarosegelelektrophorese auf einer Höhe von 1.413 bp (Abb. 19). Mittels Sequenzierung wurden die Plasmide mit korrektem Restriktionsverdau anschließend auf ihre Richtigkeit kontrolliert.

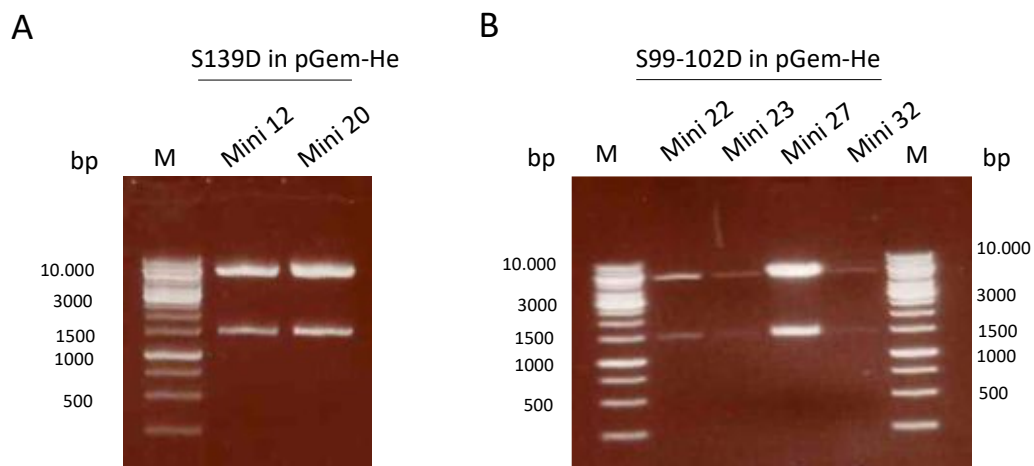


Abb. 19: Klonierung der Punktmutationen S99-102D und S139D in HCN4-pGem-He.

Agarosegelelektrophorese nach einem Testverdau der Mini-Präparation der Konstrukte HCN4 S139D und S99-102D in einem pGem-He-Vektor. Die Punktmutationen wurden mithilfe von Overlap-PCRs eingefügt. Die DNA-Plasmide (Gesamtgröße 6.742 bp) wurden zur Kontrolle der Klonierung mit dem Restriktionsenzym KpnI restringiert. Zwei Mini-Präparationen des Konstrukts mit der Mutation S139D (**A**) und vier Mini-Präparationen mit den Mutationen S99-102D (**B**) wurden verdaut. Die entsprechenden Banden verliefen auf einer Höhe von 1.413 bp. Als DNA-Größenstandard (M) diente *DualColor GeneRuler* 1 kb. Da die Banden der Mini 22, 23 und Mini 32 des Konstrukts HCN4 S99-102D (**B**) schwach waren, erfolgten weitere Schritte mit dem Plasmid aus Mini 27; bp: Basenpaar.

Um weitere Untersuchungen mit Konstrukten, die alle vier Mutationen beinhalteten, durchführen zu können wurden die Konstrukte HCN4 S14-99-102-139A in pGem-He bzw. HCN4 S14-99-102-139D in pGem-He erstellt⁹².

Hierfür wurden HCN4 S14A-pGem-He bzw. HCN4 S14D-pGem-He mit SacI restringiert und in HCN4 S99-102A-pGem-He bzw. HCN4 S99-102D-pGem-He per Ligation eingefügt. Mithilfe des oben bereits verwendeten *Site directed Mutagenesis Kit* konnte S139D wider erwartend in HCN4 S14-99-102D-pGem-He kloniert werden. S139A musste mithilfe der Overlap-PCR unter Verwendung

der Q5 *High Fidelity* DNA Polymerase und der in Tabelle 9 aufgelisteten Mutagenese Primern in das Konstrukt HCN4 S14-99-102A-pGem-He eingefügt werden.

Abschließend lagen neben den Konstrukten mit den jeweiligen einzelnen Punktmutationen nach A bzw. D somit auch die Konstrukte HCN4 S14-99-102-139A und HCN4 S14-99-102-139D in pGem-He vor. Die Sequenz aller Konstrukte wurde vor der Durchführung von Experimenten per Sequenzierung bestätigt. Um die Ausbeute an Plasmid-DNA zu erhöhen, folgten Midi- bzw. Maxi-Präparationen sowie eine anschließende Synthese von mRNA mittels *in vitro* Transkription.

3.2.2 Eine AKT-vermittelte Phosphorylierung beeinflusst die spannungsabhängige Aktivierung des HCN4 Stroms in *Xenopus* Oozyten nicht

Zur Analyse der spannungsabhängigen Kanalaktivierung wurden die Konstrukte in *Xenopus laevis* Oozyten heterolog exprimiert. Mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme erfolgte die Untersuchung der Ganzzellströme der Oozyten bei festgelegten Membranpotenzialen. Das durchgeführte Spannungsprotokoll ist Abb. 20, A zu entnehmen. Abb. 20, B zeigt beispielhaft repräsentative Stromspuren der untersuchten Konstrukte. Während der Applikation hyperpolarisierender Membranspannungen zwischen -150 und -20 mV wurden langsam aktivierende, einwärtsgerichtete Ströme aufgezeichnet. Zuletzt erfolgte ein Spannungssprung auf -150 mV. Anschließend wurden die initiale Stromamplitude unmittelbar nach Beginn des Spannungssprungs auf -150 mV auf die maximal gemessene Stromamplitude normiert, über die variable Kommandospannung zwischen -150 und -20 mV aufgetragen und eine modifizierte Boltzmann-Funktion an den Grafen angepasst. Die Auswertung erfolgte mithilfe der PatchMaster Software, Microsoft Excel sowie der OriginPro Software. Die daraus hervorgehenden Aktivierungskurven ermöglichten den Vergleich der Spannung bei halbmaximaler Kanalaktivierung ($V_{1/2}$) zwischen den gezeigten phosphomimetischen bzw. phosphoablativen HCN4 Mutanten (Abb. 20, C). Neben dem Mittelwert von $V_{1/2}$ wird der Standardfehler und der P-Wert nach Durchführung eines ungepaarten *Students T-Tests* angegeben.

Die Analyse der Aktivierungskurve ergab für HCN4 S14A einen Wert für $V_{1/2}$ von $-95,0 \pm 1,1$ mV und für HCN4 S14D $-92,8 \pm 1,9$ mV ($p=0,3$). Bei den Konstrukten HCN4 S99-102A und HCN4 S99-102D lag $V_{1/2}$ bei $-95,7 \pm 1,1$ mV bzw. $-94,5 \pm 0,9$ mV ($p=0,4$). $V_{1/2}$ von HCN4 S139A betrug $-89,3 \pm 1,8$ mV und von HCN4 S139D $-91,3 \pm 1,2$ mV ($p=0,4$). Die Untersuchung der spannungsabhängigen Aktivierung zeigte zwischen dem jeweiligen phosphoablativen und phosphomimetischen HCN4 Konstrukt keine signifikante Verschiebung von $V_{1/2}$. Auch die Steigungsfaktoren der Boltzmann-Funktionen (Hill-Koeffizienten) unterschieden sich nicht signifikant.

Ein weiterer Parameter der biophysikalischen Eigenschaften von HCN Kanälen ist die Kinetik der Kanalöffnung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kinetik der phosphomimetischen und phosphoablativen HCN4 Konstrukte während der Aktivierung des HCN4 Kanals bei hyperpolarisierenden Membranspannungen untersucht. Die Zeitkonstante der Kanalaktivierung τ_{Akt} beschreibt die Zeit, in der 66 % der maximalen Stromamplitude erreicht sind und ist somit ein Maß für die Geschwindigkeit der Kanalaktivierung. Mithilfe der Fitmaster Software wurde die

initiale Stromantwort während der Spannungssprünge zwischen -150 und -100 mV an eine monoexponentielle Funktion angepasst und die Werte zur besseren Darstellung logarithmisch aufgetragen.

Abb. 21, A-C zeigt τ_{Akt} der phosphomimetischen und phosphoablativen Kanalkonstrukte. Zwischen HCN4 S14A und HCN4 S14D sowie zwischen HCN4 S99-102A und HCN4 S99-102D konnte bei keiner Spannung eine signifikante Änderung von τ_{Akt} beobachtet werden. Die Konstrukte HCN4 S139A und HCN4 S139D unterschieden sich in τ_{Akt} bei -120 bzw. -110 mV signifikant ($p=0,03$, $p=0,04$). HCN4 S139D besaß bei diesen Spannungen eine höhere Aktivierungszeitkonstante. Bei negativeren sowie positiveren Spannungen konnten zwischen den beiden Konstrukten keine signifikanten Unterschiede in τ_{Akt} beobachtet werden.

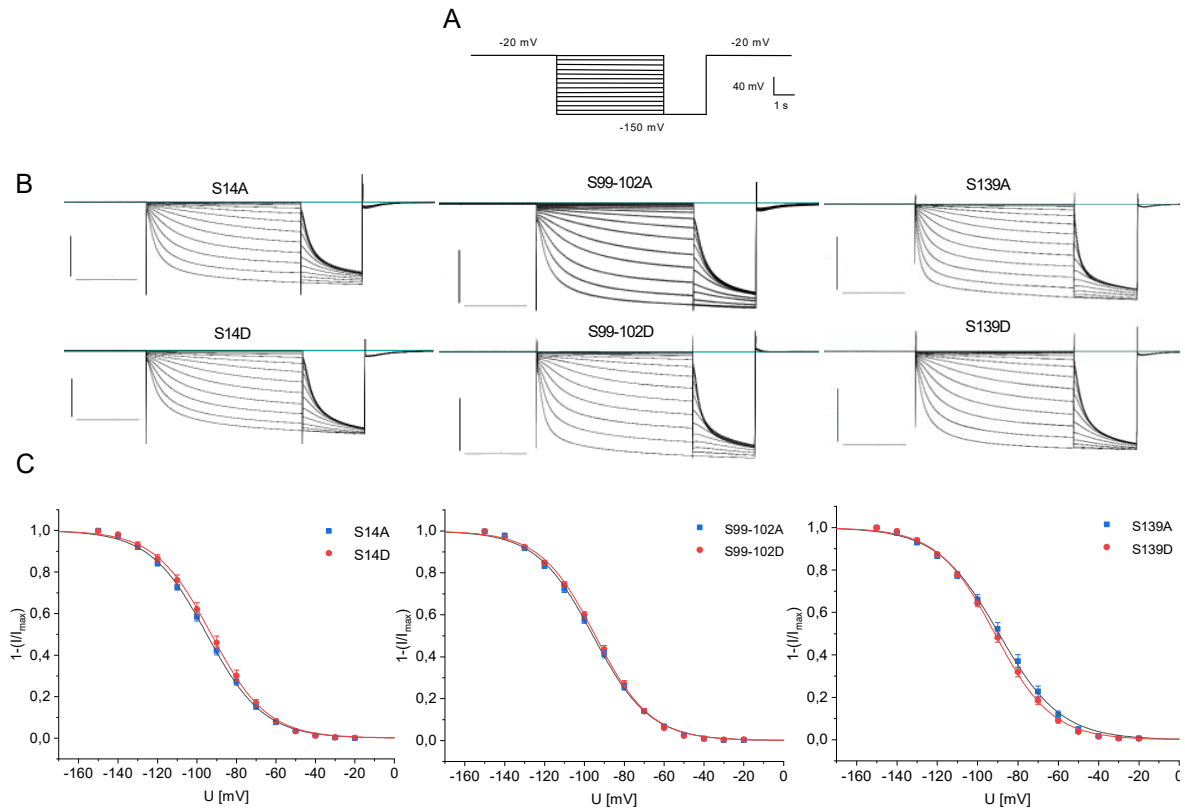


Abb. 20: Zwischen den phosphoablativen und phosphomimetischen HCN4 Konstrukten besteht kein Unterschied in der Spannungsabhängigkeit während der Kanalaktivierung.

A: Angewandtes Spannungsprotokoll zur Analyse der spannungsabhängigen Kanalaktivierung. Für 5 s wurden hyperpolarisierende Potenziale zwischen -150 und -20 mV (+10 mV Schritte) appliziert und zur Messung des Stroms bei maximaler Aktivierung anschließend ein Sprung auf -150 mV für 2 s durchgeführt. Das Haltepotenzial betrug -20 mV, Maßstab y-Achse: 40 mV, x-Achse: 1 s; **B:** Repräsentative Stromkurven von HCN4 S14A bzw. S14D, HCN4 S99-102A bzw. S99-102D, HCN4 S139A bzw. S139D. Maßstab y-Achse: 5 μ A, x-Achse: 2 s; **C:** Aktivierungskurve nach Auswertung des Stroms bei maximaler Aktivierung nach Anpassung an eine modifizierte Boltzmann-Funktion. Die Spannung bei halbmaximaler Kanalaktivierung von S14A liegt bei $V_{1/2} = -95,0 \pm 1,1$ mV (Steigungsfaktor $14,2 \pm 0,2$ mV, $n=17$, $N=6$) und für S14D bei $V_{1/2} = -92,8 \pm 1,9$ mV (Steigungsfaktor: $13,8 \pm 0,3$ mV, $n=10$, $N=4$); $p=0,3$. Für S99-102A ergab sich $V_{1/2} = -95,7 \pm 1,1$ mV (Steigungsfaktor $14,0 \pm 0,1$ mV, $n=13$, $N=5$) und für S99-102D: $V_{1/2} = -94,5 \pm 0,9$ mV (Steigungsfaktor $13,7 \pm 0,3$ mV, $n=10$, $N=5$); $p=0,4$. $V_{1/2}$ von S139A lag bei $V_{1/2} = -89,3 \pm 1,8$ mV (Steigungsfaktor $15,0 \pm 0,5$ mV, $n=10$, $N=5$) und von S139D bei $V_{1/2} = -91,3 \pm 1,2$ mV (Steigungsfaktor $13,9 \pm 0,3$ mV, $n=16$, $N=5$); $p=0,4$. Angegeben ist der Mittelwert $\pm$ Standardfehler. Bestimmung der P-Werte für $V_{1/2}$ durch einen ungepaarten *Students T-Test*; mV: Millivolt, s: Sekunde, U: elektrische Spannung, I: elektrische Stromstärke.

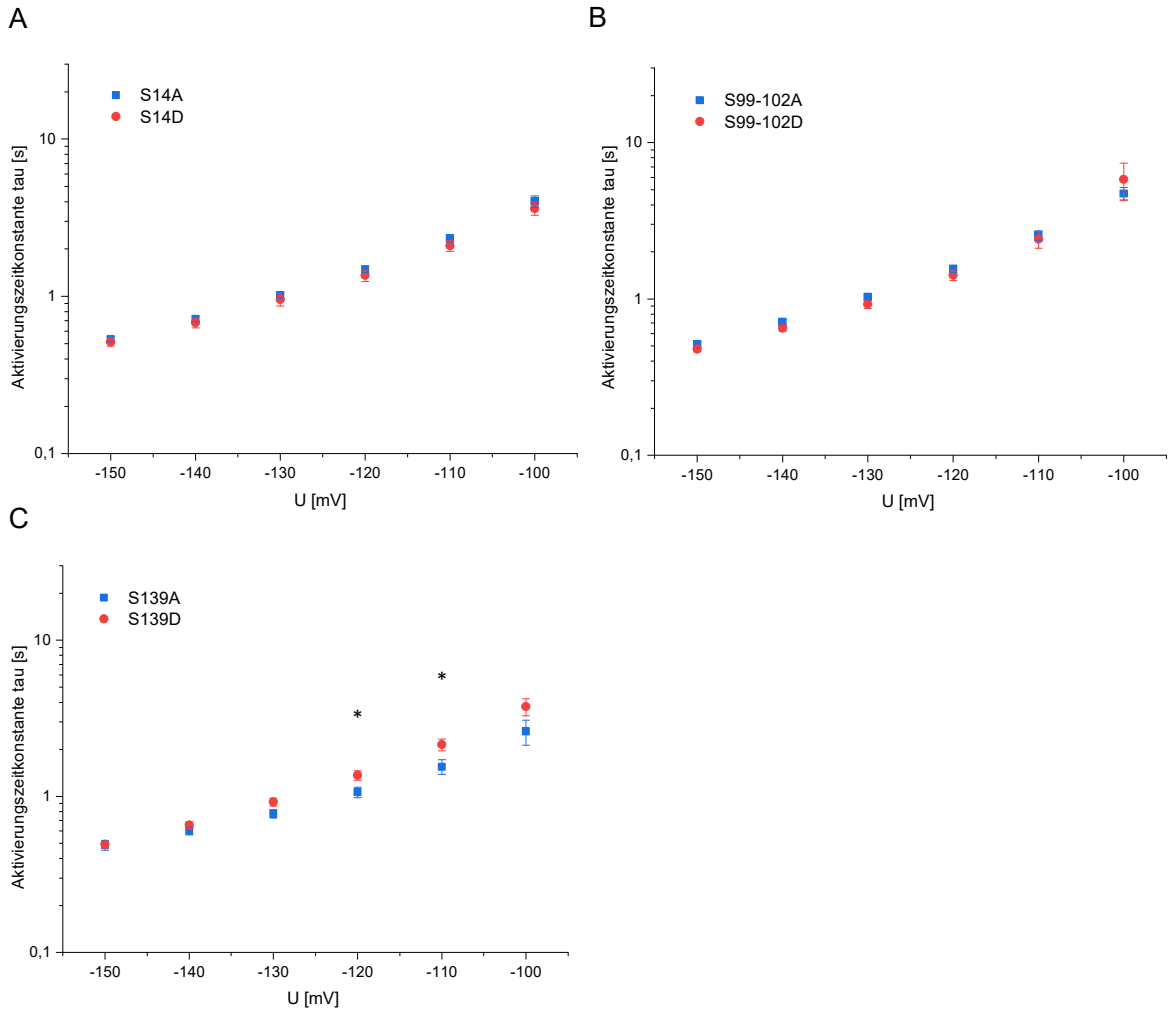


Abb. 21: Aktivierungskinetiken der phosphomimetischen und phosphoablativen HCN4 Kanalkonstrukte.

A-C: Aktivierungskinetik der Konstrukte HCN4 S14A bzw. S14D, HCN4 S99-102A bzw. S99-102D, sowie HCN4 S139A bzw. S139D. Die Aktivierungszeitkonstante τ_{Akt} wurde als monoexponentieller Fit der initialen Stromantwort auf Spannungssprüngen zwischen -150 und -100 mV berechnet und als Logarithmus dargestellt. τ_{Akt} zwischen S14A (n=17) und S14D (n=10) sowie S99-102A (n=12) und S99-102D (n=10) unterscheiden sich nicht signifikant. S139A (n=10) zeigt bei -120 mV und -110 mV eine schnellere Aktivierung als S139D (n=16, $p=0,03$ bei -110 mV und $p=0,04$ bei -120 mV). Angegeben wird der Mittelwert $\pm$ Standardfehler. P-Werte beruhen auf der Durchführung eines ungepaarten *Students T-Tests*; s: Sekunde, mV: Millivolt, U: elektrische Stromspannung.

In Ergänzung zu den obigen Untersuchungen wurde die Imitation der Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung aller vier Serinreste in einem HCN4 Konstrukt untersucht. Die Analyse der Kanalaktivierung ergab zwischen -150 und -100 mV für τ_{Akt} von HCN4 S14-99-102-139A und HCN4 S14-99-102-139D keine signifikanten Unterschiede (Abb. 22, B)⁹². Die beobachteten Unterschiede in τ_{Akt} zwischen HCN4 S139A und HCN4 S139D konnten in diesem Fall nicht reproduziert werden. Die beschriebene Phosphorylierung des HCN4 Kanals scheint in *Xenopus* Oozyten nicht zu einer Änderung der Aktivierungskinetik des HCN4 Stroms zu führen.

