



Institut für Biologische Informationsverarbeitung 1

***Der Einfluss von cAMP auf die physiologische
Funktion von HCN4-Schrittmacherkanälen
in der Maus***

Dagmar Harzheim

***Der Einfluss von cAMP auf die physiologische
Funktion von HCN4-Schrittmacherkanälen
in der Maus***

Dagmar Harzheim

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4219

ISSN 0944-2952

Institut für Biologische Informationsverarbeitung 1 Jül-4219

D 38 (Diss., Köln, Univ., 2006)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek, Verlag
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461 61-5220 · Telefax: 02461 61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Zusammenfassung

Lebenswichtige Prozesse wie die Atmung und der Herzschlag, aber auch die Ausschüttung von Hormonen oder der Schlaf-Wachzyklus werden durch rhythmische Aktivitäten einzelner Zellen oder zellulärer Netzwerke bestimmt. Die Ausbildung rhythmischer Zellaktivität ist abhängig von dem komplexen Zusammenspiel verschiedener Ionenkanäle. Im Herzen und im Gehirn spielen so genannte „Schrittmacherkanäle“ eine wichtige Rolle. Sie werden durch Hyperpolarisation aktiviert und durch zyklische Nukleotide moduliert (*hyperpolarization activated, cyclic nucleotide-gated*). Man bezeichnet sie daher als HCN-Kanäle. Die Kanäle leiten einen depolarisierenden Einwärtsstrom, der im Herzen I_f und im Gehirn I_h genannt wird. In Säugetieren wurden vier HCN-Kanalgene kloniert (HCN1-4). Bis heute ist nicht vollständig geklärt, welche Aufgabe die einzelnen Isoformen im Organismus erfüllen.

In dieser Arbeit wurde die physiologische Bedeutung von HCN4 in der Maus untersucht. Es wurde eine Mauslinie hergestellt, in der die Bindung von zyklischen Nukleotiden an die HCN4-Kanaluntereinheit durch einen einzigen Aminosäureaustausch unterbunden wird. Mäuse, die auf beiden Allelen den Austausch tragen, sterben vor der Geburt. Die Ursache hierfür ist vermutlich eine Fehlfunktion des Herzens. Ich konnte zeigen, dass HCN4 nur mit cAMP als Schrittmacher im embryonalen Herzen fungiert und dass HCN4 das wichtigste Zielprotein für die cAMP-vermittelte Erhöhung der Herzschlagfrequenz während der Embryonalentwicklung ist.

Abstract

Important physiological functions like the beating of the heart, breathing, the release of hormones and the cycle of sleep and wakefulness are controlled by rhythmic activities of single cells or cellular networks. The generation of cellular rhythmic activity relies on a complex interplay between several distinct ion channels. One particular family of ion channels, often referred to as “pacemaker” channels, plays a crucial role in the generation of rhythmic activity in the heart and in the brain. These channels are activated by hyperpolarisation of the membrane potential and their activity is modulated by binding of cyclic nucleotides. Therefore, they have been designated as HCN channels. Recently, four mammalian HCN channel genes have been cloned (HCN1-4). The specific contribution of each HCN isoform to the different physiological functions is not known.

In the present study, the physiological role of the HCN4 channel has been analyzed in mice. Via a gene-targeting approach, a mutation has been introduced in the murine HCN4 gene which leads to a single amino acid exchange in the cyclic nucleotide-binding domain of the HCN4 channel. The mutation disables the binding of cAMP to HCN4. Homozygous mice carrying the mutation die before birth. Most likely, a dysfunction of the heart is responsible for the death of the embryos *in utero*. My results indicate that HCN4 can only act as a pacemaker in the embryonic heart when cAMP is bound to the channel. In addition, I could demonstrate that during embryonic development the main target for cAMP-dependent acceleration of the heart beat is HCN4.