Die spannungsabhängige Kanalaktivierung der Konstrukte HCN4 S14-99-102-139A und HCN4 S14-99-102-139D unterschied sich ebenfalls nicht signifikant ($p=0,4$)⁹². Die Aktivierungskurve des

phosphoablativen Gesamtkonstrukts ergab für $V_{1/2}$ $-94,7 \pm 0,8$ mV. $V_{1/2}$ von S14-99-102-139D betrug $-93,4 \pm 1,1$ mV. Zwischen den beiden Konstrukten unterschied sich lediglich die Steigung der Aktivierungskurve mit einem Steigungsfaktor von $11,3 \pm 0,2$ mV für HCN4 S14-99-102-139A und $12,8 \pm 0,2$ mV für HCN4 S14-99-102-139D ($p=0,004$).

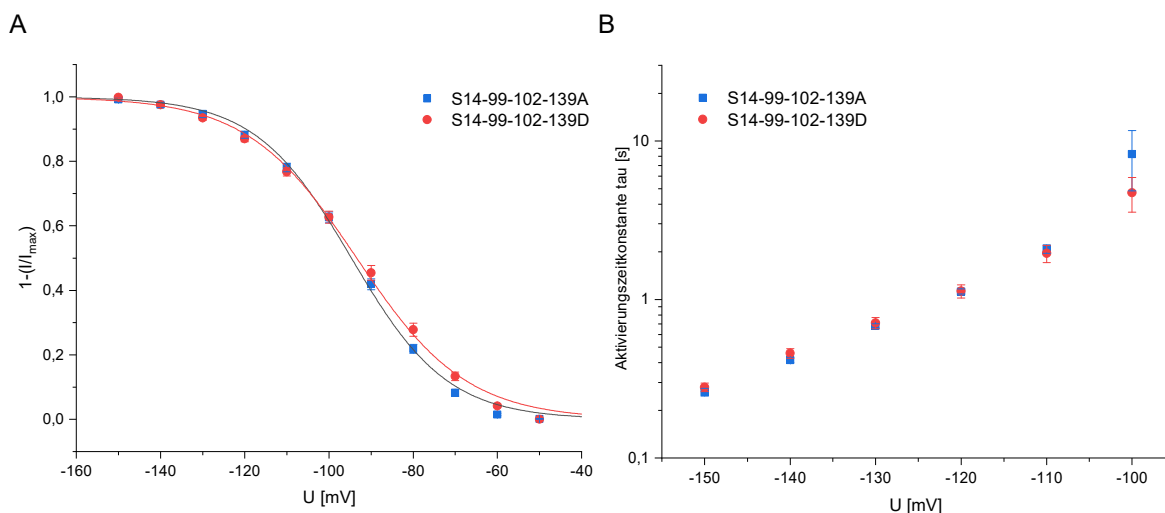


Abb. 22: Die Imitation einer AKT-abhängigen Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung der vier Serin-Reste zeigt keine Auswirkung auf die spannungsabhängige Kanalaktivierung.

A: Aktivierungskurve des konstitutiv phosphoablativen (HCN4 S14-99-102-139A) und phosphomimetischen Konstrukts (HCN4 S14-99-102-139D). Für HCN4 S14-99-102-139A gilt $V_{1/2} = -94,7 \pm 0,8$ mV (Steigungsfaktor $11,3 \pm 0,2$ mV, $n=8$, $N=3$). $V_{1/2}$ von HCN4 S14-99-102-139D beträgt $-93,4 \pm 1,1$ mV (Steigungsfaktor $12,8 \pm 0,2$ mV, $n=12$; $N=5$); $p=0,4$. **B:** Logarithmische Darstellung der Aktivierungszeitkonstante τ (τ_{Akt}) nach monoexponentiellem Fit der initialen Stromantwort auf Spannungssprünge zwischen -150 mV und -100 mV. Zwischen τ_{Akt} von HCN4 S14-99-102-139A ($n=7$) und HCN4 S14-99-102-139D ($n=11$) zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Angegeben ist der Mittelwert $\pm$ Standardfehler. P-Wert nach Durchführung eines ungepaarten *Students T-Tests*; mV: Millivolt, s: Sekunde, U: elektrische Spannung, I: elektrische Stromstärke. Abb. in Anlehnung an Erlenhardt *et al.*⁹²

3.2.3 Die maximale Stromamplitude des HCN4 Kanals nimmt durch IGF-1 zu

IGF-1 ist ein wichtiger Mediator der somatotropen GH-Achse und ein kompetenter Aktivator der Proteinkinase AKT⁶⁹. Daher schloss sich an die Untersuchungen der spannungsabhängigen Kanalaktivierung während unterschiedlicher AKT-vermittelter Phosphorylierungszustände eine Analyse des Einflusses des Wachstumshormons IGF-1 auf die Stromamplitude des HCN4 Kanals an. HCN4 WT bzw. die zuvor erstellten AKT-vermittelt phosphomimetischen und phosphoablativen HCN4 Konstrukte wurden in *Xenopus laevis* Oozyten heterolog exprimiert und die Ganzzellströme bei maximaler Kanalaktivierung mithilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme vor, während oder nach einer Behandlung mit dem Wachstumsfaktor untersucht⁹².

Zunächst erfolgte die Messung der maximalen Stromamplitude (I_{Max}) während einer über Minuten andauernden Behandlung der Oozyte mit IGF-1. 50 nM IGF-1 in HCN4-Ringerlösung wurden unmittelbar vor Beginn des Spannungsprotokolls in die Messkammer appliziert. Ausgehend von einem Haltepotenzial bei -20 mV wurde die Oozyte für 7 Sekunden auf -150 mV hyperpolarisiert und anschließend auf das Haltepotenzial von -20 mV zurückgekehrt (Abb. 23, A). Der Sprung auf die stark hyperpolarisierende Membranspannung ermöglichte die Bestimmung der maximalen Stromamplitude I_{Max} . Nachdem für 10 Sekunden auf das Haltepotenzial von -20 mV zurückgekehrt wurde, erfolgte ein erneuter Spannungssprung auf -150 mV. Dieser Zyklus wurde insgesamt 20x durchlaufen, sodass I_{Max} während einer etwa 5 Minuten anhaltenden Behandlung der Oozyte mit IGF-1 wiederholt gemessen werden konnte. Abb. 23 zeigt beispielhafte Stromspuren von HCN4 WT exprimierenden Oozyten mit und ohne Wachstumsfaktor in der umgebenden Ringerlösung. Zu sehen ist eine stete Zunahme der gemessenen Stromamplitude während der Behandlung mit IGF-1. Ohne IGF-1 scheint die Stromamplitude des WT nahezu unverändert zu bleiben. Die gemessenen Werte für I_{Max} wurden auf $I_{\text{Max}(1)}$ des ersten Messzyklus normiert ($I_{\text{Rel}} = I_{\text{Max}(x)} / I_{\text{Max}(1)}$), (Abb. 23, C). Bereits während der zweiten Messung war ein signifikanter Anstieg von I_{Max} zu beobachten ($p=0,00002$). Im weiteren Verlauf nahm I_{Max} weiter zu und lag während der letzten Messung nach etwa 5 Minuten um das 1,6-fache ($I_{\text{Rel}(20)} = 1,6 \pm 0,2$) signifikant über I_{Max} des ersten Messzeitpunkts ($p=0,003$)⁹². Als Kontrollgruppe dienten WT exprimierende Oozyten, die mit HCN4-Ringerlösung ohne IGF-1 umspült wurden. I_{Max} der Kontrollgruppe stieg zu keinem Zeitpunkt der Messung signifikant an⁹². I_{Rel} der Kontrollgruppe während der letzten, 20., Messung lag bei $I_{\text{Rel}(20)} = 1,0 \pm 0,02$ ($p=1,0$)⁹². Dargestellt und angegeben wurde der Mittelwert $\pm$ Standardfehler. P-Werte wurden mit einem gepaarten *Students T-Test* bestimmt.

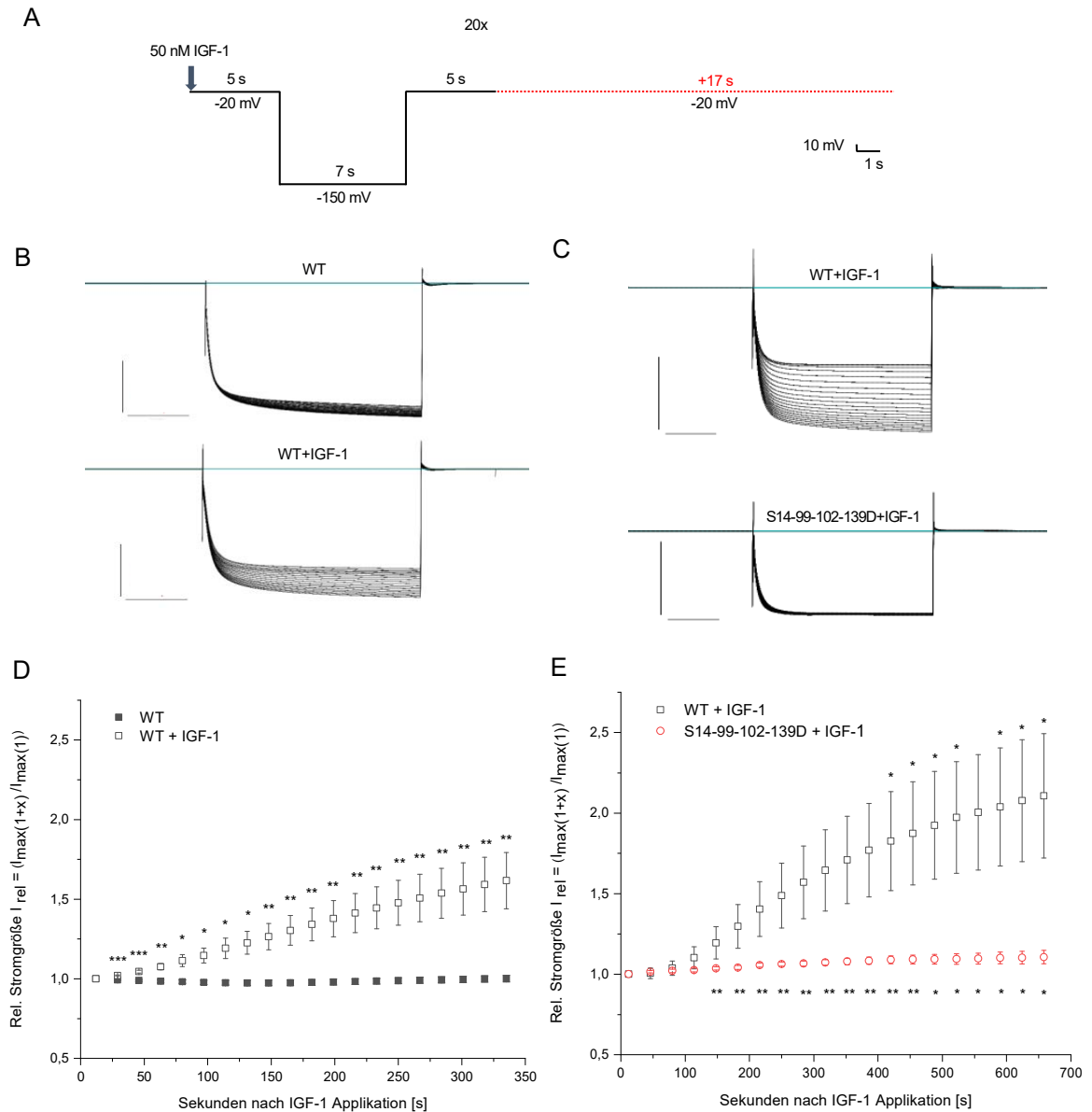


Abb. 23: I_{Max} des HCN4 WT, nicht aber des AKT-vermittelt phosphomimetischen Konstrukts, nimmt unmittelbar während einer Behandlung mit IGF-1 deutlich zu.

A: Durchgeführtes Spannungsprotokoll nach Applikation von IGF-1 (50 nM) in die Messkammer. Innerhalb von ca. 5 Minuten (schwarze Spur) wurden 20 Messzyklen durchgeführt. Ausgehend von -20 mV erfolgte ein Spannungssprung auf -150 mV für 7 s zur Bestimmung von I_{Max} . Um eine IGF-1 Behandlung von ca. 10 Minuten zu untersuchen, wurde das Haltepotenzial von -20 mV um 17 s pro Messzyklus verlängert (rote Spur); **B+C:** Repräsentative Stromspuren ohne bzw. während einer Behandlung der Oozyte mit IGF-1. Maßstab y-Achse: 5 μ A, x-Achse: 2 s; **D:** Relative Stromamplitude I_{rel} während wiederholter maximaler Aktivierung ohne bzw. während der Behandlung der Oozyte mit IGF-1. Normiert wurde auf $I_{Max(1)}$ des ersten Messzyklus unmittelbar nach IGF-1 Applikation. I_{Max} des WT steigt während der Behandlung auf $1,6 \pm 0,2$ ($n=11$, $N=3$) signifikant an ($p=0,003$). In Abwesenheit von IGF-1 bleibt ein derartiger Anstieg aus ($I_{rel} = 1,0 \pm 0,02$, $n=11$, $N=5$, $p=1,0$). Abb. in Anlehnung an Erlenhardt *et al.*⁹²; **E:** I_{rel} des WT und des phosphomimetischen Konstrukts S14-99-102-139D bei wiederholt maximaler Aktivierung während einer Behandlung mit IGF-1 (ca. 10 Min). I_{rel} wurde wie in (D) bestimmt. I_{rel} des WT steigt signifikant auf das 2-fache ($2,1 \pm 0,4$, $n=6$, $N=4$; $p=0,04$) an. Das phosphomimetische Konstrukt zeigt eine sehr geringe Zunahme von I_{Max} ($1,1 \pm 0,04$; $n=9$, $N=3$; $p=0,03$). Angegeben ist der Mittelwert $\pm$ Standardfehler. P-Wert nach Durchführung eines gepaarten *Students T-Tests*; s: Sekunde, mV: Millivolt, nM: Nanomolar, I: elektrische Stromstärke.

Da viele Wirkungen von IGF-1 durch Aktivierung der AKT-Signalkaskade vermittelt werden⁶⁸, war die Untersuchung des unmittelbaren Einflusses des Wachstumsfaktors auf die AKT-abhängig phosphomimetische Mutante HCN4 S14-99-102-139D ein nächster Schritt. Um eine längere Inkubationszeit des Wachstumsfaktors zu untersuchen, wurde zudem das Spannungsprotokoll modifiziert und die Zeit, in der die Oozyte auf das Haltepotenzial (-20 mV) geklemmt wurde, verlängert. Dadurch verdoppelte sich die Dauer der Behandlung mit IGF-1 auf etwa 10 Minuten (Abb. 23, A). In der Kontrollgruppe wurden WT exprimierende Oozyten mit IGF-1 behandelt. I_{Rel} wurde, wie bereits oben beschrieben, berechnet.

Die in Abb. 23, B beispielhaften Stromkurven zeigen die Entwicklung der Stromamplitude von WT und S14-99-102-139D während der Behandlung mit IGF-1. I_{Max} des phosphomimetischen Konstrukts scheint durch IGF-1 nahezu unverändert zu bleiben. Die bereits zuvor beobachtete Amplitudenzunahme von I_{Max} des WT bestätigte sich (Abb. 23, C). I_{Max} des WT nahm während der 10-minütigen Behandlung mit IGF-1 zu und stieg signifikant auf das 2-fache an ($I_{Rel(20)}=2,1 \pm 0,4$), ($p=0,04$). Bei S14-99-102-139D blieb ein derartiger Anstieg aus. I_{Max} von S14-99-102-139D nahm im Laufe der Messung in einem deutlich geringerem Maße signifikant zu ($I_{Rel(20)}=1,1 \pm 0,04$; $p=0,03$).

3.2.4 Die maximale Stromamplitude der phosphoablative und phosphomimetischen HCN4 Konstrukte ist gegenüber IGF-1 Applikation unempfindlicher

Die bisher vorgestellten Ergebnisse zeigten eine unmittelbare und deutliche Zunahme der Stromamplitude des WT während einer kurzen Behandlung der *Xenopus* Oozyte mit dem Wachstumsfaktor IGF-1⁹². Ein Effekt in einem vergleichbaren Ausmaß blieb bei der Untersuchung der konstitutiv phosphomimetischen Mutante S14-99-102-139D aus.

Nachfolgend wurde der Einfluss einer längeren, 30-minütigen IGF-1 Inkubation auf I_{Max} des WT, des phosphomimetischen und des phosphoablative HCN4 Konstrukts untersucht. Durch einen einmaligen Spannungssprung auf -150 mV für 7 Sekunden wurde I_{Max} vor und nach einer 30-minütigen Behandlung mit IGF-1 (50 nM) bestimmt. Für diese Analyse wurden die Ganzzellströme derselben Oozyte zu beiden Zeitpunkten gemessen und miteinander verglichen. Dadurch konnten mögliche Unterschiede im Oberflächenexpressionsniveau zwischen den jeweiligen Oozyten ausgeschlossen werden. Angegeben werden neben den absoluten Werten von I_{Max} , Mittelwert $\pm$ Standardfehler. P-Werte wurden mithilfe eines gepaarten *Students T-Tests* bestimmt. Normiert wurde auf I_{Max} vor einer Behandlung mit IGF-1 ($I_{\text{Rel}} = I_{\text{Max}(+IGF-)} / I_{\text{Max}(-IGF-1)}$).

Abb. 24, A zeigt beispielhafte Stromspuren der untersuchten Gruppen während maximaler Kanalaktivierung vor und nach einer Behandlung mit IGF-1 für 30 Minuten⁹².

I_{Max} des WT stieg nach Applikation von IGF-1 im Mittel deutlich an⁹². I_{Max} der Konstrukte S14-99-102-139A und S14-99-102-139D nahm dagegen vergleichsweise gering zu⁹². Der Mittelwert von I_{Max} des WT lag vor IGF-1 bei $3,2 \pm 0,6 \mu\text{A}$ (Abb. 24, C). Nach einer Behandlung stieg I_{Max} auf $8,2 \pm 0,9 \mu\text{A}$ an. Dies entsprach einer signifikanten Zunahme um den Faktor $2,9 \pm 0,3$ ($p=0,00006$). I_{Max} des phosphoablative bzw. phosphomimetischen Konstrukts nahm nach Applikation von IGF-1 deutlich weniger zu (Abb. 24, C)⁹². S14-99-102-139A zeigte dennoch einen signifikanten Anstieg um den Faktor $1,5 \pm 0,04$ von $2,1 \pm 0,5 \mu\text{A}$ auf $3,1 \pm 0,7 \mu\text{A}$ ($p=0,005$). Eine Zunahme von I_{Max} war auch bei S14-99-102-139D zu beobachten⁹². Vor einer Behandlung mit IGF-1 lag I_{Max} bei $7,2 \pm 1,7 \mu\text{A}$. Nach IGF-1 stieg I_{Max} signifikant um das 1,2-fache $\pm 0,3$ auf $8,1 \pm 1,8 \mu\text{A}$ an ($p=0,01$).

Die Konstrukte WT, S14-99-102-139A und S14-99-102-139D wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Daher konnte kein direkter Vergleich der einzelnen Gruppen durchgeführt werden.