I Inhalt

I INHALT _____ I

II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS _____ V

1. EINLEITUNG _____ 1

1.1 Das Herz 1

1.2 Physiologische Funktion des I_f im Herzen 2

1.2.1 Rolle des I_f in der Rhythmusbildung 2

1.2.2 Rolle des I_f in der Modulation des Herzrhythmus 4

1.3 Physiologische Funktion von HCN4 außerhalb des Herzens 7

1.4 Zielsetzung der Arbeit 8

2 MATERIAL UND METHODEN _____ 11

2.1 Material 11

2.2 *E. coli*-Zellkultur 11

2.2.1 Bakterienstämme und Plasmidvektoren 11

2.2.2 Kulturmedien 12

2.2.3 Anzucht von *E. coli*-Bakterienkulturen 12

2.2.4 Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation von Plasmid-DNA 13

2.3 Präparation von Plasmid-DNA 13

2.3.1 Mini-Präparation 13

2.3.2 Alkalische Maxi- und Mega-Präparationen 14

2.4 Isolierung von genomischer DNA 15

2.4.1 Isolierung genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen 15

2.4.2 Präparation genomischer DNA aus Dottersäcken von Embryonen sowie aus Schwanzspitzen von Mäusen 16

2.5 Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren 16

2.5.1 Phenol/Chloroformextraktion 16

2.5.2 Ethanol-Präzipitation 17

2.5.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren 17

2.5.3.1 Konzentrationsbestimmung mit Hilfe von Agarose-Gelen 17

2.5.3.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration 17

2.5.4 Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen 18

2.5.5 DNA-Größen- und Mengenstandard 18

2.5.6 Elution von DNA aus Agarose-Gelen mit der Zentrifugationsmethode 18

2.6 Isolierung von Gesamt-RNA aus embryonalen Mausherzen 19

2.7 Manipulation von Nukleinsäuren 19

2.7.1 Restriktion von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen 19

2.7.2 Restriktion von genomischer DNA 20

2.7.3 Modifizierung von DNA-Fragmenten 20

2.7.3.1 Glätten überhängender Einzelstrang-Enden 20

2.7.3.2 Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten 20

2.7.3.3 Dephosphorylierung von DNA-Vektoren 21

2.7.4 Klonierung von DNA-Fragmenten	21
2.7.4.1 Ligation	21
2.7.5 Transformation	21
2.8 Nachweis spezifischer DNA	22
2.8.1 Transfer und Immobilisierung von DNA auf Nylonmembran („Southern Blot“)	22
2.8.2 Radioaktive Markierung spezifischer DNA-Sonden	22
2.8.3 Hybridisierung von immobilisierter DNA mit radioaktiv-markierten DNA-Sonden	22
2.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	23
2.9.1 Synthese von Oligonukleotiden	23
2.9.2 Bedingungen für die PCR-Reaktionen	23
2.9.3 PCR-Reaktion zur DNA-Mutagenese	24
2.9.4 Reinigung der PCR-Produkte	25
2.9.5 Umschreiben von Gesamt-RNA aus embryonalen Mausherzen in cDNA (RT-PCR)	25
2.10 DNA-Sequenzierung mit dem LI-COR DNA-Sequenzierer	25
2.10.1 Sequenzierreaktion	26
2.10.2 PCR zur Sequenzierung	26
2.10.3 Acrylamid-Gelelektrophorese zur Sequenzierung	26
2.11 Heterologe Genexpression in HEK 293-Zellen	27
2.11.1 Kulturbedingungen für Flp-In-293 Zellen	27
2.11.2 Stabile Expression von mHCN4 bzw. mHCN4R669Q in Flp-In-293 Zellen	29
2.12 Präparation von Membranproteinen	30
2.12.1 Präparation von heterolog exprimierten Membranproteinen aus Flp-In-293 Zellen	30
2.12.2 Präparation von Gesamtproteinen aus embryonalen Herzen	30
2.13 Quantifizierung von Proteinen	31
2.13.1 Konzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz	31
2.14 Modifikation von Membranproteinen	31
2.14.1 Deglykosylierung von Membranproteinen	31
2.15 Nachweis immobilisierter Proteine	32
2.15.1 Trennung von Proteinen durch Gelelektrophorese	32
2.15.2 Verwendete Protein-Größenstandards	32
2.15.3 Transfer und Immobilisierung von Proteinen ("Western-Blot")	33
2.15.4 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteinen	33
2.16 Immunzytochemie	34
2.16.1 Fixierung und immunzytochemische Färbungen von HEK 293-Zellen	34
2.17 Embryonale Stammzellkultur	35
2.17.1 Medien und Lösungen	36
2.17.2 Allgemeine Zellkulturtechniken	37
2.17.2.1 Sterilarbeit	37
2.17.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	38
2.17.2.3 Bestimmung der Zellenzahl	38
2.17.2.4 Gewinnung des LIF-Proteins	38
2.17.3 Embryonale Feederzellen	39
2.17.3.1 Präparation embryonaler Feederzellen	39
2.17.3.2 Vermehrung von Feederzellen	39
2.17.3.3 Mitomycin C-Behandlung	40
2.17.4 Embryonale Stammzellen	40
2.17.4.1 Vermehrung	40
2.17.4.2 Elektroporation	40
2.17.4.3 Selektion	41
2.17.4.4 Isolierung resistenter embryonaler Stammzellklone	41
2.17.4.5 Analyse der resistenten embryonalen Stammzellklone	42