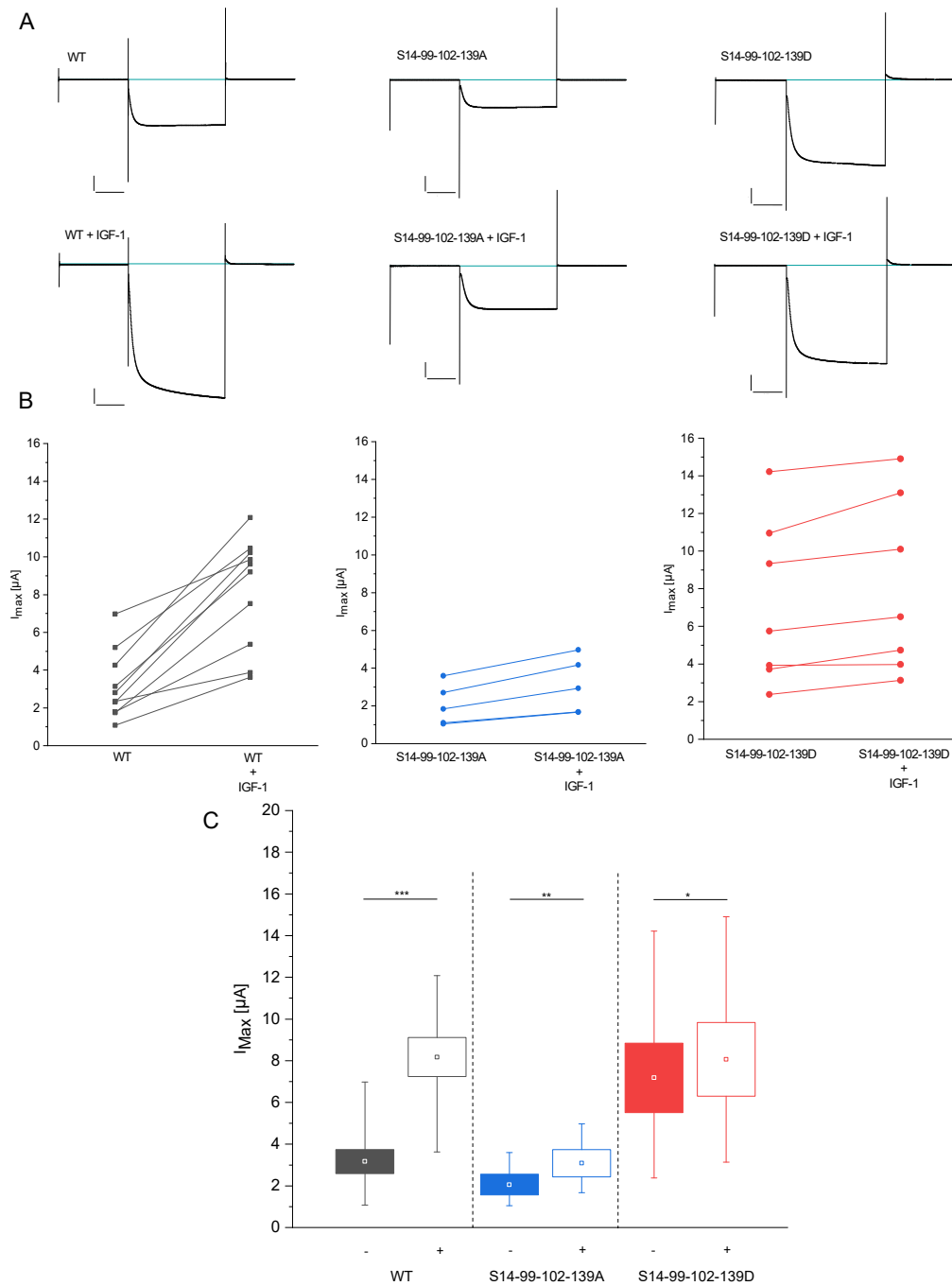


Abb. 24: $I_{\max}$ des phosphoablativen und -mimetischen Konstrukts steigt durch IGF-1 nur gering an.

A: Repräsentative Stromspuren der HCN4 Konstrukte vor und nach einer Behandlung der *Xenopus* Oozyte mit IGF-1 (50 nM, 30 Min). -150 mV wurden einmalig für 7 s appliziert (Haltepotenzial -20 mV) um die maximale Stromamplitude $I_{\max}$ zu messen. Maßstab y-Achse: 1 μA, x-Achse: 2 s; **B:** Entwicklung von $I_{\max}$ von WT (n=10, N=2), S14-99-102-139A (n=5, N=2) und S14-99-102-139D (n=7, N=2) derselben Oozyte vor und nach einer IGF-1-Behandlung; **C:** Boxplot-Darstellung von $I_{\max}$ aus (B) vor (-) und nach (+) IGF-1. $I_{\max}$ des WT liegt bei $3,2 \pm 0,6$ μA und steigt nach der Behandlung mit IGF-1 auf $8,2 \pm 0,9$ μA um den Faktor $2,9 \pm 0,3$ signifikant an ($p=0,00006$). $I_{\max}$ von S14-99-102-139A steigt von $2,1 \pm 0,5$ μA durch eine IGF-1-Behandlung auf $3,1 \pm 0,7$ μA signifikant um den Faktor $1,5 \pm 0,04$ an ($p=0,005$). $I_{\max}$ von S14-99-102-139D liegt zunächst bei $7,2 \pm 1,7$ μA und steigt durch IGF-1 auf $8,1 \pm 1,8$ μA signifikant um den Faktor $1,2 \pm 0,3$ an ($p=0,01$). Im Boxplot sind Mittelwert (Quadrat), Standardfehler (Kasten) sowie das Minimum und Maximum der gemessenen Werte für $I_{\max}$ (Whisker) gezeigt. Angegeben ist der Mittelwert $\pm$ Standardfehler. P-Werte wurden mithilfe eines gepaarten *Students T-Tests* berechnet. Die Messungen der jeweiligen Gruppen stammen aus unterschiedlichen Messwochen (Trennlinien). μA: Mikroampere, I: elektrische Stromstärke. Abb. in Anlehnung an Erlenhardt *et al.*⁹²

3.2.5 In *Xenopus* Oozyten ändert IGF-1 die spannungsabhängige Aktivierung des HCN4 Wild-Typs nicht

Abschließend wurde die spannungsabhängige Aktivierung des WT vor und nach einer Inkubation mit IGF-1 durch Analyse der Aktivierungskurve und der Aktivierungskinetik τ_{Akt} charakterisiert. Hierfür wurde das in Kapitel 2.5.3 beschriebene Spannungsprotokoll angewandt (Abb. 9). $V_{1/2}$ des WT betrug nach Anpassung der Kurve an eine modifizierte Boltzmann-Funktion $-96,4 \pm 1,0$ mV (Abb. 25). Nach einer 30-minütigen Inkubation mit IGF-1 ergab sich für $V_{1/2}$ $-98,3 \pm 1,5$ mV. $V_{1/2}$ der beiden Gruppen unterschied sich nicht signifikant⁹². Auch die Aktivierungszeitkonstante τ_{Akt} des WT änderte sich zwischen -150 und -100 mV durch eine Behandlung der Oozyte mit dem Wachstumsfaktor nicht⁹². Angegeben wurde der Mittelwert $\pm$ Standardfehler von $V_{1/2}$. P-Werte wurden mithilfe eines ungepaarten *Students T-Tests* berechnet.

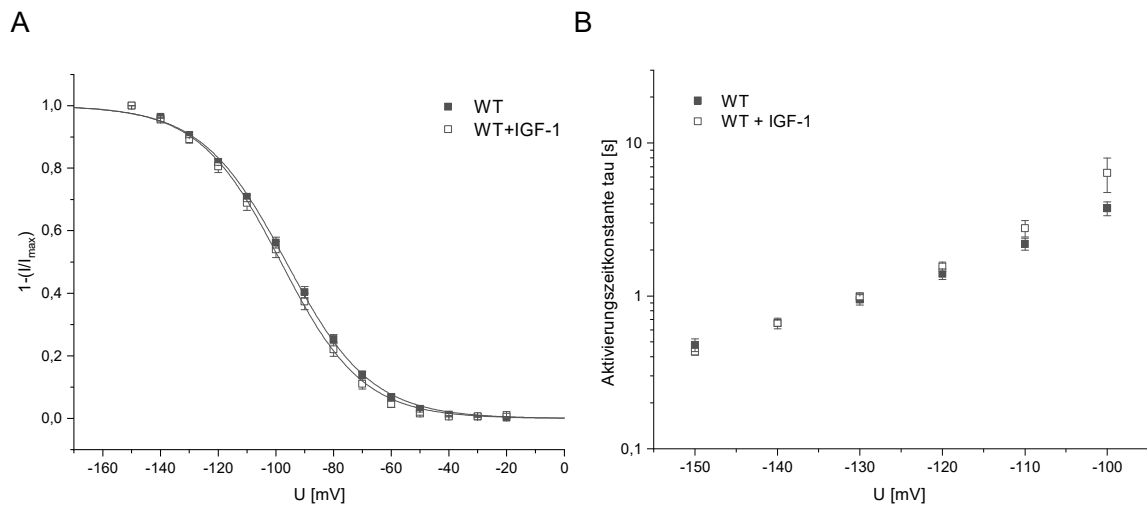


Abb. 25: Eine IGF-1 Behandlung führt nicht zu einer Änderung der spannungsabhängigen Aktivierung des HCN4 Wild-Typs in *Xenopus* Oozyten.

A: Aktivierungskurve des HCN4 Wild-Typs (WT) vor und nach Inkubation (30 Minuten) mit IGF-1 (50 nM). Aktivierungskurve nach Auswertung des Stroms bei maximaler Aktivierung nach Spannungssprüngen zwischen -150 und -20 mV und Anpassung an eine modifizierte Boltzmann-Funktion. $V_{1/2}$ des WT beträgt $-96,4 \pm 1,0$ mV (Steigungsfaktor $14,5 \pm 0,3$ mV; $n=16$, $N=8$). Für $V_{1/2(WT+IGF-1)}$ gilt $-98,3 \pm 1,5$ mV ($p=0,3$), (Steigungsfaktor $14,0 \pm 0,5$ mV; $n=8$, $N=2$); **B:** Die Aktivierungszeitkonstanten tau (τ_{Akt}) zwischen -150 und -100 mV des WT unterscheiden sich vor ($n=15$) und nach ($n=8$) einer IGF-1 Behandlung (30 min) nicht; angegeben ist der Mittelwert $\pm$ Standardfehler. P-Werte für $V_{1/2}$ wurden mithilfe eines ungepaarten *Students T-Tests* bestimmt; mV: Millivolt, I: elektrische Stromstärke, s: Sekunde. Abb. in Anlehnung an Erlenhardt *et al.*⁹²

4 Diskussion

4.1 Identifizierung und zellbiologische Charakterisierung der Variante HCN4 V759I

In der vorliegenden Arbeit wurde die genetische Variante V759I des kardialen Schrittmacherkanals HCN4 bei einer Patientin mit symptomatischer Sinusknotendysfunktion identifiziert. Verschiedene Mutationen des Ionenkanals konnten bereits in Verbindung mit diesem Krankheitsbild gebracht werden⁶⁴. Somit stellte sich die Frage, ob HCN4 V759I eine Ursache für die Symptomatik der Patientin sein könnte. Neben der molekulargenetischen Untersuchung des HCN4 Gens wurde in dieser Arbeit das Expressionsmuster der identifizierten Variante zellbiologisch analysiert.

Das folgende Kapitel der Diskussion ist an die Publikation von Erlenhardt *et al.* angelehnt, in der ein Teil der vorgestellten Ergebnisse sowie weiterführende Daten bereits veröffentlicht wurden⁸⁴. Teile aus der genannten Arbeit werden in der folgenden Darstellung in wörtlicher Übersetzung verwendet⁸⁴.

In der kardiologischen Diagnostik der vorgestellten Indexpatientin konnte eine ausgeprägte Sinusbradykardie mit eingeschränkter Herzfrequenzsteigerung während körperlicher Belastung (chronotrope Inkompetenz) beobachtet werden⁸⁴. Da metabolische, Drogen-assoziierte oder strukturelle Ursachen ausgeschlossen worden waren, wurde die Diagnose einer idiopathischen Sinusknotendysfunktion (Sick-Sinus-Syndroms, SSS) gestellt⁸⁴. Als Therapie der Wahl erfolgte die Implantation eines Herzschrittmachers⁸⁴. Aufgrund einer auffälligen Familienanamnese lag die Vermutung nahe, dass die Symptomatik der Patientin einen genetischen Ursprung besaß⁸⁴.

In der molekulargenetischen Analyse wurden alle acht Exons des HCN4 Gens der Patientin auf Mutationen untersucht⁸⁴. Dabei konnte die monoallelische Missense-Mutation c.2275G>A identifiziert werden, die zu einem Austausch der Aminosäure Valin zu Isoleucin an Position 759 (V759I) im HCN4 Protein führt⁸⁴.

Im *genomic evolutionary rate profiling score*, einem Punktescore zur Beschreibung des Grades der Konservierung einer Aminosäure, erreicht V759 einen Wert von 3,45 und ist bis zur Stufe der Reptilien in HCN Kanälen konserviert^{84, 88}. Laut *Exome Variant Server (National Heart, Lung, and Blood Institute Exome Variant Server, <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>)* stellt die Variante mit einer Häufigkeit von 0,6% in einer europäischen und 0,1% in einer afrikanisch-amerikanischen Population eine seltene Variante des HCN4 Kanals dar⁸⁴.

Genetische Analysen beschrieben V759I als assoziiert mit Fällen des plötzlichen Kindstods und der malignen Epilepsie^{88, 89}. Die identifizierte Variante war daher als potenziell pathogen einzustufen⁸⁴.

Genetische Erkrankungen des HCN4 Kanals gehen häufig mit Veränderungen des *gating* einher⁶⁴. Sie können jedoch auch weitere Mechanismen beeinträchtigen, die zur Funktionsweise des Kanals beitragen. Beispielsweise können Änderungen der Ionenkanaldichte an der Zelloberfläche weitreichende Auswirkungen auf die Erregbarkeit von Zellen haben⁵³. V759I befindet sich im distalen zytoplasmatischen C-Terminus des HCN4 Proteins, in direkter Nähe zur CNBD⁸⁴. Da dieser Bereich eine entscheidende Rolle im subzellulären Transport (*trafficking*) des Kanals spielt, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Oberflächen- und Gesamtexpression der HCN4 Variante untersucht⁸³.

Zunächst erfolgten rekombinante Oberflächenexpressionsanalysen in CHO-Zellen. Um eine Beeinträchtigung der Oberflächenexpression durch externe Einflüsse, wie beispielsweise die Verwendung unterschiedlicher Vektoren und Antikörper-*tags*, zu verhindern, befanden sich die untersuchten HCN4 Konstrukte in demselben Vektor (pEGFP-N1) und wurden über dasselbe *tag* (HA-*tag*) detektiert. HCN4 V759I zeigte eine signifikante Reduktion des Oberflächensignals im Vergleich zum WT. Diese Beobachtung konnte in darauffolgenden Analysen mehrfach reproduziert werden. Eine Western Blot Analyse verglich anschließend die Gesamtexpression von WT und V759I in CHO-Zellen. Die Quantifizierung der Bandenintensität des WT und der Variante ergab eine größere Gesamtexpression von V759I, die jedoch nicht signifikant ausfiel. In der Zusammenschau könnte dies darauf hindeuten, dass V759I den subzellulären Transport, insbesondere das *anterograde trafficking* des HCN4 Proteins zur Zelloberfläche stört oder zu einer vermehrten Internalisierungsrate der Variante in CHO-Zellen führt und somit die Expression des HCN4 an der Zellberfläche reduziert.

Symptomatische Mutationen können neben dem Homotetramer auch die Kanaleigenschaften der heterotetrameren Konformationen aus WT und Mutante modulieren. Im Fall der Mutante HCN4 K530N, die in Verbindung mit atrialen Tachyarrhythmien steht, war ein Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit ausschließlich im heterotetrameren Kanalkomplex zu beobachten⁹³.

Im konkreten Fall der hier untersuchten Variante, handelt es sich um eine heterozygote Mutation, die sich auf einem der beiden Allele der Indexpatientin befindet⁸⁴. Um diese Heterozygotie *in vitro* zu imitieren und die Oberflächenexpression des Heterotetramers aus WT und V759I zu untersuchen, wurden die beiden Konstrukte in einem Verhältnis von 1:1 in CHO-Zellen kotransfiziert und das Niveau ihrer Oberflächenexpression quantifiziert. Im Heterotetramer WT/V759I war das Signal der WT-Untereinheit im Vergleich zum Signal des homotetrameren WT signifikant reduziert. V759I hingegen wies im Heterotetramer WT/V759I ein um etwa denselben Faktor, jedoch nicht signifikant, gesteigertes Oberflächensignal im Vergleich zum Homotetramer der Variante auf.

Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass V759I in der heterotetrameren Konformation bevorzugt an der Zelloberfläche von CHO-Zellen exprimiert wird. Ein Vergleich der Oberflächen- und Gesamtexpression des Heterotetramers WT/V759I, ohne zwischen den jeweiligen Untereinheiten zu unterscheiden, mit dem homotetrameren WT wäre in einem anschließenden Schritt wichtig. Dies würde zu einer Differenzierung zwischen einer Änderung der Gesamtexpression der Heterotetramere oder einer Änderung des Verhältnisses der Untereinheiten WT und Variante an der CHO-Zelloberfläche beitragen.

In Ergänzung zu den zellbiologischen Untersuchungen dieser Arbeit analysierte Dr. Olaf Kletke die biophysikalischen Eigenschaften von V759I. WT und V759I wurden rekombinant in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und die spannungsabhängige Kanalaktivierung mithilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme ausgewertet. Dabei konnte keine Änderung von $V_{1/2}$ und der Aktivierungskinetik durch den Aminosäureaustausch V759I beobachtet werden (Abb. 27)⁸⁴. Die spannungsabhängige Aktivierung des Heterotetramers WT/V759I zeigte ebenfalls keine Verschiebung der Aktivierungskurve⁸⁴. Sowohl das Homotetramer V759I als auch das Heterotetramer WT/V759I scheinen das *gating* der HCN4 Kanalaktivierung nicht zu beeinflussen (Abb. 27)⁸⁴.

Da neben HCN4 die Isoformen HCN1 und HCN2 zu I_f beitragen, kann eine Einflussnahme von V759I auf die Tetramerisierung mit anderen Isoformen an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden^{28, 84}. Dies gilt sowohl für die biophysikalischen als auch zellbiologischen Eigenschaften.

Die Interaktion von HCN Kanälen mit dem *second messenger* cAMP spielt eine zentrale Rolle in der β -adrenergen Modulation von I_f ⁵⁷. Daher erweiterte Marlene Komadowski vom Institut für Physiologie und Pathophysiologie des Marburg *Center for Mind, Brain and Behavior* die elektrophysiologischen Untersuchungen von Dr. Olaf Kletke. Sie zeigte in *inside-out patches* an Oozyten, dass cAMP das spannungsabhängige Schaltverhalten von WT und V759I in gleichem Ausmaß moduliert⁸⁴. cAMP verschob die Aktivierungskurve beider HCN4 Konstrukte zu positiveren Membranpotenzialen (Abb. 27)⁸⁴.

In *Xenopus* Oozyten beeinflusst die Variante V759I daher keine der drei wichtigen Faktoren des HCN4 Stroms, die zur Schrittmacherfunktion des Sinusknotens beitragen. Weder die spannungsabhängige Aktivierung, die Kinetik noch die Modulation durch cAMP wird durch die Mutation beeinträchtigt⁸⁴.

Eine zusätzliche Analyse von viral transduzierten Kardiomyozyten der neonatalen Ratte untersuchte die Oberflächenexpression von V759I in einem nativen Zellsystem⁸⁴. Die Immunzytochemiefärbungen, durchgeführt von Dr. Nadine Erlenhardt, lieferten keine Hinweise auf eine eingeschränkte Oberflächenexpression von V759I (Abb. 26)⁸⁴. Zudem akkumulierte V759I in einer vergleichbaren Intensität wie der WT im endozytotischen Recyclingkompartiment⁸⁴. Diese ausgeprägte juxtanukleäre Proteinanreicherung ist charakteristisch für HCN4 Kanäle und spielt eine wichtige Rolle in der dynamischen Aufrechterhaltung der Oberflächenpopulation⁸³. Sowohl das Recycling als auch die Oberflächenexpression des HCN4 scheinen in diesen Zellen durch V759I unbeeinflusst zu sein⁸⁴.

Die Diskrepanz der Oberflächenexpressionsanalysen zwischen CHO-Zellen und Kardiomyozyten könnte auf Unterschieden der beiden Expressionssysteme beruhen. So ist z.B. der spannungsabhängige Strom des K^+ -Kanals Kv1.5 in HEK293-Zellen verändert, da diese Zelllinie eine modulierende β -Untereinheit des Kanals nicht endogen exprimiert⁹⁴.