2.17.5 Blastozysten-Injektion von embryonalen Stammzellen	42
2.17.5.1 Isolierung von Blastozysten	42
2.17.5.2 Injektion von ES-Zellen	43
2.17.5.3 Embryo-Transfer in scheinschwangere Mäuse	44
2.17.5.4 Identifizierung von Chimären	44
2.18 Isolierung von Mausembryonen	44
2.19 Immunhistochemie	45
2.19.1 Anfertigen von Gefrierschnitten	45
2.19.2 Immunhistochemische Färbungen	45
2.20 Analyse der embryonalen Herzfunktion	46
2.20.1 Isolierung embryonaler Mausherzen	46
2.20.2 Physiologische Untersuchung der embryonalen Herzfrequenz	46
2.21 Elektrophysiologische Untersuchung	47
2.21.1 Untersuchungen der heterolog exprimierten HCN-Kanäle	48
2.21.2 Untersuchungen der nativen HCN-Kanäle in embryonalen Kardiomyozyten	49
2.21.2.1 Isolierung embryonaler Kardiomyozyten	49
2.21.2.2 Elektrophysiologische Untersuchungen	50
2.22 Fluoreszenzoptische Messungen in Multiwellplatten	50
2.22.1 Spannungssensitive Fluoreszenzfarbstoffe	51
2.22.2 Ausplattieren von HEK 293-FlpIn Zellen auf Multiwellplatten	52
2.22.3 Messungen	53
2.23 Versuchstiere	54
2.23.1 Haltung und Zucht	54
2.23.2 Versuchstiere	54
2.24 Analyse der Herzfunktion in adulten Mäusen	55
2.24.1 Telemetrisches Elektrokardiogramm (EKG)	55
2.24.2 Untersuchung isolierter Herzen in der Langendorff-Apparatur	55
2.25 Statistische Analyse	57
3. ERGEBNISSE	59
3.1 Charakterisierung der heterolog exprimierten mHCN4-Kanalgene	59
3.1.1 Analyse der Proteinexpression	59
3.1.2 Elektrophysiologische Charakterisierung	61
3.1.3 Fluoreszenzoptische Untersuchung der HCN4-Kanalaktivität	65
3.2 Herstellung einer HCN4^{R669Q} Knock-in Mauslinie	68
3.2.1 Klonierung des Targetingvektors	68
3.2.2 Embryonale Stammzellkultur	69
3.2.3 Blastozysteninjektion und Verpaarung mit Cre-Deleter Mäusen	71
3.3 Analyse der HCN4^{R669Q} Knock-in Mauslinie	73
3.3.1 Homozygote Embryonen sterben <i>in utero</i>	73
3.3.2 Untersuchung der HCN4-Expression während der Embryonalentwicklung	75
3.3.2.1 Analyse der HCN4-mRNA Expression im Herzen mittels RT-PCR	75
3.3.2.2 Analyse der HCN4 Protein-Expression im Herzen	76
3.4 Funktionelle Untersuchungen der embryonalen Herzfunktion	78
3.4.1 Isolierte heterozygote und homozygote embryonale Herzen schlagen langsamer	79
3.4.2 Die Herzfrequenz der homozygoten Embryonen steigt bei β -adrenerger Stimulation nicht an	80
3.4.3 Die Herzschlagfrequenz wird durch einen HCN-Kanalblocker reduziert	85