In CHO-Zellen beobachteten Liao *et al.* eine cAMP-unabhängige Aufhebung der Autoinhibition des HCN4 Kanals, die in HEK293-Zellen nicht zu sehen war⁹⁵. Insbesondere der C-Terminus von AS 719-1012 des HCN4 scheint mit einer noch unbekannten, endogenen Struktur der CHO-Zelle zu interagieren und bei der fehlenden cAMP-Wirkung eine Rolle zu spielen.

Dieselbe Arbeitsgruppe identifizierte anschließend zwei Interaktionspartner des HCN4 Kanals (LRMP, *lymphoid-restricted membrane protein* und IRAG, *inositol 1,4,5-tri- sphosphate receptor-associated guanylate kinase substrate*), die endogen in CHO-Zellen vorkommen, das Schaltverhalten des Kanals beeinflussen und deren Transkription in HEK-Zellen um ein Vielfaches reduziert ist⁹⁶. Insbesondere LRMP scheint für das Fehlen einer cAMP-Wirkung in CHO-Zellen entscheidend zu sein. Da LRMP und IRAG keine Auswirkung auf die maximale Stromamplitude von HCN4 haben, scheinen sie keinen Einfluss auf das *trafficking* zu haben. Weitere Copräzipitate des HCN Kanalkomplexes in einer Immunopräzipitation deuten auf das Vorkommen weiterer endogener

Interaktionspartner in CHO-Zellen hin⁹⁶. V759I könnte die Interaktion mit einem solchen stören und das *trafficking* der Variante beeinflussen.

Weiterführende umfangreiche Analysen sind notwendig, um diese Hypothese zu untersuchen. Die diskrepanten Ergebnisse aus CHO-Zellen und Kardiomyozyten zeigen, dass nicht alle Eigenschaften nativer Ionenkanäle in rekombinanten Expressionssystemen zuverlässig widergespiegelt werden.

HCN4 Kanäle werden auch im ZNS exprimiert¹³. PEX5R/Trip8b ist eine β -Untereinheit des neuronalen HCN Kanalkomplexes^{48, 97}. Durch Bindung u.a. an den distalen C-Terminus und die CNBD des Kanals antagonisiert PEX5R/Trip8b die Wirkung von cAMP und ändert entsprechend die Spannungsabhängigkeit und Aktivierungsgeschwindigkeit⁴⁸⁻⁵⁰. Da die hier untersuchte Variante V759I bereits mit Fällen der malignen Epilepsie in Verbindung gebracht wurde, könnte die C-Terminal gelegene Mutation die Interaktion mit dem Bindungspartner beeinflussen⁸⁹. Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Zunahme des Oberflächensignals von WT und V759I durch die PEX5R/Trip8b Isoform 1a-4 war für den WT in CHO-Zellen statistisch zwar nicht signifikant. Beide Kanalvarianten zeigten jedoch eine eindeutig zunehmende Entwicklung ihrer Oberflächenexpression durch die Koexpression von PEX5R/Trip8b 1a-4.

Aufgrund eines umfangreichen alternativen *splicing* des N-Terminus, liegen mehrere Isoformen von PEX5R/Trip8b mit unterschiedlich zusammengesetzten N-Termini vor⁵¹. Die Oberflächenexpression von HCN Kanälen kann je nach PEX5R/Trip8b Isoform und Expressionssystem auf unterschiedliche Weise moduliert werden⁵¹. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen im Einvernehmen mit der Zunahme der Stromdichte des HCN1 bzw. der Expression des HCN1 an der Zelloberfläche durch PEX5R/Trip8b 1a-4 in *Xenopus* Oozyten sowie hippocampalen Neuronen⁹¹. Sie zeigen erstmalig, dass die Isoform PEX5R/Trip8b 1a-4 zu einer Steigerung der Oberflächenexpression des Kanals führt.

Dr. Olaf Kletke bestätigte ebenfalls eine Wirkung von PEX5R/Trip8b auf Ebene der Spannungsabhängigkeit und der Aktivierungskinetik von WT und der Variante mithilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an Oozyten. Eine Verschiebung der Aktivierungskurve hin zu hyperpolarisierenden Spannungen sowie eine Verlängerung der Aktivierungszeitkonstante durch PEX5R/Trip8b war in gleichem Ausmaß sowohl für den WT als auch V759I zu beobachten (Abb. 27)⁸⁴. V759I scheint die Interaktion zwischen HCN4 Kanälen und PEX5R/Trip8b nicht zu stören⁸⁴.

Einschränkungen der Biophysik, der Prozessierung und des Transportes des Kanals zur Zelloberfläche durch V759I konnten von Erlenhardt *et al.* in *Xenopus* Oozyten und nativen Zellen nicht nachgewiesen werden⁸⁴. Auf diesen Erkenntnissen basierend ist V759I nicht als alleinige Ursache der diagnostizierten Sinusknotendysfunktion der Patientin zu werten. Dies stimmt mit einer verhältnismäßig geringen Veränderung der physikochemischen Eigenschaften durch einen Aminosäureaustausch von Valin mit Isoleucin überein (*Grantham Score* von 29)^{84, 98}. Das Fehlen der heterozygoten Mutation in der Analyse des HCN4 Gens der Mutter der Indexpatientin bestätigte diese Schlussfolgerung⁸⁴. Diese litt ebenfalls unter einer behandlungsbedürftigen Sinusknotendysfunktion, trug aber auf keinem der beiden Allele die HCN4 Variante V759I.

Seltenere genetische Mutationen von Ionenkanälen beispielsweise des Na⁺-Kanals SCN5A (*sodium voltage-gated channel alpha subunit 5*) oder kardialen Interaktionspartnern des HCN4

Membrankomplexes, wie beispielsweise KCNE2, können eine Rolle in der Pathogenese hereditärer Sinusknotendysfunktionen spielen^{41, 64, 99}. Dass genetische Mutationen von Interaktionspartnern die Funktionalität des HCN Kanalkomplexes und I_f beeinflussen, oder dass Beeinträchtigungen anderer Ionenkanäle zur Klinik der Patientin beitragen, kann nicht ausgeschlossen werden⁸⁴. Mehrere Fallbeispiele des SSS waren nicht auf einen einzelnen Ionenkanaldefekt zurückzuführen¹⁰⁰. Die Ätiologie der Sinusknotenerkrankung der vorgestellten Indexpatientin scheint auf einer multifaktoriellen Genese zu basieren⁸⁴. Weitere Strukturen und Mechanismen, wie *gap junctions* und intrazelluläre Signalkaskaden, leisten neben Ionenkanalströmen einen wichtigen Beitrag zur Entstehung einer rhythmischen Herzaktion⁸⁴. Fehlerhafte Funktionen verschiedener Regulatoren können das fein aufeinander abgestimmte System des Sinusknotens stören und zu einer Dysfunktion mit klinischer Manifestation führen⁶². Daher ist eine Differenzierung zwischen Genotyp und Phänotyp, zwischen Mutation und Variante sowie zwischen Erkenntnissen aus nativen und heterologen Zellsystemen in der Beurteilung molekulargenetischer Erkrankungen der Kardiologie unerlässlich¹⁰¹. Diese Arbeit unterstreicht im Kontext der Publikation von Erlenhardt *et al.* die Wichtigkeit einer kritischen Interpretation von genetischen Analysen hereditärer Arrhythmien⁸⁴.

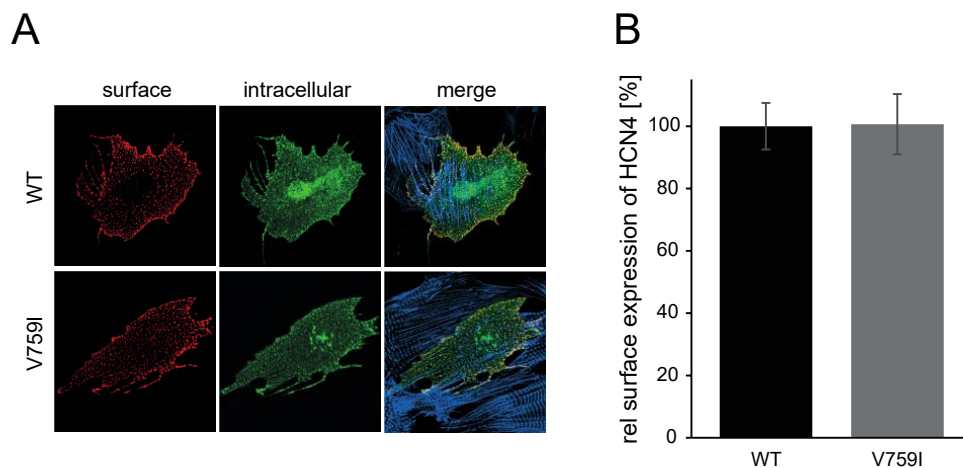


Abb. 26: In Kardiomyozyten beeinträchtigt V759I die Oberflächenexpression nicht.

A: Repräsentative Immunzytochemiefärbungen neonataler Kardiomyozyten der Ratte nach viraler Transduktion mit HCN4 Wild-Typ (WT) oder HCN4 V759I vor (*surface*) bzw. nach (*intracellular*) Permeabilisierung der Zellmembran; **B:** Relatives Oberflächenexpressionsniveau von WT und Variante V759I nach Normierung der Signale auf den WT. Der Transport der Variante zur Zelloberfläche wird von V759I nicht beeinträchtigt; Abb. mit freundlicher Genehmigung des Verlages unverändert übernommen aus Erlenhardt *et al.*⁸⁴

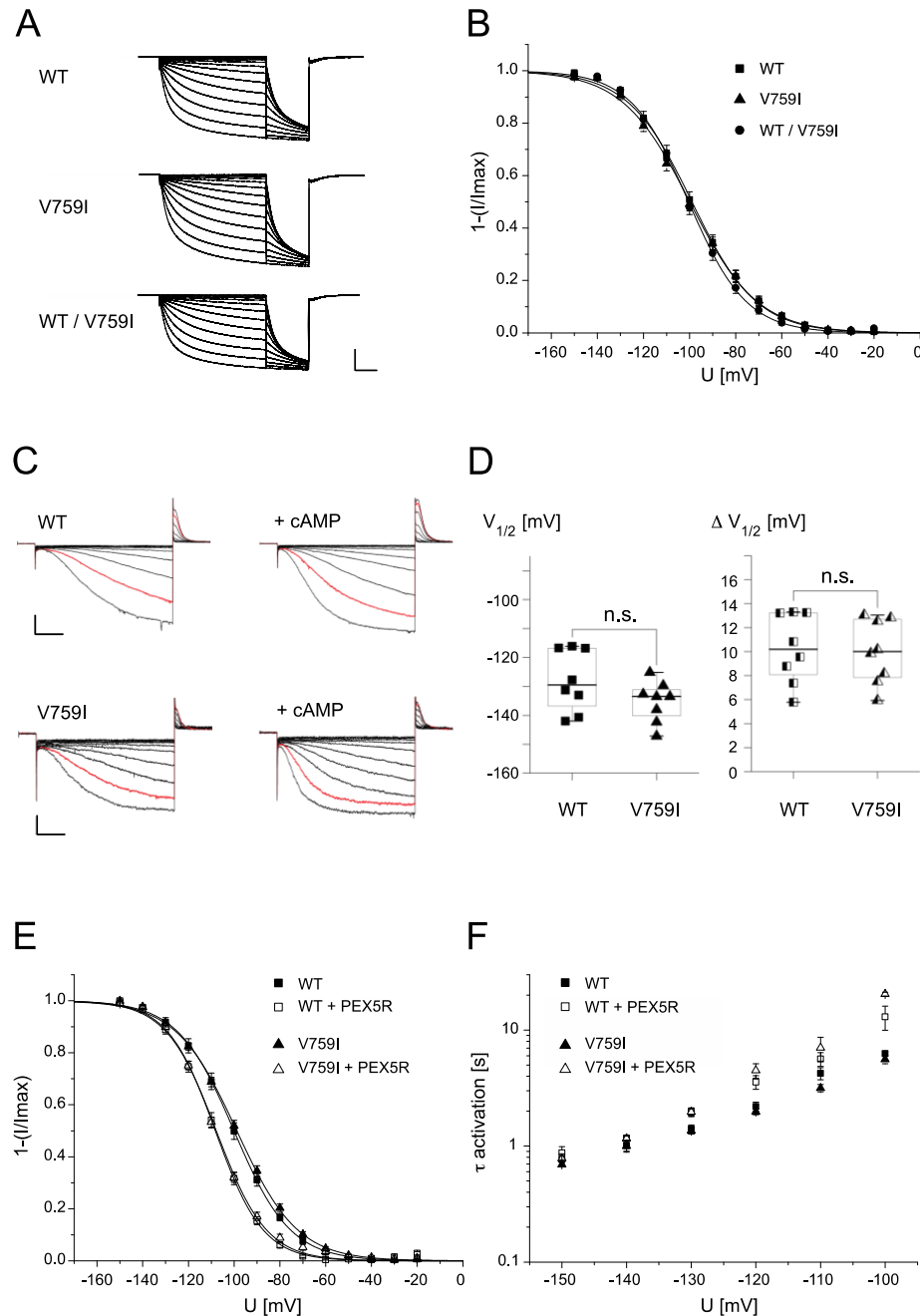


Abb. 27: V759I beeinflusst die spannungsabhängige Aktivierung, die Aktivierungskinetik sowie die cAMP-Abhängigkeit des HCN4 Kanals nicht.

A: Repräsentative Beispielströme von HCN4 Wild-Typ (WT), HCN4 V759I und der Heterotetramers WT/V759I in *Xenopus laevis* Oozyten gemessen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme; **B:** Die Aktivierungskurven der spannungsabhängigen Kanalaktivierung von WT, V759I und des Heterotetramers WT/V759I unterscheiden sich nicht signifikant. **C:** Repräsentative Beispielströme von WT und V759I aus *inside-out patches* von *Xenopus* Oozyten nach hyperpolarisierenden Spannungen zwischen -60 und -160 mV ohne bzw. mit cAMP; **D:** Boxplot-Darstellung der Werte von $V_{1/2}$ von WT und V759I aus *inside-out patches* vor der Applikation von cAMP (links), cAMP-abhängige Verschiebung von $V_{1/2}$ von WT und V759I (rechts); **E:** Aktivierungskurve von WT und V759I aus *Xenopus* Oozyten aus Messungen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme ohne bzw. mit Koexpression des neuronalen Interaktionspartner PEX5R/Trip8b, PEX5R/Trip8b verschiebt die Aktivierungskurven von WT und V759I in gleichem Maße; **F:** Aktivierungszeitkonstante tau von WT und V759I nach monoexponentiellem Fit der initialen Stromantwort auf hyperpolarisierende Spannungen der *Xenopus* Oozyten; mV: Millivolt, I: elektrische Stromstärke, U: elektrische Stromspannung, s: Sekunde; Abb. mit freundlicher Genehmigung des Verlages unverändert übernommen aus Erlenhardt *et al.*⁸⁴

4.2 Einfluss des IGF-1/AKT-Signalwegs auf elektrophysiologische Eigenschaften des HCN4 Stroms

Signalwege beeinflussen auf verschiedene Weise die Funktion von Ionenkanälen und ermöglichen eine dynamische Anpassung der Kanalaktivität an veränderte Bedingungen der Zelle. Eine Phosphoproteom-Analyse von Reinartz *et al.* in HL-1 Kardiomyozyten der Ratte hatte vier Serin-Reste des HCN4 Kanals (S14, S99, S102 und S139) identifiziert, deren Phosphorylierung AKT-abhängig reguliert wird⁷⁵. Auf diesen Erkenntnissen aufbauend wurde in der vorliegenden Arbeit eine AKT-abhängige Phosphorylierung des HCN4 Kanals mittels phosphomimetischer und phosphoablativer HCN4 Mutanten imitiert. Mithilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme wurden die biophysikalischen Eigenschaften der spannungsabhängigen Kanalaktivierung des modifizierten Ionenkanals in *Xenopus laevis* Oozyten analysiert. Daran anschließend erfolgte eine Untersuchung eines akuten Einflusses des Wachstumsfaktors IGF-1, neben Insulin ein kompetenter Aktivator der AKT, auf den Ionenkanal.

Ein Teil der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse sowie daran anknüpfende Analysen wurden im Rahmen einer Publikation veröffentlicht⁹². Sie werden im folgenden Abschnitt der Diskussion in Anlehnung an diese Veröffentlichung dargestellt.

4.2.1 Keine Änderung der spannungsabhängigen Kanalaktivierung zwischen AKT-abhängig phosphomimetischen und phosphoablativen HCN4 Konstrukten

Proteinkinasen beeinflussen HCN Kanäle und I_f bzw. I_h ³³. Beispielsweise moduliert sowohl eine Aktivierung als auch eine Inhibition der Proteinkinase *p38 Mitogen-Activated Protein Kinase* die spannungsabhängige Aktivierung von I_h in hippokampalen Neuronen¹⁰². Eine Phosphorylierung des C-Terminus von HCN2 und HCN4 durch die Kinase Src führt in heterologen Expressionssystemen und nativen Zellen zu einer beschleunigten Kanalaktivierung sowie einer kontrovers diskutierten Verschiebung von $V_{1/2}$ ^{103, 104}.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst der Einfluss einer AKT-abhängigen Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung der vier N-terminal gelegenen Serin-Reste des HCN4 Kanals auf die spannungsabhängige Kanalaktivierung untersucht. Zwischen den phosphomimetischen (HCN4 S14D, HCN4 S99-102D, HCN4 S139D) und phosphoablativen (HCN4 S14A, HCN4 S99-102A, HCN4 S139A) Konstrukten wurde keine Änderung der Aktivierungskurve gezeigt. Eine Analyse der Konstrukte mit allen vier Punktmutationen (HCN4 S14-99-102-139A, HCN4 S14-99-102-139D) bestätigte diese Beobachtung. Die Spannung der halbmaximalen Kanalaktivierung unterschied sich zwischen dem jeweils konstitutiv phosphomimetischen und phosphoablativen Zustand nicht⁹². Die Bestimmung der Zeitkonstante der spannungsgesteuerten Aktivierung ergab zwischen phosphomimetischen und phosphoablativen Kanalkonstrukten ebenfalls keine Änderungen von τ_{Akt} . Lediglich HCN4 S139A wies bei -110 mV und -120 mV eine raschere Aktivierung als HCN4 S139D auf. Bei negativeren und positiveren Spannungen konnte kein signifikanter Unterschied in τ_{Akt} gezeigt werden. Die Konstrukte HCN4 S14-99-102-139A und HCN4 S14-99-102-139D wiesen keine Unterschiede in der Aktivierungskinetik auf⁹².

Somit bleibt festzuhalten, dass eine Phosphorylierung der vier Serin-Reste weder die Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung noch die Kinetik des HCN4 in *Xenopus* Oozyten beeinflusst⁹².