3.5 Untersuchung embryonaler Kardiomyozyten	86
3.5.1 Elektrophysiologische Charakterisierung	86
3.6 Untersuchungen der Herzfunktion adulter Mäuse	90
3.6.1 Telemetrisches Elektrokardiogramm (EKG)	90
3.6.1.1 Eigenschaften des Elektrokardiogramms	91
3.6.1.2 24 h EKG	91
3.6.1.3 Schwimmen	94
3.6.1.4 Heißer Luftstrom	95
3.6.2 Untersuchungen am isolierten Herzen	96
3.6.2.1 Spontaner Herzrhythmus	96
3.6.2.2 Stimulation des Herzens	98
 4. DISKUSSION	 101
4.1 Warum sterben die homozygoten Embryonen <i>in utero</i> ?	101
4.2 Warum unterscheidet sich der kardiale Phänotyp embryonal und adult?	103
4.3 Möglichkeiten zur Analyse der cAMP-Modulation von HCN4 im adulten Tier	107
 5. LITERATURVERZEICHNIS	 109
 6. ANHANG	 117
6.1 DNA- und Proteinsequenz des HCN4-Kanals aus der Maus	117
6.2 Sequenz des Targeting-Vektor neoflox ^m HCN4 ^{R669Q} DT.	121
6.3 In dieser Arbeit verwendete Primer	131
6.4 In dieser Arbeit verwendete Antikörper	132

II Abkürzungsverzeichnis

α	Anti-
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Amp	Ampicillin
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celcius
ca.	cirka
cAMP	Adenosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
CAP	<u>c</u> atabolic <u>a</u> ctivator <u>p</u> rotein
cDNA	revers transkribierte DNA (<u>c</u> omplementary <u>D</u> NA)
cGMP	Guanosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
cNMP	zyklische Nukleotide
C-Terminus	Carboxylterminus einer Polypeptidkette
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	<u>D</u> ithio <u>t</u> hreit <u>o</u> l
E	Tag der Embryonalentwicklung
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<u>E</u> thylend <u>a</u> min- <u>t</u> etra <u>a</u> cetat
EGTA	<u>E</u> thylenglycoldiamin <u>t</u> etra <u>a</u> cetat
g	Gramm
g	Normal-Fallbeschleunigung ($9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$)
gt	Ziege (<u>g</u> oat)
G418	Gentamycinsulfat
h	Stunden
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<u>h</u> orser <u>a</u> dish peroxidase)
Flp-In 293 Zellen	menschliche embryonale Nierenzelllinie (<u>h</u> uman <u>e</u> mbryonic <u>k</u> idney cells)
kB(p)	1000 Basen(paare)

LiCl	Lithiumchlorid
M	molar
min	Minute
NaAc	Natriumacetat
NGS	Normal goat serum
N-Terminus	Aminoterminus einer Polypeptidkette
OD	optische Dichte
PA	Paraformaldehyd
PAA	Polyacrylamid
pB	Plasmid Bluescript SK ⁻
PCR	Polymerase-Ketten Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
RNA	Ribonukleinsäure
rt	Ratte (<u>rat</u>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Zeit
T	Temperatur
T _a	Annealingtemperatur
TCA	Trichloressigsäure
T _m	Schmelztemperatur
Tab.	Tabelle
TEMED	<u>Tetramethylethylendiamin</u>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)1,3-propandiol
s	Sekunde
U	Enzymeinheit (unit)
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
UV	ultraviolett
V _{1/2}	halbmaximale Membranspannung
V _m	Membranpotenzial
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent

Es wurden die üblichen Abkürzungen des „Système International“ und dessen Vorsätze zur Bezeichnung von dezimalen Vielfachen und Teilen verwendet.

Nukleotide innerhalb einer Nukleinsäuresequenz sind durch die Anfangsbuchstaben der Basen bezeichnet (A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin).