In einer neuen Studie untersuchten Lu *et al.* den Einfluss von PI3K bzw. AKT auf den HCN2 Kanal in HEK293-Zellen¹⁰⁵. Dabei wurde eine negative Verschiebung der Aktivierungskurve und eine Abnahme der Dichte des HCN2 Stroms durch die Inhibition von PI3K und AKT beobachtet. Die Autoren vermuteten eine Modifizierung des homotetrameren HCN2 Kanals durch PI3K über eine AKT-abhängige Phosphorylierung an Position S861. Eine zuvor in Sinusknotenzellen des Hasen beobachtete Abnahme der Stromdichte, Verschiebung der Aktivierungskurve und Abnahme der Aktivierungskinetik von I_f durch eine PI3K Inhibition, konnte von Lu *et al.* wider Erwarten durch eine Hemmung von AKT nicht reproduziert werden¹⁰⁶. Dies wurde damit begründet, dass eine AKT-abhängige Regulation Isoform-spezifisch sein könnte und HCN4 und HCN1 möglicherweise nicht betrifft bzw. dass eine PI3K-aktivierte Kinase AKT-unabhängig I_f in Sinusknotenzellen beeinflussen könnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen keinen Unterschied in der spannungsabhängigen Kanalaktivierung der AKT-abhängig phosphomimetischen und phosphoablativen HCN4 Konstrukte (Abb. 20)⁹². Diese Beobachtung könnte mit der Vermutung von Lu *et al.* übereinstimmen, dass eine AKT-Inhibition die Spannungsabhängigkeit der Isoform HCN4 nicht moduliert¹⁰⁵. Die hier untersuchten Serin-Reste befinden sich im N-Terminus des HCN4. Ob AKT-abhängig weitere Aminosäurereste des HCN4 phosphoryliert werden, die einen Einfluss auf das *gating* des Kanals ausüben, kann nicht ausgeschlossen werden. Lu *et al.* identifizierten S861 im C-Terminus des HCN2 als vermittelnden Phosphorylierungsrest des PI3K/AKT-abhängigen Effekts¹⁰⁵. Zudem wurden zwei potenzielle AKT-Phosphorylierungsstellen des HCN4 (S14, S1184) beschrieben, wovon nur S14 mit den in dieser Arbeit untersuchten Serin-Resten übereinstimmt und die Kanalaktivierung in Oozyten nicht beeinflusst.

Die Identifizierung von S14, S99, S102 und S139, auf die diese Arbeit aufbaut, erfolgte anhand eines stabilen *knock-downs* von AKT1 und AKT2⁷⁵. Ungeklärt bleibt, ob diese Serinreste direkt oder indirekt über einen AKT-regulierten Signalweg phosphoryliert werden⁹². Zudem wurden S14 und S99 neben weiteren Aminosäureresten im N-Terminus des HCN4 (S110, S117) bereits als putative Zielstrukturen einer PKA-abhängigen Phosphorylierung beschrieben^{55, 92}. Die Konsensussequenzen beider Serin-/Threoninkinasen PKA mit R-R/K-X-S/T und AKT mit R-X-R-X-X-S/T ähneln sich durchaus^{76, 107}. S14, S99, S110 und S117 waren nicht an einer PKA-abhängigen Änderung des *gating* beteiligt⁵⁵. Ihre Mutationen nach Alanin (HCN4-Nx4) führte in CHO-Zellen jedoch zu einer signifikanten Verschiebung der Aktivierungskurve des HCN4 Stroms zu negativeren Potenzialen. Eine solche wurde zwischen den phosphomimetischen und phosphoablativen Konstrukten HCN4 S14D bzw. S99-102D und HCN4 S14A bzw. S99-102A im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet (Abb. 20). Möglicherweise sind S110 und S117 an der von Liao *et al.* beobachteten Änderung des *gating* beteiligt⁵⁵.

Weitere elektrophysiologische Parameter wie die Kanaldeaktivierung und die Einzelkanalleitfähigkeit wurden in dieser Arbeit nicht untersucht, sodass eine AKT-abhängige

Modulation dieser Parameter nicht ausgeschlossen werden kann. Zudem ist festzuhalten, dass die Imitation einer Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung über Punktmutationen nur eine Möglichkeit darstellt, die Wirkung einer Proteinkinase auf ein Protein zu untersuchen, und setzt voraus, dass alle putativ phosphorylierten Aminosäurereste der Kinase und des jenseitsgelegenen Signalweges bekannt sind. Weitere Serin-/Threoninreste des HCN4, beispielsweise S1184 im C-Terminus, könnten Zielstrukturen einer direkten oder indirekten AKT-vermittelten Phosphorylierung sein¹⁰⁵. Eine Koexpression der aktivierten bzw. inaktivierten AKT-Variante (AKT T308D/S473D bzw. AKT T308A/S473A) mit dem HCN4 und den in dieser Arbeit generierten Konstrukten, oder der Einsatz spezifischer AKT-Inhibitoren und -Aktivatoren, könnte das Zusammenspiel von AKT und HCN4 weiter untersuchen.

4.2.2 Eine akute Applikation von IGF-1 erhöht I_{Max} des HCN4 im heterologen Expressionssystem der *Xenopus* Oozyte

IGF-1 aktiviert *via* PI3K die Proteinkinase AKT, die weitere Kinasen, Enzyme und Transkriptionsfaktoren sowie Regulatoren des vesikulären Transports reguliert⁷⁶. In einem weiteren Schritt dieser Arbeit wurden die Stromamplitude bei maximaler Kanalaktivierung und die spannungsabhängige Aktivierung des HCN4 während bzw. nach einer kurzen Inkubation mit IGF-1 untersucht. Eine Änderung von $V_{1/2}$ oder der Zeitkonstante τ_{Akt} des WT durch IGF-1 konnte nicht beobachtet werden (Abb. 25)⁹². 30 Minuten nach einer Behandlung der Oozyte mit dem Wachstumsfaktor zeigte sich keine Verschiebung der Aktivierungskurve oder eine Änderung von τ_{Akt} ⁹². Stattdessen wurde eine deutliche Zunahme der maximalen Stromamplitude I_{Max} während bzw. nach einer Behandlung der Oozyte mit IGF-1 beobachtet⁹². Der Anstieg von I_{Max} begann bereits wenige Minuten nach dem Beginn einer IGF-1 Behandlung (Abb. 23)⁹². Die weitere Entwicklung der maximalen Stromamplitude ähnelte einer sigmoidal verlaufenden Kurve, die einen *steady-state* Status anstrebt. Dieser schien unter den gegebenen experimentellen Bedingungen nach 10 Minuten annähernd erreicht worden zu sein (Abb. 23).

Insulin, ebenfalls ein AKT-Aktivator mit hoher Überschneidung zu IGF-1-aktivierten Signalwegen, steigert die Offenwahrscheinlichkeit des TRPV1 Kanals (*transient receptor potential channel 1*) in *dorsal root ganglion* Neuronen, ohne die Amplitude des Einzelkanalstroms zu ändern¹⁰⁸.

Auch Williams *et al.* untersuchten die Auswirkung von Signalwegen auf die maximale Amplitude von I_h ¹⁰⁹. Nach vermehrter Tyrosin Phosphorylierung durch Inhibition der Tyrosin Phosphatase in CA1-Neuronen des Hippocampus von Ratten nahm die maximale Amplitude von I_h ab. Da die Anzahl der HCN1 Kanäle an der Zelloberfläche unverändert blieb, wurde eine Abnahme der Einzelkanalleitfähigkeit als Ursache diskutiert.

In dieser Arbeit führte IGF-1 nicht zu einer Verschiebung der Aktivierungskurve oder einer Änderung der Kanalöffnung des HCN4 (Abb. 25)⁹². Eine Untersuchung der Einzelkanalleitfähigkeit war mit der hier angewandten Zwei-Elektroden-Spannungsklemme nicht möglich. Die *patch-clamp*-Technik wäre hierfür die geeignete Methode, da dieses Messverfahren durch die Isolierung einzelner Membranabschnitte eine Messung besonders kleiner Ströme bis zu denen einzelner Membrankanäle erlaubt. Ein weiterer Vorteil der *patch-clamp*-Technik ist die Möglichkeit der Messung von HCN4

Strömen in kleineren Zellen, beispielsweise nativen Zellen wie Kardiomyozyten oder Sinusknotenzellen. Diese exprimieren Interaktionspartner des HCN Membrankomplexes, die ebenfalls das Schaltverhalten des Kanals modulieren und von IGF-1 beeinflusst werden könnten. Im Hinblick auf die von Lu *et al.* gezeigte PI3K/AKT-abhängige Modulation der Spannungsabhängigkeit des HCN2 Kanals in HEK293-Zellen, lässt sich nicht ausschließen, dass neben der Einzelkanalleitfähigkeit auch die Spannungsabhängigkeit des HCN4 Stroms in anderen als den hier untersuchten Zellen über diesen Signalweg moduliert wird¹⁰⁵. Weitere elektrophysiologische Analysen mit weiteren Expressionssystemen wären daher wichtig.

Im Anschluss an die Ergebnisse dieser Arbeit untersuchten Erlenhardt *et al.* den Einfluss von IGF-1 auf die spannungsabhängige Aktivierung von I_f in einem anderen Zellsystem. An isolierten Schrittmacherzellen des Sinusknotens der Maus zeigten sie, dass IGF-1 keinen Einfluss auf die spannungsabhängige Aktivierung von I_f ausübt⁹².

4.2.3 IGF-1-vermittelte Steigerung der Stromexpression

Auch wenn eine Zunahme der Einzelkanalleitfähigkeit durch IGF-1 in dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden kann, deutet der rasche 2-3-fache Anstieg von I_{Max} auf eine Zunahme von HCN4 Kanälen an der Zelloberfläche hin (Abb. 23, Abb. 24)⁹². Welcher Mechanismus dahinter steht, bleibt noch ungeklärt.

Steigerung der *de novo* Proteinbiosynthese durch IGF-1

Zum einen könnte eine Steigerung der *de novo* Proteinbiosynthese durch IGF-1 zu einer Zunahme der Stromamplitude führen.

Eine chronische Behandlung (≥ 12 h) adrenaler chromaffiner Zellen mit IGF-1 erhöht die Transkription der α -Untereinheit des Natriumkanals $Na_v1.7$ und steigert konzentrationsabhängig die Oberflächenexpression des Ionenkanals¹¹⁰. Der daran beteiligte Signalweg wird nach wenigen Minuten im Sinne einer Phosphorylierung von AKT bzw. GSK-3 β aktiviert.

Bisher lagen keine Informationen zu einem Einfluss von IGF-1 auf die Expression von HCN Kanälen vor. Hardel *et al.* zeigten, dass Insulin nach einstündiger Inkubation über die Synthese neuer Kanalproteine die Oberflächenexpression des HCN4 steigert⁸³. Eine solche Steigerung der *de novo* Proteinbiosynthese durch IGF-1 könnte zu einer vermehrten Insertion von HCN4 in die Oberflächenmembran der Oozyte führen. Mithilfe von Inhibitoren der Protein- oder RNA-Synthese, beispielsweise Cycloheximid oder Actinomycin D, ließe sich diese Hypothese untersuchen. Um eine Hochregulation der globalen Genexpression durch IGF-1 auszuschließen, wäre zusätzlich die Analyse der Proteinexpression eines endogen vorkommenden Membranproteins, beispielsweise der Na^+/K^+ -ATPase, sinnvoll¹¹¹.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen einen Effekt von IGF-1 auf I_{Max} des HCN4 im Rahmen einer weitaus kürzeren Inkubationszeit (5, 10, 30 Minuten), (Abb. 23, Abb. 24)⁹². Eine Hochregulation der *de novo* Proteinsynthese scheint in dieser Zeit weniger wahrscheinlich. Die Dynamik der Zunahme von I_{Max} deutet vielmehr auf einen posttranslationalen Mechanismus hin, für den keine Neusynthese von Kanalproteinen notwendig ist⁹². Die von Erlenhardt *et al.* anschließend an diese Arbeit

durchgeführten Analysen bestätigen diese Überlegung. Sie zeigen ein Ausbleiben eines Anstiegs der HCN4 Gesamtexpression in Oozyten nach einer Behandlung mit IGF-1⁹².

Einfluss von IGF-1 auf den subzellulären Transport

Eine vermehrte Translokation von Kanalproteinen aus intrazellulären Kompartimenten zur Zelloberfläche oder eine Verlängerung der Halbwertszeit des Proteins in der Oberflächenmembran sind weitere Möglichkeiten, die zu einer Steigerung der Oberflächenexpression eines Ionenkanals führen. Adapter- und Transportproteine sind dabei beteiligte Strukturen. Innerhalb kurzer Zeit könnte über den subzellulären Transport die Anzahl von HCN4 an der Zelloberfläche reguliert werden und die Stromamplitude zunehmen.

Mehrere Veröffentlichungen beschreiben eine derartige posttranslationale Einflussnahme von IGF-1 bzw. der IGF-1-Signalkaskaden auf Ionenkanäle.

Van Buren *et al.* demonstrierten eine Zunahme der Stromamplitude und der Sensitivität des Ionenkanals TRPV1 durch IGF-1 und Insulin unter Beteiligung der Rezeptortyrosinkinase sowie der nachfolgenden PI3K¹⁰⁸. Die Stromamplitude und Oberflächenexpression von TRPV1 stiegen bereits 5 Minuten nach einer Inkubation mit IGF-1 und Insulin an. Die konstitutiv PKC-phosphoablative TRPV1 Mutante (TRPV1 S502A/S800A) war hingegen Insulin-unempfindlich. Eine vermehrte Translokation von TRPV1 aus dem Zytosol zur Zelloberfläche schien der raschen Stromzunahme zugrunde zu liegen.

Camprubi-Robles *et al.* zeigten in Neuronen aus Spinalganglien der Ratte, dass IGF-1 innerhalb weniger Minuten vesikuläre TRPV1 Proteine *via* SNARE-abhängiger und Ca²⁺-vermittelter Exozytose zur Oberflächenmembran rekrutiert¹¹².

Im Fall des Chlorid-Kanals CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) wird das anterograde *trafficking* IGF-1-abhängig über die kleine GTPase TC10 stimuliert¹¹¹. Aktiviertes TC10 hemmt die Bindung von CFTR und dem Adaptermolekül *CFTR-associated ligand* am Golgi, wodurch der Kanal vermehrt zur Zelloberfläche transportiert wird und die gemessenen Ströme zunehmen¹¹¹.

In der vorliegenden Arbeit war eine rasche Änderung der maximalen Stromamplitude zu sehen, die vergleichbar zu der Wirkung von IGF-1 auf TRPV1 verlief. Das untersuchte AKT-phosphoablative bzw. -phosphomimetische HCN4 Konstrukt reagierte analog zu der PKC-phosphoablativen TRPV1 Mutante nicht bzw. nur sehr schwach auf IGF-1 (Abb. 24)^{92, 108}. Diese Beobachtung weist auf eine AKT-abhängige Phosphorylierung des N-Terminus in der IGF-1-vermittelten Stromamplitudenzunahme hin.

Weitere Arbeiten haben bereits einen AKT-abhängigen Einfluss auf Ionenkanäle untersucht. Eine AKT-Aktivierung führt zu einer Zunahme der Stromdichte des hERG (*human Ether-a-go-go Related Gene*) K⁺-Kanals in HEK293-Zellen¹¹³. Ebenso steigert die Koexpression von konstitutiv aktiver AKT die Ionenkanalströme von Kv1.3 und Kv1.5 und Kir2.1 in *Xenopus* Oozyten^{114, 115}. Auch in der Regulation von Ca²⁺-Kanalströmen an der Zelloberfläche scheint AKT eine Rolle zu spielen¹¹⁶⁻¹¹⁸. In ventrikulären Kardiomyozyten der Maus reguliert die Insulin/IGF-1-AKT Signalkaskade die Oberflächenhalbwertszeit des Calciumkanals Ca_vα1 durch Phosphorylierung der akzessorischen Untereinheit Ca_vβ2, welche die lysosomale Degradation von Ca_vα1 hemmt¹¹⁸.

S14, S99, S102 und S139 sind im N-Terminus des HCN4 lokalisiert. Deletionsmutanten des N-Terminus von HCN1 und HCN2 zeichnen sich durch eine deutlich reduzierte Oberflächenexpression, Stromdichte oder eine gestörte Bildung funktioneller Heterotetramere aus¹¹⁹⁻¹²¹. Die Deletion des ersten Abschnitts des N-Terminus des HCN4 (AS 1-119), der S14, S99 und S102 umfasst, verhindert nahezu vollständig die Expression des Kanals an der Zelloberfläche⁵⁵. S14, S99 und S102 liegen in zwei Regionen des HCN4 (AS 1-25 und AS 86-106), die innerhalb verschiedener Spezies konserviert sind und funktionsrelevant sein könnten¹²². Eine N-terminale Phosphorylierung könnte die Oberflächenexpression des HCN4 regulieren.

Welche Mechanismen am *trafficking* des HCN4 beteiligt sind, ist noch nicht hinreichend geklärt. Bekannt ist, dass ein Teil der HCN4 Kanäle Clathrin-abhängig endozytiert und Rab11- und Rme1-abhängig in das Endozytotische Recycling Compartment (ERC) sortiert werden⁸³. Dieser subzelluläre Pool dient der homöostatischen Aufrechterhaltung der Oberflächenpopulation und ermöglicht eine kurzfristige Mobilisierung zusätzlicher Kanäle an die Zelloberfläche durch extrazelluläre Stimuli. Das Hormon Angiotensin II nutzt diesen Weg und rekrutiert vermutlich im Zusammenspiel mit PKC und der in der Signaltransduktion nachfolgend gelegenen Phospholipase D2 (PLD2), HCN4 Kanäle aus dem ERC zur Zelloberfläche.

Darüberhinaus wurde gezeigt, dass in Sinusknotenzellen der Maus HCN4 Kanäle über eine N-Terminale *caveolin-binding-domain* mit Gerüstproteinen spezialisierter Membrandomänen (*Caveolae*), Cav-1 und Cav-3, interagieren, die neben dem *gating* dessen Translokation zur Zelloberfläche beeinflussen⁴⁶. Der IGF-1R ist mit Cav-1 in *lipid rafts* muriner Fibroblasten kolokalisiert¹²³. Eine Reduktion der Expression von Cav-1 mindert die Aktivierung des IGF-1R durch IGF-1 und der nachfolgenden Signalkaskaden, auch von AKT, in H9C2 Kardiomyoblasten der Ratte¹²⁴. Spekulativ könnte eine Kolokalisation von IGF-1R und HCN4 in einem Cav-abhängigen Oberflächenkompartiment das *trafficking* des Kanals beeinflussen.

Mithilfe gezielter Inhibitoren von *trafficking* Prozessen oder durch die Überexpression subzellulärer Transporter könnte die Oberflächenhalbwertszeit des HCN4 während oder nach einer akuten IGF-1 Behandlung näher untersucht werden. Erlenhardt *et al.* analysierten in einem weiterführenden Schritt eine Beteiligung der Clathrin-abhängigen Endozytose und des Rab11-abhängigen Recyclings an der IGF-1vermittelten Zunahme des HCN4-Stroms. Die Ko-Expression von Dynamin bzw. Rab11 mit dominant-negativer Mutation reduzierte die IGF-1vermittelte Stromgrößenzunahme signifikant⁹². Somit liefern Erlenhardt *et al.* im Anschluss an diese Arbeit interessante Hinweise auf eine Steigerung des endosomalen Recyclings von HCN4 Kanalproteinen durch IGF-1⁹².

Nach 30-minütiger Inkubation mit IGF-1 stieg auch I_{Max} der phosphomimetischen und phosphoablative HCN4 Konstrukte leicht an (Abb. 24)⁹². Diese Zunahme fiel im Vergleich zum WT deutlich geringer aus, deutet jedoch auf einen weiteren, AKT-unabhängigen, Einfluss von IGF-1 hin⁹². Dieser könnte entweder auf einer längeren Inkubationszeit beruhen. Oder auf einen verzögerten Wirkungseintritt hinweisen, wie es beispielsweise für die Synthese neuer Kanalproteine notwendig ist. Möglicherweise beeinflusst IGF-1 den Ionenkanal auf mehreren Ebenen⁹².

In Kardiomyozyten wird der IGF-1R-Komplex vermehrt in transversalen Tubuli des Sarkolemmis exprimiert¹²⁵. Derartige Einstülpungen der Oberflächenmembran ermöglichen eine räumliche Nähe des membranständigen Rezeptors zum Zellkern und verbinden extrazelluläre Stimuli mit nukleärer

Genexpression, was zu einer ungewöhnlich schnell eingeleiteten Steigerung der Ca^{2+} -abhängigen Genexpression durch IGF-1, unabhängig von zytosolischen Signalkaskaden, führen könnte^{125, 126}.