Aminosäuren sind nach dem Einbuchstabenkode abgekürzt:

A	Alanin
R	Arginin
N	Asparagin
D	Aspartat
C	Cystein
E	Glutamat
Q	Glutamin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
L	Leucin
K	Lysin
M	Methionin
F	Phenylalanin
P	Prolin
S	Serin
T	Threonin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
V	Valin

1. Einleitung

1.1 Das Herz

Das Herz bildet zusammen mit den Blutgefäßen das Herz-Kreislaufsystem. Es versorgt jede Zelle des Körpers mit Sauerstoff und Substraten des Stoffwechsels und führt Kohlendioxid und Stoffwechselendprodukte ab. Das Säugerherz ist ein Hohlmuskel. Es besteht aus zwei Vorhöfen (Atrien) und zwei Kammern (Ventrikel) (→ Abb. 1.1). Durch Kontraktion des Herzens wird das Blut in das Kreislaufsystem gepumpt. Physiologisch entsteht ein Herzschlag durch rhythmische Kontraktion (Systole) und Relaxation (Diastole) der Herzmuskelzellen. Der Herzschlag wird durch elektrische Erregungen im Sinusknoten ausgelöst. Der Sinusknoten besteht aus dünnen, wenig kontraktilen Muskelzellen, die spontan elektrisch aktiv sind. Die elektrische Erregung wird über gap junctions weitergegeben. Sie breitet sich vom Sinusknoten in beide Atria aus und erreicht den Atrioventrikularknoten (AV-Knoten). Vom AV-Knoten ist eine Überleitung auf die Ventrikel nur über dünne Verbindungsfasern (His-Bündel) möglich. Das His-Bündel und die sich daran anschließenden Purkinje-Fasern übertragen die Erregungswelle annähernd gleichzeitig auf das gesamte ventrikuläre Myokard (aus: Eckert, R., 2000) (→ Abb. 1.1).

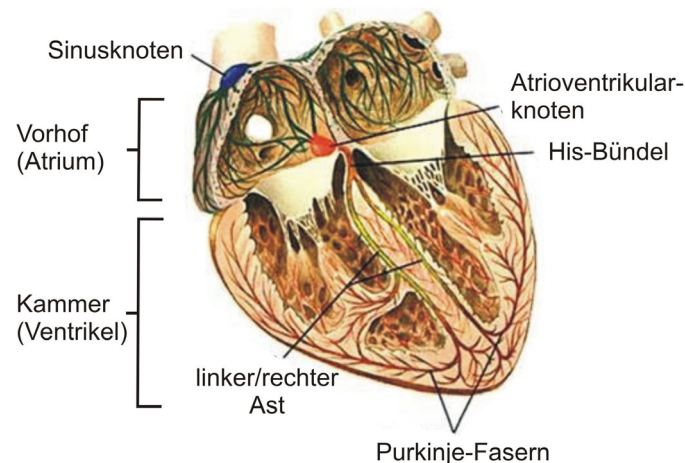


Abb. 1.1: Aufbau und Reizleitungssystem des Säugerherzens. Die einzelnen Komponenten sind beschriftet. (Erklärung siehe Text).

1.2 Physiologische Funktion des I_f im Herzen

1.2.1 Rolle des I_f in der Rhythmusbildung

Sinusknotenzellen sind spontan elektrisch aktiv. Die elektrischen Erregungen dieser Zellen werden als Schrittmacheraktionspotenziale bezeichnet. Die Ausbildung des Aktionspotenzials hängt von dem komplexen Zusammenspiel von mindestens drei verschiedenen Ionenströmen ab: einem Ca^{2+} -Einstrom, einem K^+ -Ausstrom und dem so genannten I_f -Strom, einem Na^+ -Einstrom. Die Rolle dieser verschiedenen Ionenströme an der Ausbildung eines Schrittmacheraktionspotenziales wird in der folgenden Abbildung deutlich:

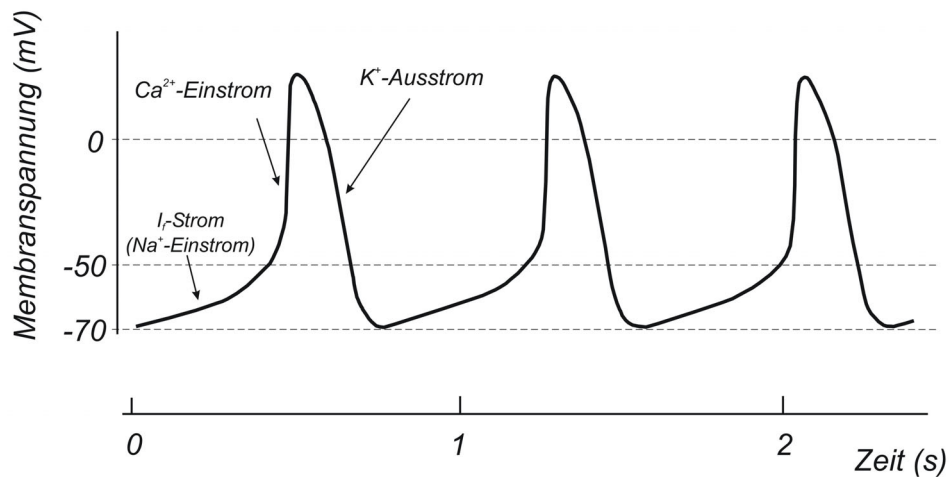


Abb. 1.2: Aktionspotenzialbildung in Sinusknotenzellen. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Membranspannung während eines Aktionspotenzials. Der spontanen langsamen Depolarisation liegt der I_f -Strom zugrunde. Der schnelle Aufstrich des Aktionspotenzials wird durch einen Ca^{2+} -Einstrom erzeugt. Ein K^+ -Ausstrom bewirkt die anschließende Repolarisation.

Ein Aktionspotenzial wird ausgelöst, wenn ein Schwellenwert des Membranpotenzials (-50 mV) erreicht wird. T-Typ Ca^{2+} -Kanäle öffnen, leiten einen Ca^{2+} -Einwärtsstrom und depolarisieren so die Zelle. Bei ca. -30 mV öffnen dann L-Typ Ca^{2+} -Kanäle, die das Aktionspotenzial auslösen. Zeitversetzt öffnen spannungsabhängige K^+ -Kanäle (*delayed rectifier*), die einen K^+ -Auswärtsstrom leiten und damit die Zelle repolarisieren. Am Ende der Repolarisation ist die Zellmembran hyperpolarisiert. Spannungsabhängige HCN-Kanäle (*hyperpolarisation activated, cyclic nucleotide-gated*) (Clapham 1998), die den I_f -Strom leiten, öffnen und leiten eine neue Depolarisation ein (DiFrancesco, 1993; zur Übersicht: Kaupp & Seifert, 2001; Robinson & Siegelbaum, 2003). Dadurch kann ein neues Aktionspotenzial ausgelöst werden.

In Säugetieren gibt es vier HCN-Kanalisoformen, HCN1-4. Sie werden im Organismus unterschiedlich exprimiert (Ishii et al., 1999; Shi et al., 1999; Moosmang et al., 2001; Stieber et al., 2004). Im Sinusknoten ist HCN4 die dominante Isoform (Ishii et al., 2001; Herrmann, 2004; Stieber et al., 2004). Schaltet man HCN4 in der Maus aus, so sterben die Tiere bereits vor der Geburt (Embryonalentwicklung Tag E10-11,5) (Stieber et al., 2004). Hierbei ist es unerheblich, ob HCN4 im gesamten Organismus oder nur im Herzen fehlt. Somit ist der kardiale Verlust der HCN4-Expression für den Tod der Embryonen verantwortlich. Die Herzen der HCN4-defizienten Embryonen schlagen deutlich langsamer als die Herzen von Wildtypembryonen. Elektrophysiologisch können in Kardiomyozyten von Wildtypembryonen unterschiedliche Aktionspotenzialformen nachgewiesen werden.