Neben dem Faktor Zeit sollten in weiterführenden Schritten unbedingt zellspezifische Charakteristika verschiedener Expressionssysteme berücksichtigt werden. Am Beispiel der Kardiomyozyten könnte IGF-1 die Genexpression des HCN4 wider Erwarten in erstaunlich kurzer Zeit stimulieren.

4.2.4 Beteiligung eines AKT-abhängigen Signalwegs an der IGF-1-vermittelten Regulation von I_{HCN}

Der beteiligte Signalweg ist für das Verständnis der kurzfristigen Steigerung von I_{Max} durch IGF-1 von entscheidender Bedeutung. IGF-1 besitzt aufgrund einer hohen Übereinstimmung seiner Aminosäuresequenz mit Insulin sowie der Übereinstimmung der Sequenzen von IGF-1R und IR die Fähigkeit zur wechselseitigen Aktivierung der jeweiligen Rezeptoren (IGF-1R oder IR)⁷⁰. *Xenopus* Oozyten exprimieren endogen IGF-1R und IR¹²⁷⁻¹²⁹. In Oozyten und anderen Zellsystemen sind im Vergleich zu Insulin deutlich geringere Stoffmengen von IGF-1 hinreichend, um eine biologische Wirkung hervorzurufen^{108, 129-131}. Diese wird in Oozyten aufgrund einer deutlich höheren Ligandenaffinität von IGF-1 zu IGF-1R und einer höheren Expression von IGF-1R als von IR am ehesten über den IGF-1R vermittelt^{70, 128}.

Die mittlere effektive Konzentration EC_{50} , bei der die Phosphorylierung eines Substrates des Oozyten Rezeptors stimuliert wird, liegt bei 0,5-1 nM IGF-1¹²⁷. 10 Minuten nach einer Inkubation mit 10 nM IGF-1 ist eine Stimulation endogener IGF-1R in Oozyten im Sinne einer Rezeptorautophosphorylierung nachweisbar¹³². Die in dieser Arbeit eingesetzte Stoffmenge (50 nM IGF-1) sollte zu einer ausreichenden Aktivierung endogen vorhandener IGF-1R führen. Eine Inhibition der Rezeptortyrosinkinase der Insulin Rezeptor Familie, beispielsweise mit Tyrphostin A47 könnte überprüfen, ob diese an der Zunahme von I_{Max} beteiligt sind¹⁰⁸. Um eine gezielte IGF-1R-Aktivierung nachzuweisen, könnte dieser mit Picropodophyllin selektiv blockiert oder seine Transkription durch *antisense* Oligonukleotide gehemmt werden¹³³.

Die Dynamik und Größe der raschen Stromamplitudenzunahme weisen auf eine Änderung der Oberflächenexpression hin⁹². Das Ausbleiben des Effekts auf I_{Max} der AKT-phosphomimetischen Mutante liefert einen ersten Hinweis, dass ein AKT-abhängiger Signalweg an der Stromamplitudenzunahme durch IGF-1 beteiligt sein könnte (Abb. 23).

I_{Max} des phosphoablative Konstrukts lag vor einer Stimulation mit IGF-1 unter I_{Max} des WT (Abb. 24)⁹². Nach einer Behandlung mit IGF-1 stieg I_{Max} des WT deutlich an und erreichte das bereits unter nicht stimulierten Bedingungen vergleichsweise hohe Stromamplitudenniveau des phosphomimetischen Kanals (Abb. 24)⁹². Möglicherweise liegt in Oozyten eine AKT-abhängige Modulation des HCN4 bereits unter basalen Bedingungen vor. Mit zunehmender N-Terminaler Phosphorylierung würde demnach die Stromamplitude des HCN4 zunehmen. Eine Abnahme einer AKT-vermittelten Phosphorylierung würde umgekehrt zu einer Abnahme von I_{Max} führen, womit ein bidirektionaler Effekt vorliegen würde, wie es beim Einfluss von PKC auf I_{h} hippokampaler CA1 Neuronen der Fall ist¹⁰⁹. Wichtig ist zu betonen, dass die gezeigten Daten zu I_{Max} von WT, S14-99-

102-139A und S14-99-102-139D aus unterschiedlichen Experimenten stammen. Da das Expressionsniveau durch externe Einflüsse zwischen mehreren Experimenten variieren kann, ist der obige Vergleich der absoluten Stromamplituden nur bedingt aussagekräftig und sollte nochmals analysiert werden.

Zur Untersuchung der weiteren Signalkaskade sind weitere Schritte notwendig. Da S14 AKT1- und AKT2-abhängig und S99, S102 und S139 ausschließlich AKT2-abhängig phosphoryliert wurden, könnte eine Unterscheidung der beiden AKT-Isoformen perspektivisch von Relevanz sein⁷⁵. Nicht alle vier Serinreste müssen an der Modulation durch IGF-1 beteiligt sein⁹². Eine Untersuchung von I_{Max} der Einzel- bzw. der Doppelmutante (HCN4 S14A/D, HCN4 S99-102A/D, HCN4 S139A/D) könnte darüber Aufschluss geben.

Dass IGF-1 nach 30 Minuten zu einer geringen Zunahme von I_{Max} der phosphoablativen und phosphomimetischen Mutante führte, deutet auf einen weiteren Mechanismus, der unabhängig einer AKT-vermittelten Phosphorylierung der untersuchten Serinreste abläuft (Abb. 24)⁹².

Hinweise auf das Vorliegen eines G-Protein-gekoppelten Wirkmechanismus von IGF-1R und IR neben der klassischen Rezeptortyrosinkinaseaktivität und die Möglichkeit der Bildung sogenannter Rezeptorhybride unterstreichen die Komplexität des IGF-1/Insulin-Systems⁷⁰. Es ist davon auszugehen, dass die biologische Wirkung von IGF-1 auf HCN Kanäle von der Rezeptorzusammensetzung, vom Expressionsniveau der jeweiligen Rezeptoren und möglicherweise auch von mehreren Signalkaskaden abhängt⁹².

Lu *et al.* beobachteten in HEK293-Zellen durch Inhibition von PI3K und AKT eine Abnahme des HCN2 Stroms und eine Verschiebung der Aktivierungskurve zu negativeren Potenzialen¹⁰⁵. Das Fehlen des Effekts auf HCN2 S861A lässt annehmen, dass eine C-terminale Phosphorylierung den PI3K/AKT-abhängigen Einfluss vermittelt. Eine AKT-Inhibition reproduzierte die Wirkung einer PI3K-Inhibition auf I_f in Sinuskontenzelle der Ratte, die vorwiegend HCN1 und HCN4 exprimieren, nicht. Hieraus lässt sich *per se* eine Wirkung von AKT auf HCN4 nicht ausschließen. Die in dieser Arbeit gezeigte IGF-1-AKT-abhängige Stromamplitudenzunahme des HCN4 könnte durchaus mit der PI3K-AKT-abhängigen Zunahme des HCN2 Stroms im Einklang stehen. Im Kontext dieser Arbeit stellen sich demnach die Fragen, ob zum einen eine Inhibition von PI3K und AKT den hier gezeigten IGF-1-vermittelten Effekt auf den HCN4 Strom blockiert und zum anderen, ob IGF-1 als Aktivator von PI3K und AKT zu einer Zunahme des Stroms und einer Änderung des *gating* von HCN2 bzw. I_f führt.

Welche Rolle die von Lu *et al.* beschriebene AKT-Phosphorylierungsstelle S1184 im C-Terminus des HCN4 spielt und ob diese das *gating* beeinflusst, muss noch untersucht werden¹⁰⁵. Da PIP_3 , *second messenger* von PI3K und Aktivator von AKT, den Effekt einer PI3K-Inhibition auf den HCN2 Strom aufhob, wäre eine Untersuchung der Rolle des Phosphoinositids in der Wirkung von IGF-1 auf den HCN4 wichtig¹⁰⁵.

Eine aktuelle Arbeit zeigte in einem PDK1 *knockout* Modell eine Suppression der Gesamtexpression von HCN2 und HCN4 in atrialen Kardiolyozyten neonataler Mäuse *via* PDK1-AKT-Signalweg¹³⁴.

Eine Insulin Behandlung über einen Zeitrahmen von wenigen Minuten bis etwa 40 Minuten suppressierte den Strom des KCNQ1/KCNE1 Kanals¹³⁵. Eine langfristige Behandlung über 24 Stunden hingegen erhöhte den Strom des Ionenkanals¹²⁹.

Ob die IGF-1-AKT-Signalkaskade kurzfristig zu einer Hochregulation von HCN4 an der Zelloberfläche führt, wie die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten lassen, und langfristig die Proteinexpression herunterreguliert, wie es umgekehrt bei dem Einfluss von Insulin auf den KCNQ1/KCNE1 Strom der Fall ist, bedarf weiterer Analysen.

4.2.5 Ausblick und pathophysiologische Bedeutung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine Zunahme der maximalen Amplitude des HCN4 Stroms kurz nach dem Beginn einer Behandlung der Oozyte mit IGF-1 beobachtet⁹². Eine derartige Zunahme von I_f in Sinusknotenzellen könnte zu einer Verkürzung der diastolischen Depolarisation und einer Steigerung der Herzfrequenz führen. Einige Hinweise deuten auf eine positiv chronotrope Wirkung der GH-IGF-1-Achse hin¹³⁶⁻¹³⁹. Ein schwerer Wachstumshormonmangel wurde hingegen mit einer signifikant reduzierten chronotropen Reserve assoziiert¹⁴⁰. Einen ersten Anhalt für eine Beeinflussung der diastolischen Depolarisation durch IGF-1 zeigten Erlenhardt *et al.* anknüpfend an diese Arbeit. In einem *ex vivo* Präparat führte IGF-1 zu einer Steigerung der spontanen Aktionspotenzialrate von Sinusknotenzellen⁹².

Eine Erhöhung von I_f und der HCN Expression im Vorhof und Ventrikel spielt bei verschiedenen Formen der Herzinsuffizienz eine Rolle¹⁴¹⁻¹⁴⁴. Die kardiale Re-Expression des Schrittmacherkanals und die Zunahme der Amplitude von I_f wird mit dem vermehrten Auftreten von Arrhythmien in Verbindung gebracht¹⁴³. Kardiomyozyten aus Tiermodellen mit Akromegalie oder GH-Überschuss bzw. nach einer GH/IGF-1-Behandlung besitzen ebenfalls veränderte Ionenkanalströme, die zu der Entstehung von Arrhythmien beitragen könnten¹⁴⁵. Darüber hinaus führt eine übermäßige Sekretion von Wachstumshormonen (GH, IGF-1) im Rahmen einer Akromegalie-Erkrankung langfristig zu der Entwicklung einer Herzinsuffizienz¹⁴⁵. Betroffene PatientInnen leiden teilweise unter einem erhöhten Risiko für Arrhythmien^{145, 146}. Einige Studien zeigen zudem eine Abnahme der basalen Herzfrequenz durch eine chirurgische und/oder pharmakologische Therapie der Akromegalie¹⁴⁶.

Über die cAMP-vermittelte Modulation von I_f nutzt das autonome Nervensystem einen äußerst schnell wirksamen Weg zur Regulation der Herzfrequenz⁵⁹. Noch ist unklar, ob zwischen einer akuten IGF-1-Gabe und einer raschen Zunahme der Herzfrequenz *in vivo* oder einer langfristigen Aktivierung eines PI3K- oder AKT-abhängigen Signalweges und einer Anpassung der basalen Herzfrequenz ein Zusammenhang besteht⁵⁹. Die IGF-1/AKT-Signalkaskade könnte einen cAMP-unabhängigen Weg der Herzfrequenzmodulation durch I_f darstellen und im Rahmen von pathologischen Veränderungen eine Rolle spielen.

Da Signalkaskaden auch eine wichtige Rolle in der Onkologie spielen, ist das Verständnis der Wirkungen zielgerichteter Therapien auf Ionenkanalströme wichtig. Eine Inhibition von PI3K wird mit einem höheren Risiko für Arrhythmien verbunden¹⁴⁷. Der Einsatz des Rezeptortyrosinkinaseinhibitors Crizotinib in der Therapie des fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen

Lungenkarzinoms führt zu einer Reduktion der Herzfrequenz von PatientInnen, zu einer raschen Abnahme der Stromdichte von I_f in murinen Sinusknotenzellen *in vitro* sowie zu einer Hemmung der HCN4 Kanalaktivierung in HEK293-Zellen^{148, 149}. Sobald der Inhibitor entfernt wird, steigt I_f innerhalb weniger Sekunden wieder an¹⁴⁹.

Im Hinblick auf Nebenwirkungen, beispielsweise ausgeprägte Sinusbradykardien, und die Entscheidung, ob und welche PatientInnen von den neuen therapeutischen Ansätzen mit Eingriffen in Signalkaskaden profitieren, kann ein Einfluss des IGF-1/AKT Signalweges auf I_f relevant sein.

Weiterführende *in vitro* und *in vivo* Studien zu den Wirkungen des in dieser Arbeit untersuchten Signalweges auf den HCN4 Kanal und I_f sind notwendig. Das genaue Verständnis der beteiligten Mechanismen könnte langfristig die Entwicklung und den Einsatz selektiver Modulatoren der HCN Kanalaktivität ermöglichen. PatientInnen, die aufgrund einer gesteigerten HCN4 Expression unter Arrhythmien leiden, könnten davon profitieren. Gleichzeitig würde die pharmakologische Wiederherstellung von I_f bei Fällen des SSS, die auf einer *loss-of-function* Mutation des HCN4 Kanals beruhen, perspektivisch eine nicht-invasive Therapie zur Behandlung genetischer Sinusknotendysfunktionen darstellen.

4.3 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Sequenzierung eine genetische Variante des kardialen Schrittmacherkanals bei einer Patientin mit symptomatischer Sinusknotendysfunktion identifiziert. Diese Missense-Mutation führt im translatierten HCN4 Protein zu einem Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleucin an Position 759. V759I befindet sich im C-Terminus direkt hinter der CNDB, zwei Bereiche, die sowohl für das *gating* als auch den Transport des Kanals zur Zelloberfläche relevant sind^{18, 83}. In CHO-Zellen war die Oberflächenexpression der genetischen Variante bei nicht signifikant veränderter Gesamtexpression reduziert. Diese Beobachtung konnte anschließend in nativen Zellen nicht reproduziert werden, sodass möglicherweise CHO-Zellspezifische Mechanismen den subzellulären Transport der Mutante beeinflussen. Da V759I bereits mit Fällen der malignen Epilepsie in Verbindung gebracht wurde, erfolgte zudem eine Untersuchung der Interaktion der Variante mit dem neuronalen Bindungspartner PEX5R/Trip8b⁸⁹. Diese zeigte, dass die PEX5R/Trip8b Isoform 1a-4 die Oberflächenexpression sowohl des Wild-Typs als auch von V759I erhöhte. Elektrophysiologische Analysen von Erlenhardt *et al.* ergänzten die zellbiologischen Untersuchungen und bestätigten, dass die spannungsabhängige Kanalaktivierung, ihre cAMP-abhängige Modulation und die Interaktion mit PEX5R/Trip8b durch V759I ebenfalls unbeeinträchtigt blieb⁸⁴. Die Ergebnisse dieser Arbeit und von Erlenhardt *et al.* liefern somit keine Hinweise für eine Beeinträchtigung der HCN4 Funktion durch den Aminosäureaustausch V759I. Die Klinik der Indexpatientin scheint vielmehr multifaktorieller Genese zu sein. Die vorliegenden Erkenntnisse unterstreichen die Notwendigkeit einer vorsichtigen Beurteilung molekulargenetischer Varianten in der Kardiologie.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss einer AKT-abhängigen Phosphorylierung von vier Serinresten S14, S99, S120 und S139 im N-Terminus des HCN4 auf die Spannungsabhängigkeit des Kanals untersucht⁷⁵. Mithilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an *Xenopus* Oozyten konnte zwischen konstitutiv phosphomimetischen und phosphoablativen Kanalzuständen kein Unterschied in der spannungsabhängigen Kanalaktivierung und der Aktivierungskinetik gezeigt werden⁹². IGF-1, ein wichtiger Aktivator der Proteinkinase AKT, beeinflusste die Kanalaktivierung ebenfalls nicht⁹². Der Wachstumsfaktor führte jedoch zu einer deutlichen Zunahme der Stromamplitude bei maximal hyperpolarisierenden Potenzialen (I_{Max})⁹². Der Anstieg von I_{Max} war bereits mehrere Minuten nach dem Beginn einer IGF-1-Behandlung zu beobachten und blieb bei der phosphomimetischen HCN4 Mutante aus⁹². Auch nach 30 Minuten zeigten die AKT-abhängig phosphomimetischen bzw. phosphoablativen HCN4 Konstrukte eine deutlich geringere Zunahme von I_{Max} durch IGF-1⁹². Der Wachstumsfaktor scheint AKT-vermittelt die HCN4 Stromamplitude zu beeinflussen. Die Dynamik dieser Zunahme deutet dabei auf einen posttranslationalen Effekt hin⁹². Ungeklärt bleibt, ob es sich um eine direkte oder indirekte Phosphorylierung durch Kinasen jenseits von AKT handelt und ob alle vier untersuchten Serinreste an dem beobachteten Effekt beteiligt sind⁹². Da das IGF-1/Insulin-System auf verschiedene Weise Ionenkanäle moduliert, sind weitere Untersuchungen zur Identifizierung des zugrundeliegenden Mechanismus und des beteiligten Signalwegs notwendig. Der IGF-1/AKT-Signalweg könnte einen weiteren Modulator von I_f und der Herzfrequenz darstellen.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ. How does adrenaline accelerate the heart? *Nature*. 1979;280(5719):235-236.
2. Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, et al. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature*. 1998;393(6685):587-591.
3. Santoro B, Grant SG, Bartsch D, et al. Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(26):14815-14820.
4. Santoro B, Liu DT, Yao H, et al. Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell*. 1998;93(5):717-729.
5. Ishii TM, Takano M, Xie LH, et al. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J Biol Chem*. 1999;274(18):12835-12839.
6. Yellen G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*. 2002;419(6902):35-42.
7. Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, et al. Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature*. 2003;425(6954):200-205.
8. Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, et al. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*. 1998;280(5360):69-77.
9. Biel M, Schneider A, Wahl C. Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc Med*. 2002;12(5):206-212.
10. Robinson RB, Siegelbaum SA. Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:453-480.
11. Vaca L, Stieber J, Zong X, et al. Mutations in the S4 domain of a pacemaker channel alter its voltage dependence. *FEBS Lett*. 2000;479(1-2):35-40.
12. Mannikko R, Elinder F, Larsson HP. Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages. *Nature*. 2002;419(6909):837-841.
13. Biel M, Wahl-Schott C, Michalakakis S, et al. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev*. 2009;89(3):847-885.
14. Seifert R, Scholten A, Gauss R, et al. Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(16):9391-9396.
15. Ludwig A, Zong X, Stieber J, et al. Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J*. 1999;18(9):2323-2329.
16. Stieber J, Stockl G, Herrmann S, et al. Functional expression of the human HCN3 channel. *J Biol Chem*. 2005;280(41):34635-34643.
17. Santoro B, Chen S, Luthi A, et al. Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J Neurosci*. 2000;20(14):5264-5275.
18. Wainger BJ, DeGennaro M, Santoro B, et al. Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature*. 2001;411(6839):805-810.
19. DiFrancesco D, Tortora P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature*. 1991;351(6322):145-147.
20. Lee CH, MacKinnon R. Structures of the Human HCN1 Hyperpolarization-Activated Channel. *Cell*. 2017;168(1-2):111-120 e111.