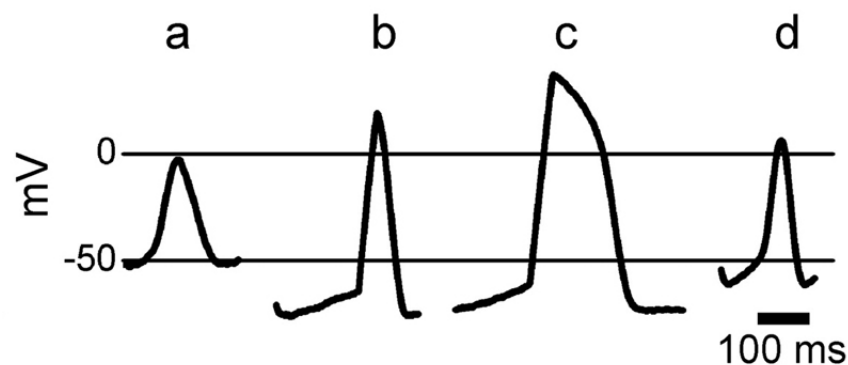


Abb. 1.3: Aktionspotenzialformen in embryonalen Kardiomyozyten. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Membranspannung verschiedener Zellen des embryonalen Herzens an Tag 9,5 (E9,5). a. primitives, b. vorhofartiges, c. kammerartiges, d. schrittmacherartiges Aktionspotenzial (modifiziert aus Stieber et al., 2004).

Man findet primitive, vorhofartige, kammerartige und schrittmacherartige Aktionspotenziale. Die letztgenannten ähneln den Schrittmacheraktionspotenzialen im Sinusknoten, die im adulten Tier für den primären Herzrhythmus verantwortlich sind. In Kardiomyozyten von HCN4 *Knock-out* Embryonen fehlen die schrittmacherartigen Aktionspotenziale (Stieber et al., 2004). Die Autoren postulierten, dass HCN4 essentiell für die Ausbildung der schrittmacherartigen Aktionspotenziale und damit für das Überleben der Embryonen *in utero* ist.

1.2.2 Rolle des I_f in der Modulation des Herzrhythmus

Bei körperlicher Aktivität oder Aufregung benötigen die Muskeln und Organe mehr Energie. Die Herzschlagfrequenz steigt an und die Pumpkraft des Herzens wird verstärkt. Über das vegetative Nervensystem wird sich die Herzleistung den jeweiligen Bedürfnissen des Organismus angepasst. Sympathikus und Parasympathikus wirken in entgegengesetzter Weise auf die Schlagfrequenz (chronotrope Wirkung), auf die systolische Kraftentwicklung (inotrope Wirkung) und auf die Geschwindigkeit der atrioventrikulären Überleitung (dromotrope Wirkung). Die Wirkung des Parasympathikus wird durch den Neurotransmitter Acetylcholin vermittelt. Dieser Botenstoff wird aus den Nervenfasern des N. vagus freigesetzt. Am Herzen wird die Parasympathikuswirkung über muskarinerge Acetylcholinrezeptoren vermittelt. Es kommt zu einer verlangsamten diastolischen Depolarisation (negativ chronotrop), die Kontraktionskraft wird erniedrigt (negativ inotrop) und die atrioventrikuläre Überleitung wird verlangsamt (negativ dromotrop). Die Wirkung des Sympathikus wird durch den Neurotransmitter Noradrenalin vermittelt. Zusätzlich wird bei Erregung des Sympathikus aus dem Nebennierenmark Adrenalin freigesetzt, welches über den Blutkreislauf zum Herzen gelangt. Die Wirkung von Noradrenalin und Adrenalin wird überwiegend über Beta-1-(β_1)-adrenerge Rezeptoren vermittelt. Bei β -adrenerger Stimulation steigt die Herzschlagfrequenz an (positiv chronotrop), die atrioventrikuläre Überleitung wird beschleunigt (positiv dromotrop) und die Kontraktionskraft erhöht (positiv inotrop). In Ruhe überwiegt der Vagustonus gegenüber dem Sympathikustonus. Die Schlagfrequenz eines vollständig denervierten Herzens liegt über der normalen Ruhefrequenz, weil der hemmende Einfluss des Vagustonus fehlt (aus: Schmidt, Lang, Thews, 2004).