21. Lewis AS, Estep CM, Chetkovich DM. The fast and slow ups and downs of HCN channel regulation. *Channels (Austin)*. 2010;4(3):215-231.
22. Pian P, Bucchi A, Robinson RB, et al. Regulation of gating and rundown of HCN hyperpolarization-activated channels by exogenous and endogenous PIP₂. *J Gen Physiol*. 2006;128(5):593-604.
23. Zolles G, Klocker N, Wenzel D, et al. Pacemaking by HCN channels requires interaction with phosphoinositides. *Neuron*. 2006;52(6):1027-1036.
24. Wahl-Schott C, Biel M. HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(3):470-494.
25. Moosmang S, Stieber J, Zong X, et al. Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem*. 2001;268(6):1646-1652.
26. Shi W, Wymore R, Yu H, et al. Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ Res*. 1999;85(1):e1-6.
27. Herrmann S, Hofmann F, Stieber J, et al. HCN channels in the heart: lessons from mouse mutants. *Br J Pharmacol*. 2012;166(2):501-509.
28. Baruscotti M, Barbuti A, Bucchi A. The cardiac pacemaker current. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48(1):55-64.
29. Marionneau C, Couette B, Liu J, et al. Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol*. 2005;562(Pt 1):223-234.
30. Stillitano F, Sartiani L, DePaoli P, et al. Expression of the hyperpolarization-activated current, I_f, in cultured adult rat ventricular cardiomyocytes and its modulation by hypertrophic factors. *Pharmacol Res*. 2008;57(2):100-109.
31. Herrmann S, Layh B, Ludwig A. Novel insights into the distribution of cardiac HCN channels: an expression study in the mouse heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;51(6):997-1006.
32. Notomi T, Shigemoto R. Immunohistochemical localization of I_h channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *J Comp Neurol*. 2004;471(3):241-276.
33. Sartiani L, Mannaioni G, Masi A, et al. The Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels: from Biophysics to Pharmacology of a Unique Family of Ion Channels. *Pharmacol Rev*. 2017;69(4):354-395.
34. Moosmang S, Biel M, Hofmann F, et al. Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol Chem*. 1999;380(7-8):975-980.
35. Much B, Wahl-Schott C, Zong X, et al. Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem*. 2003;278(44):43781-43786.
36. Whitaker GM, Angoli D, Nazzari H, et al. HCN2 and HCN4 isoforms self-assemble and co-assemble with equal preference to form functional pacemaker channels. *J Biol Chem*. 2007;282(31):22900-22909.
37. Zhang Q, Huang A, Lin YC, et al. Associated changes in HCN2 and HCN4 transcripts and I_f pacemaker current in myocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1788(5):1138-1147.
38. Altomare C, Terragni B, Brioschi C, et al. Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J Physiol*. 2003;549(Pt 2):347-359.
39. Lang D, Glukhov AV. Functional Microdomains in Heart's Pacemaker: A Step Beyond Classical Electrophysiology and Remodeling. *Front Physiol*. 2018;9:1686.

40. McCrossan ZA, Abbott GW. The MinK-related peptides. *Neuropharmacology*. 2004;47(6):787-821.
41. Decher N, Bundis F, Vajna R, et al. KCNE2 modulates current amplitudes and activation kinetics of HCN4: influence of KCNE family members on HCN4 currents. *Pflugers Arch*. 2003;446(6):633-640.
42. Yu H, Wu J, Potapova I, et al. MinK-related peptide 1: A beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ Res*. 2001;88(12):E84-87.
43. Brandt MC, Endres-Becker J, Zagidullin N, et al. Effects of KCNE2 on HCN isoforms: distinct modulation of membrane expression and single channel properties. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297(1):H355-363.
44. Barbuti A, Gravante B, Riolfo M, et al. Localization of pacemaker channels in lipid rafts regulates channel kinetics. *Circ Res*. 2004;94(10):1325-1331.
45. Masson-Pevet M, Gros D, Besselsen E. The caveolae in rabbit sinus node and atrium. *Cell Tissue Res*. 1980;208(2):183-196.
46. Barbuti A, Scavone A, Mazzocchi N, et al. A caveolin-binding domain in the HCN4 channels mediates functional interaction with caveolin proteins. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;53(2):187-195.
47. Rivolta I, Binda A, Masi A, et al. Cardiac and neuronal HCN channelopathies. *Pflugers Arch*. 2020;472(7):931-951.
48. Zolles G, Wenzel D, Bildl W, et al. Association with the auxiliary subunit PEX5R/Trip8b controls responsiveness of HCN channels to cAMP and adrenergic stimulation. *Neuron*. 2009;62(6):814-825.
49. DeBerg HA, Bankston JR, Rosenbaum JC, et al. Structural mechanism for the regulation of HCN ion channels by the accessory protein TRIP8b. *Structure*. 2015;23(4):734-744.
50. Han Y, Noam Y, Lewis AS, et al. Trafficking and gating of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels are regulated by interaction with tetratricopeptide repeat-containing Rab8b-interacting protein (TRIP8b) and cyclic AMP at distinct sites. *J Biol Chem*. 2011;286(23):20823-20834.
51. Han Y, Lyman KA, Foote KM, et al. The structure and function of TRIP8b, an auxiliary subunit of hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide gated channels. *Channels (Austin)*. 2020;14(1):110-122.
52. Scherschel K, Brauninger H, Molders A, et al. Characterization of the HCN Interaction Partner TRIP8b/PEX5R in the Intracardiac Nervous System of TRIP8b-Deficient and Wild-Type Mice. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9).
53. Curran J, Mohler PJ. Alternative paradigms for ion channelopathies: disorders of ion channel membrane trafficking and posttranslational modification. *Annu Rev Physiol*. 2015;77:505-524.
54. Herrmann S, Schnorr S, Ludwig A. HCN channels--modulators of cardiac and neuronal excitability. *Int J Mol Sci*. 2015;16(1):1429-1447.
55. Liao Z, Lockhead D, Larson ED, et al. Phosphorylation and modulation of hyperpolarization-activated HCN4 channels by protein kinase A in the mouse sinoatrial node. *J Gen Physiol*. 2010;136(3):247-258.
56. Barbuti A, DiFrancesco D. Control of cardiac rate by "funny" channels in health and disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1123:213-223.
57. Barbuti A, Terragni B, Brioschi C, et al. Localization of f-channels to caveolae mediates specific beta2-adrenergic receptor modulation of rate in sinoatrial myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42(1):71-78.

58. St Clair JR, Liao Z, Larson ED, et al. PKA-independent activation of I(f) by cAMP in mouse sinoatrial myocytes. *Channels (Austin)*. 2013;7(4):318-321.
59. DiFrancesco D. Comparing pathways for long-term heart rate modulation by the funny current. *J Gen Physiol*. 2019;151(9):1066-1069.
60. Sartiani L, Romanelli MN, Mugelli A, et al. Updates on HCN Channels in the Heart: Function, Dysfunction and Pharmacology. *Curr Drug Targets*. 2015;16(8):868-876.
61. Fenske S, Krause S, Biel M, et al. The role of HCN channels in ventricular repolarization. *Trends Cardiovasc Med*. 2011;21(8):216-220.
62. Monfredi O, Boyett MR. Sick sinus syndrome and atrial fibrillation in older persons - A view from the sinoatrial nodal myocyte. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;83:88-100.
63. Lamas GA, Lee K, Sweeney M, et al. The mode selection trial (MOST) in sinus node dysfunction: design, rationale, and baseline characteristics of the first 1000 patients. *Am Heart J*. 2000;140(4):541-551.
64. Verkerk AO, Wilders R. Pacemaker activity of the human sinoatrial node: an update on the effects of mutations in HCN4 on the hyperpolarization-activated current. *Int J Mol Sci*. 2015;16(2):3071-3094.
65. Schulze-Bahr E, Neu A, Friederich P, et al. Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J Clin Invest*. 2003;111(10):1537-1545.
66. Milano A, Vermeer AM, Lodder EM, et al. HCN4 mutations in multiple families with bradycardia and left ventricular noncompaction cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(8):745-756.
67. Schweizer PA, Duhme N, Thomas D, et al. cAMP sensitivity of HCN pacemaker channels determines basal heart rate but is not critical for autonomic rate control. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2010;3(5):542-552.
68. Troncoso R, Ibarra C, Vicencio JM, et al. New insights into IGF-1 signaling in the heart. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(3):128-137.
69. Westermeier F, Bustamante M, Pavez M, et al. Novel players in cardioprotection: Insulin like growth factor-1, angiotensin-(1-7) and angiotensin-(1-9). *Pharmacological Research*. 2015;101:41-55.
70. Janssen J. New Insights from IGF-IR Stimulating Activity Analyses: Pathological Considerations. *Cells*. 2020;9(4).
71. Werner H, Weinstein D, Bentov I. Similarities and differences between insulin and IGF-I: structures, receptors, and signalling pathways. *Arch Physiol Biochem*. 2008;114(1):17-22.
72. Bourron O, Le Bouc Y, Berard L, et al. Impact of age-adjusted insulin-like growth factor 1 on major cardiovascular events after acute myocardial infarction: results from the fast-MI registry. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(5):1879-1886.
73. Juul A, Scheike T, Davidsen M, et al. Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease: a population-based case-control study. *Circulation*. 2002;106(8):939-944.
74. Buerke M, Murohara T, Skurk C, et al. Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(17):8031-8035.
75. Reinartz M, Raupach A, Kaisers W, et al. AKT1 and AKT2 induce distinct phosphorylation patterns in HL-1 cardiac myocytes. *J Proteome Res*. 2014;13(10):4232-4245.
76. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*. 2017;169(3):381-405.

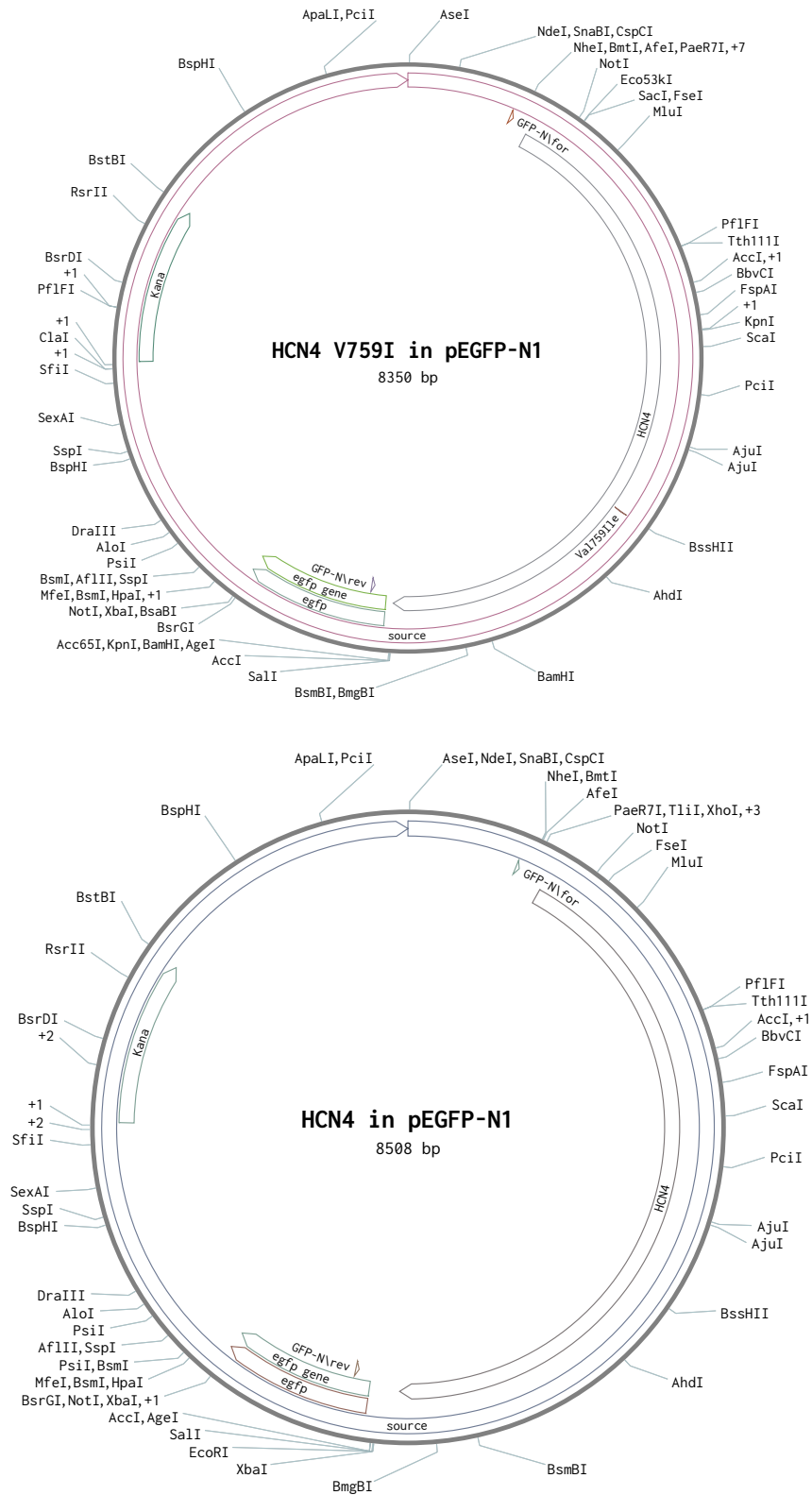
77. Muslin AJ. Akt2: a critical regulator of cardiomyocyte survival and metabolism. *Pediatr Cardiol.* 2011;32(3):317-322.
78. Sussman MA, Volkens M, Fischer K, et al. Myocardial AKT: the omnipresent nexus. *Physiol Rev.* 2011;91(3):1023-1070.
79. DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, et al. Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation.* 2006;113(17):2097-2104.
80. DeBosch B, Sambandam N, Weinheimer C, et al. Akt2 regulates cardiac metabolism and cardiomyocyte survival. *J Biol Chem.* 2006;281(43):32841-32851.
81. Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal.* 2011;23(10):1515-1527.
82. Liman ER, Tytgat J, Hess P. Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron.* 1992;9(5):861-871.
83. Hardel N, Harmel N, Zolles G, et al. Recycling endosomes supply cardiac pacemaker channels for regulated surface expression. *Cardiovasc Res.* 2008;79(1):52-60.
84. Erlenhardt N, Kletke O, Wohlfarth F, et al. Disease-associated HCN4 V759I variant is not sufficient to impair cardiac pacemaking. *Pflugers Arch.* 2020;472(12):1733-1742.
85. DiFrancesco D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol.* 1993;55:455-472.
86. Mason JW, Ramseth DJ, Chanter DO, et al. Electrocardiographic reference ranges derived from 79,743 ambulatory subjects. *J Electrocardiol.* 2007;40(3):228-234.
87. Farazdaghi GR, Wohlfarth B. Reference values for the physical work capacity on a bicycle ergometer for women between 20 and 80 years of age. *Clin Physiol.* 2001;21(6):682-687.
88. Evans A, Bagnall RD, Duflou J, et al. Postmortem review and genetic analysis in sudden infant death syndrome: an 11-year review. *Hum Pathol.* 2013;44(9):1730-1736.
89. Tu E, Waterhouse L, Duflou J, et al. Genetic analysis of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels in sudden unexpected death in epilepsy cases. *Brain Pathol.* 2011;21(6):692-698.
90. Lewis AS, Schwartz E, Chan CS, et al. Alternatively spliced isoforms of TRIP8b differentially control h channel trafficking and function. *J Neurosci.* 2009;29(19):6250-6265.
91. Santoro B, Piskorowski RA, Pian P, et al. TRIP8b splice variants form a family of auxiliary subunits that regulate gating and trafficking of HCN channels in the brain. *Neuron.* 2009;62(6):802-813.
92. Erlenhardt N, Wohlfarth F, Moussavi-Torshizi SE, et al. IGF-1 promotes cell surface expression of HCN4 pacemaker channels contributing to tachycardia. *J Mol Cell Cardiol.* 2026;210:165-174.
93. Duhme N, Schweizer PA, Thomas D, et al. Altered HCN4 channel C-linker interaction is associated with familial tachycardia-bradycardia syndrome and atrial fibrillation. *Eur Heart J.* 2013;34(35):2768-2775.
94. Uebele VN, England SK, Chaudhary A, et al. Functional differences in Kv1.5 currents expressed in mammalian cell lines are due to the presence of endogenous Kv beta 2.1 subunits. *J Biol Chem.* 1996;271(5):2406-2412.
95. Liao Z, Lockhead D, St Clair JR, et al. Cellular context and multiple channel domains determine cAMP sensitivity of HCN4 channels: ligand-independent relief of autoinhibition in HCN4. *J Gen Physiol.* 2012;140(5):557-566.
96. Peters CH, Myers ME, Juchno J, et al. Isoform-specific regulation of HCN4 channels by a family of endoplasmic reticulum proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(30):18079-18090.

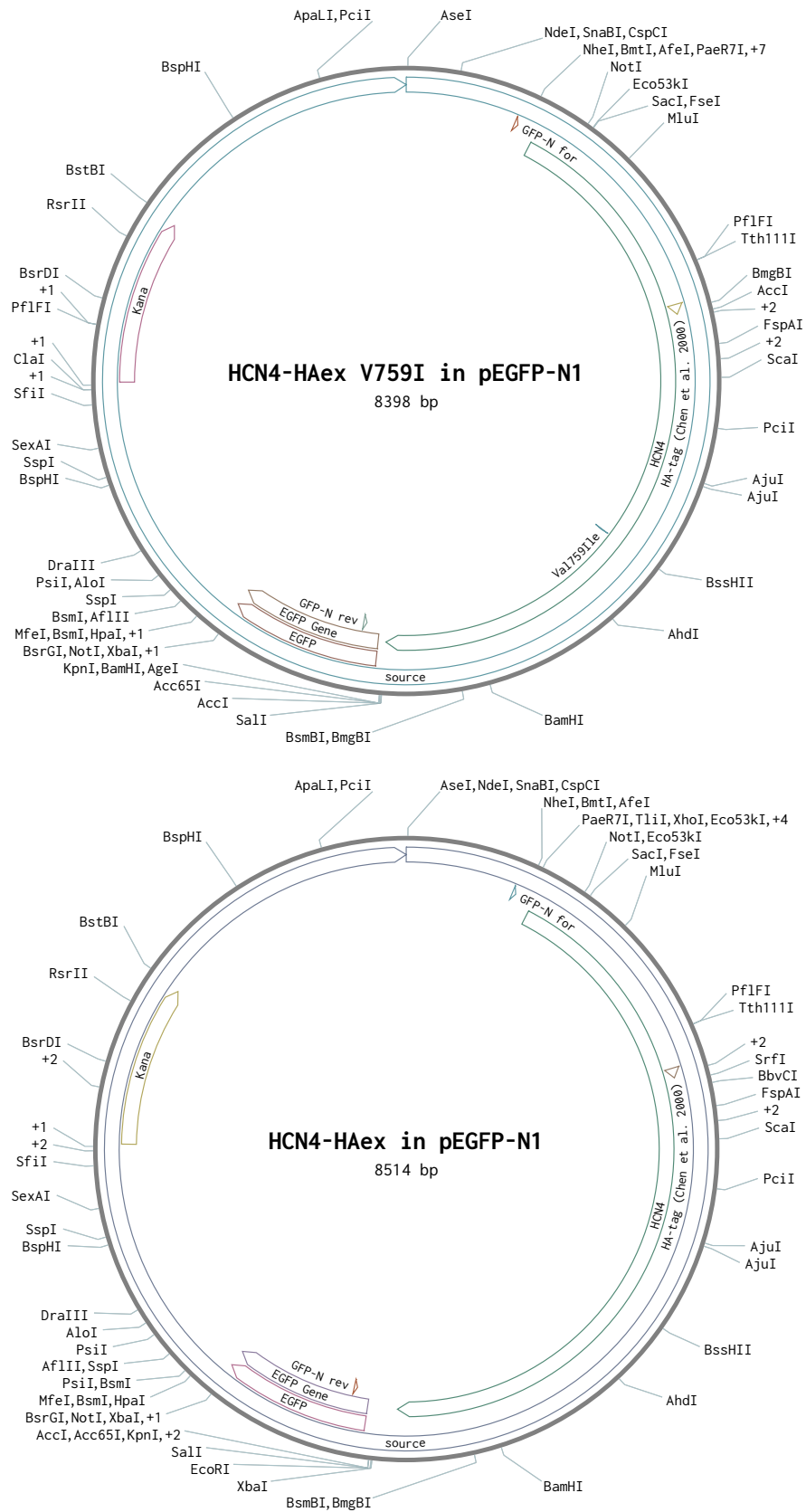
97. Santoro B, Wainger BJ, Siegelbaum SA. Regulation of HCN channel surface expression by a novel C-terminal protein-protein interaction. *J Neurosci*. 2004;24(47):10750-10762.
98. Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science*. 1974;185(4154):862-864.
99. Ruan Y, Liu N, Priori SG. Sodium channel mutations and arrhythmias. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6(5):337-348.
100. Macri V, Mahida SN, Zhang ML, et al. A novel trafficking-defective HCN4 mutation is associated with early-onset atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2014;11(6):1055-1062.
101. Jenewein T, Beckmann BM, Rose S, et al. Genotype-phenotype dilemma in a case of sudden cardiac death with the E1053K mutation and a deletion in the SCN5A gene. *Forensic Sci Int*. 2017;275:187-194.
102. Poolos NP, Bullis JB, Roth MK. Modulation of h-channels in hippocampal pyramidal neurons by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci*. 2006;26(30):7995-8003.
103. Zong X, Eckert C, Yuan H, et al. A novel mechanism of modulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels by Src kinase. *J Biol Chem*. 2005;280(40):34224-34232.
104. Arinsburg SS, Cohen IS, Yu HG. Constitutively active Src tyrosine kinase changes gating of HCN4 channels through direct binding to the channel proteins. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006;47(4):578-586.
105. Lu Z, Wang HZ, Gordon CR, et al. Regulation of HCN2 Current by PI3K/Akt Signaling. *Front Physiol*. 2020;11:587040.
106. Lin RZ, Lu Z, Anyukhovsky EP, et al. Regulation of heart rate and the pacemaker current by phosphoinositide 3-kinase signaling. *J Gen Physiol*. 2019;151(8):1051-1058.
107. Kennelly PJ, Krebs EG. Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(24):15555-15558.
108. Van Buren JJ, Bhat S, Rotello R, et al. Sensitization and translocation of TRPV1 by insulin and IGF-I. *Mol Pain*. 2005;1:17.
109. Williams AD, Jung S, Poolos NP. Protein kinase C bidirectionally modulates Ih and hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel surface expression in hippocampal pyramidal neurons. *J Physiol*. 2015;593(13):2779-2792.
110. Yanagita T, Satoh S, Uezono Y, et al. Transcriptional up-regulation of cell surface Na V 1.7 sodium channels by insulin-like growth factor-1 via inhibition of glycogen synthase kinase-3beta in adrenal chromaffin cells: enhancement of 22Na⁺ influx, 45Ca²⁺ influx and catecholamine secretion. *Neuropharmacology*. 2011;61(8):1265-1274.
111. Lee HW, Cheng J, Kovbasnjuk O, et al. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) enhances the protein expression of CFTR. *PLoS One*. 2013;8(3):e59992.
112. Camprubi-Robles M, Planells-Cases R, Ferrer-Montiel A. Differential contribution of SNARE-dependent exocytosis to inflammatory potentiation of TRPV1 in nociceptors. *FASEB J*. 2009;23(11):3722-3733.
113. Zhang Y, Wang H, Wang J, et al. Normal function of HERG K⁺ channels expressed in HEK293 cells requires basal protein kinase B activity. *FEBS Letters*. 2003;534(1-3):125-132.
114. Warsi J, Fezai M, Fores M, et al. Up-Regulation of Voltage Gated K⁺ Channels Kv1.3 and Kv1.5 by Protein Kinase PKB/Akt. *Cell Physiol Biochem*. 2015;37(6):2454-2463.
115. Munoz C, Almilaji A, Setiawan I, et al. Up-regulation of the inwardly rectifying K(+) channel Kir2.1 (KCNJ2) by protein kinase B (PKB/Akt) and PIKfyve. *J Membr Biol*. 2013;246(3):189-197.

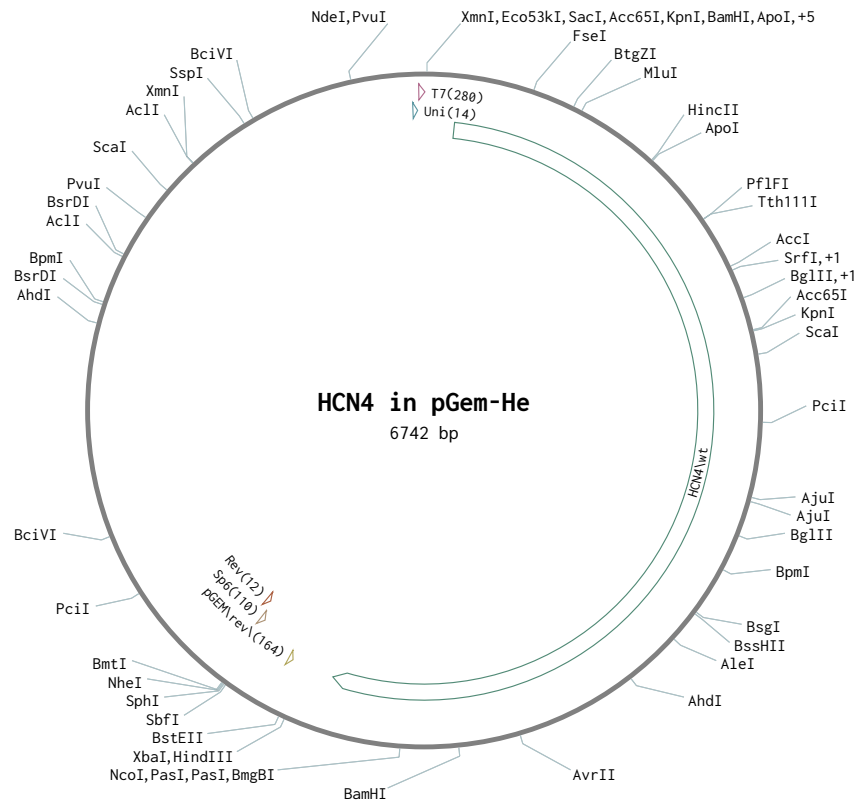
116. Sun H, Kerfant BG, Zhao D, et al. Insulin-like growth factor-1 and PTEN deletion enhance cardiac L-type Ca^{2+} currents via increased PI3K/alpha/PKB signaling. *Circ Res.* 2006;98(11):1390-1397.
117. Viard P, Butcher AJ, Halet G, et al. PI3K promotes voltage-dependent calcium channel trafficking to the plasma membrane. *Nat Neurosci.* 2004;7(9):939-946.
118. Catalucci D, Zhang DH, DeSantiago J, et al. Akt regulates L-type Ca^{2+} channel activity by modulating Cavalpha1 protein stability. *J Cell Biol.* 2009;184(6):923-933.
119. Proenza C, Tran N, Angoli D, et al. Different roles for the cyclic nucleotide binding domain and amino terminus in assembly and expression of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem.* 2002;277(33):29634-29642.
120. Pan Y, Laird JG, Yamaguchi DM, et al. An N-Terminal ER Export Signal Facilitates the Plasma Membrane Targeting of HCN1 Channels in Photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(6):3514-3521.
121. Tran N, Proenza C, Macri V, et al. A conserved domain in the NH2 terminus important for assembly and functional expression of pacemaker channels. *J Biol Chem.* 2002;277(46):43588-43592.
122. Liu H, Aldrich RW. Tissue-specific N terminus of the HCN4 channel affects channel activation. *J Biol Chem.* 2011;286(16):14209-14214.
123. Maggi D, Biedi C, Segat D, et al. IGF-I induces caveolin 1 tyrosine phosphorylation and translocation in the lipid rafts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;295(5):1085-1089.
124. Salani B, Briatore L, Garibaldi S, et al. Caveolin-1 down-regulation inhibits insulin-like growth factor-I receptor signal transduction in H9C2 rat cardiomyoblasts. *Endocrinology.* 2008;149(2):461-465.
125. Ibarra C, Vicencio JM, Estrada M, et al. Local control of nuclear calcium signaling in cardiac myocytes by perinuclear microdomains of sarcolemmal insulin-like growth factor 1 receptors. *Circ Res.* 2013;112(2):236-245.
126. Bers DM. Membrane receptor neighborhoods: snuggling up to the nucleus. *Circ Res.* 2013;112(2):224-226.
127. Hainaut P, Kowalski A, Giorgetti S, et al. Insulin and insulin-like-growth-factor-I (IGF-I) receptors in *Xenopus laevis* oocytes. Comparison with insulin receptors from liver and muscle. *Biochem J.* 1991;273 (Pt 3):673-678.
128. Scavo L, Shuldiner AR, Serrano J, et al. Genes encoding receptors for insulin and insulin-like growth factor I are expressed in *Xenopus* oocytes and embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(14):6214-6218.
129. Wu M, Obara Y, Ohshima S, et al. Insulin treatment augments KCNQ1/KCNE1 currents but not KCNQ1 currents, which is associated with an increase in KCNE1 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;493(1):409-415.
130. Janicot M, Lane MD. Activation of glucose uptake by insulin and insulin-like growth factor I in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(8):2642-2646.
131. Steele-Perkins G, Turner J, Edman JC, et al. Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor. *J Biol Chem.* 1988;263(23):11486-11492.
132. Zhu L, Ohan N, Agazie Y, et al. Molecular cloning and characterization of *Xenopus* insulin-like growth factor-1 receptor: its role in mediating insulin-induced *Xenopus* oocyte maturation and expression during embryogenesis. *Endocrinology.* 1998;139(3):949-954.
133. Larsen JK, Chen CC, Best PM. Disruption of growth hormone secretion alters Ca^{2+} current density and expression of Ca^{2+} channel and insulin-like growth factor genes in rat atria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288(2):H829-838.

134. Han Z, Wu X, Gao Y, et al. PDK1-AKT signaling pathway regulates the expression and function of cardiac hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated channels. *Life Sci.* 2020;250:117546.
135. Wu M, Obara Y, Norota I, et al. Insulin suppresses IKs (KCNQ1/KCNE1) currents, which require beta-subunit KCNE1. *Pflugers Arch.* 2014;466(5):937-946.
136. Cao N, Lau S, Nguyen TT, et al. Characterization of the acute cardiovascular effects of intravenously administered insulin-like growth factor-I in conscious Sprague-Dawley rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006;33(12):1190-1195.
137. Russell-Jones DL, Bates AT, Umpleby AM, et al. A comparison of the effects of IGF-I and insulin on glucose metabolism, fat metabolism and the cardiovascular system in normal human volunteers. *Eur J Clin Invest.* 1995;25(6):403-411.
138. Donath MY, Sutsch G, Yan XW, et al. Acute cardiovascular effects of insulin-like growth factor I in patients with chronic heart failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(9):3177-3183.
139. Lange KH, Isaksson F, Rasmussen MH, et al. GH administration and discontinuation in healthy elderly men: effects on body composition, GH-related serum markers, resting heart rate and resting oxygen uptake. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2001;55(1):77-86.
140. Moisey R, Orme S, Barker D, et al. Cardiac functional reserve is diminished in growth hormone-deficient adults. *Cardiovasc Ther.* 2009;27(1):34-41.
141. Cerbai E, Sartiani L, DePaoli P, et al. The properties of the pacemaker current I(F) in human ventricular myocytes are modulated by cardiac disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33(3):441-448.
142. Zicha S, Fernandez-Velasco M, Lonardo G, et al. Sinus node dysfunction and hyperpolarization-activated (HCN) channel subunit remodeling in a canine heart failure model. *Cardiovasc Res.* 2005;66(3):472-481.
143. Stillitano F, Lonardo G, Zicha S, et al. Molecular basis of funny current (If) in normal and failing human heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;45(2):289-299.
144. Wei-qing H, Qing-nuan K, Lin X, et al. Expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel (HCN4) is increased in hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovascular Pathology.* 2011;20(2):110-113.
145. Parolin M, Dassi F, Vettor R, et al. Electrophysiological features in acromegaly: re-thinking the arrhythmic risk? *J Endocrinol Invest.* 2021;44(2):209-221.
146. Colao A. The GH-IGF-I axis and the cardiovascular system: clinical implications. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008;69(3):347-358.
147. Ballou LM, Lin RZ, Cohen IS. Control of cardiac repolarization by phosphoinositide 3-kinase signaling to ion channels. *Circ Res.* 2015;116(1):127-137.
148. Ou SH, Tang Y, Polli A, et al. Factors associated with sinus bradycardia during crizotinib treatment: a retrospective analysis of two large-scale multinational trials (PROFILE 1005 and 1007). *Cancer Med.* 2016;5(4):617-622.
149. Zhang Z, Huang TQ, Nepliouev I, et al. Crizotinib Inhibits Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-Gated Channel 4 Activity. *Cardiooncology.* 2017;3:1.

6 Anhang







Danksagung

In erster Linie danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Nikolaj Klöcker für die Möglichkeit an seinem Lehrstuhl, dem Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, diese Promotionsarbeit durchführen zu dürfen und mit diesem Projekt Begeisterung und Freude für das wissenschaftliche Arbeiten im Labor zu entwickeln.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Jun.-Prof. Dr. Nadine Erlenhardt für die direkte wissenschaftliche Betreuung und ihre zuverlässige Unterstützung bei der Planung, Umsetzung, Niederschrift und Korrektur, ohne die diese Arbeit nicht hätte realisiert werden können. Für ihr Vertrauen, ihre Geduld und ihre motivierende Begleitung in den letzten Jahren bin ich sehr dankbar.

Mein Dank gilt allen MitarbeiterInnen des Instituts für Neuro- und Sinnesphysiologie für ihre große Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima im Institut. Allen voran danke ich Herrn Dr. Olaf Kletke und Frau Dr. Angela Koch für die Unterstützung in der Durchführung und Auswertung der elektrophysiologischen Untersuchungen. Außerdem gilt den technischen Assistentinnen Julia Vedyashkin für ihre große Unterstützung bei den Klonierungen und Claudia Wittrock für die Hilfe in der Proteinbiochemie mein Dank. Die gemeinsame Zeit im Doktorandenzimmer mit allen DoktorandInnen, insbesondere mit Dr. Andrea Mölders, werde ich immer in schöner Erinnerung behalten.

Großer Dank gilt der vorgestellten Patientin für ihre Teilnahme und dem damit verbundenen Beitrag zu dieser Arbeit. Ich danke Herrn Dr. Lukas Clasen aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf (UKD) für die Erhebung und Auswertung der klinischen Daten und die wertvolle Zusammenarbeit. Mein Dank gilt an dieser Stelle auch Herrn Prof. Dr. Malte Kelm und Herrn Prof. Dr. Hisaki Makimoto (Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie, UKD) sowie Herrn Prof. Dr. Christian Meyer (Klinik für Kardiologie, Evangelisches Krankenhaus Düsseldorf) und Frau Dr. Christiane Jungen (Universitäres Herzzentrum Hamburg). Außerdem danke ich Frau Marlene Komadowski, Frau PD Dr. Susanne Rinné und Herrn Prof. Dr. Niels Decher vom Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Philipps-Universität Marburg.

Darüber hinaus danke ich Prof. Dr. Dr. André Heinen (Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf) für die Zusammenarbeit zu Beginn des IGF-1/AKT-Projekts.

Cora Ballmann und Mirjam Pfeffer - Danke für eure uneingeschränkte Freundschaft.

Der größte Dank gilt meiner Familie, meinen Brüdern Johannes und Christoph Wohlfarth, vor allem aber meinen Eltern, Dorothea und Andreas Wohlfarth. Danke für euren bedingungslosen Rückhalt. Ohne euch, die finanzielle Unterstützung während des Studiums und euren großen Einsatz als Großeltern hätte diese Arbeit niemals abgeschlossen werden können.

Zuletzt möchte ich meiner eigenen kleinen Familie danken. Thorben Hummel, Frida und Charlotte, ihr habt die Fertigstellung dieser Arbeit nicht immer leicht gemacht, mir jedoch den Mut und den Willen gegeben, diese Herausforderung gemeinsam zu meistern. Wir vier erfüllen mich mit besonderem Stolz.

Urheberrechtliche Hinweise

Teile dieser Dissertation wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

- Erlenhardt N, Kletke O, Wohlfarth F, et al. Disease-associated HCN4 V759I variant is not sufficient to impair cardiac pacemaking. *Pflugers Arch.* 2020;472(12):1733-1742, <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02481-3>. Die Originalveröffentlichung steht unter einer Creative-Commons-Lizenz CC BY 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). Alle übernommenen und modifizierten Inhalte sind entsprechend gekennzeichnet und wurden mit der freundlichen Genehmigung von Springer Nature BV reproduziert. Genehmigung für Abb. 12 (B: modifiziert), Abb. 13C, Abb. 26, Abb. 27 erteilt über das Copyright Clearance Center, Inc. (ID: 1655698-6), 2025.
- Erlenhardt N, Wohlfarth F, Moussavi-Torshizi SE, et al. IGF-1 promotes cell surface expression of HCN4 pacemaker channels contributing to tachycardia. *J Mol Cell Cardiol.* 2026;210:165-174, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2025.10.015>. Die Originalveröffentlichung steht unter einer Creative-Commons-Lizenz CC BY 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). Alle übernommenen und modifizierten Inhalte sind entsprechend gekennzeichnet.

Abb.1 verwendet mit freundlicher Genehmigung von Elsevier Science & Technology Journals aus: Biel M, Schneider A, Wahl C. Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc Med.* 2002;12(5):206-212, [https://doi.org/10.1016/s1050-1738\(02\)00162-7](https://doi.org/10.1016/s1050-1738(02)00162-7). Genehmigung erteilt über das Copyright Clearance Center, Inc. (ID: 1655698-1), 2025.

Abb. 2 verwendet mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature BV aus: Rivolta I, Binda A, Masi A, et al. Cardiac and neuronal HCN channelopathies. *Pflugers Arch.* 2020;472(7):931-951, <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02384-3>. Genehmigung erteilt über das Copyright Clearance Center, Inc. (ID: 1655698-3), 2025.

Abb. 3 verwendet mit freundlicher Genehmigung von Elsevier Science & Technology Journals aus: Biel M, Schneider A, Wahl C. Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc Med.* 2002;12(5):206-212, [https://doi.org/10.1016/s1050-1738\(02\)00162-7](https://doi.org/10.1016/s1050-1738(02)00162-7). Genehmigung erteilt über das Copyright Clearance Center, Inc. (ID: 1655698-2), 2025.

Abb. 4 verwendet mit freundlicher Genehmigung von Elsevier aus: Verkerk AO, Wilders R. Pacemaker activity of the human sinoatrial node: an update on the effects of mutations in HCN4 on the hyperpolarization-activated current. *Int J Mol Sci.* 2015;16(2):3071-3094, <https://doi.org/10.3390/ijms16023071>. Genehmigung erteilt über das Copyright Clearance Center, Inc. (ID: 6116450485901), 2025.

Abb. 5 verwendet mit freundlicher Genehmigung von Elsevier Science & Technology Journals aus: Westermeier F, Bustamante M, Pavez M, et al. Novel players in cardioprotection: Insulin like growth factor-1, angiotensin-(1–7) and angiotensin-(1–9). *Pharmacological Research.* 2015;101:41-55,

<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.06.018>. Genehmigung erteilt über das Copyright Clearance Center, Inc. (ID: 1655698-4), 2025.

Abb. 6 verwendet mit freundlicher Genehmigung von Elsevier Science & Technology Journals aus: Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. Akt signalling in health and disease. Cell Signal. 2011;23(10):1515-1527, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.05.004>. Genehmigung erteilt über das Copyright Clearance Center, Inc. (ID: 1655698-5), 2025.

Abb. 13A verwendet mit freundlicher Genehmigung von American Society for Clinical Investigation aus: Schulze-Bahr E, Neu A, Friederich P, et al. Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. J Clin Invest. 2003;111(10):1537-1545, <https://doi.org/10.1172/jci16387>. Genehmigung erteilt über das Copyright Clearance Center, Inc. (ID: 1655673-1), 2025.