Die Frequenz des Herzschlags wird als die Zeitspanne zwischen zwei Aktionspotenzialen definiert. Verkürzt sich diese, so erhöht sich die Frequenz. Das Herz schlägt schneller. Die Länge der Zeitspanne ist abhängig von der diastolischen Depolarisation (DD). Während β -adrenerger Stimulation steigt die diastolische Depolarisation an, d.h. deren Steilheit nimmt zu. Der Schwellenwert für das Auslösen eines neuen Aktionspotenzials wird schneller erreicht und das Aktionspotenzial früher ausgelöst ($\rightarrow$ Abb. 1.4).

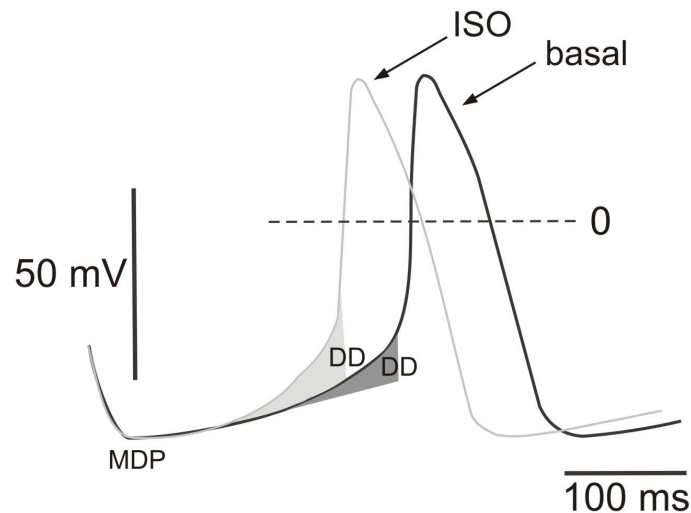


Abb. 1.4: Diastolische Depolarisation. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf eines Aktionspotenzials im Sinusknoten. In hell- bzw. dunkelgrau ist die diastolische Depolarisation (DD) eingezeichnet. Die schwarze Kurve zeigt den Verlauf unter basalen Bedingungen, die graue Kurve den Verlauf bei Stimulation mit Isoproterenol (ISO, β -adrenerger Agonist). Die gestrichelte schwarze Linie kennzeichnet das 0 mV Potenzial. MDP, maximales diastolisches Potenzial.

Welche molekularen Komponenten an der Zunahme der diastolischen Depolarisation beteiligt sind, konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden. In den letzten Jahren wurden zwei grundlegende Prinzipien diskutiert, die zu einer Zunahme der Herzschlagfrequenz bei β -adrenerger Stimulation führen können.

1. Modulation der Herzschlagfrequenz durch Aktivierung von Ryanodinrezeptoren.

Rigg und Kollegen (2000) beobachteten spontane lokale Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in der späten Phase der diastolischen Depolarisation als Antwort auf eine β -adrenerge Stimulation. Sie postulierten, dass die Ca^{2+} -Ionen aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch Ryanodinrezeptoren in das Zytoplasma fließen. Ryanodinrezeptoren sind intrazelluläre Ca^{2+} -Kanäle, die sich in der Membran des SR befinden. Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert den Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher (NCX) in der Plasmamembran. Dieser elektrogene Transporter transportiert drei Na^+ -Ionen in die Zelle und ein Ca^{2+} -Ion aus der Zelle. Dies erzeugt einen Einwärtsstrom, der die diastolische Depolarisation verstärkt (Bogdanov et al., 2001). Dass die Ryanodinrezeptoren eine wichtige Rolle in der Modulation des Herzrhythmus spielen, wurde durch experimentelle Befunde von Vinogradova und Kollegen (2002) gestützt. Wenn man die Ryanodinrezeptoren während β -adrenerger Stimulation funktionell ausschaltet, wird kein Ca^{2+} mehr aus dem SR freigesetzt. Die diastolische Depolarisation wird nicht verstärkt und die Herzschlagfrequenz nimmt nicht zu.

Die Daten aus den hier angeführten Arbeiten scheinen die These zu stützen, dass die Modulation der Herzschlagfrequenz durch das Zusammenspiel von Ryanodinrezeptoren und dem Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher vermittelt wird. Alternativ wird folgende These diskutiert:

2. Modulation der Herzschlagfrequenz über I_f .

Um die Beteiligung des I_f an der Modulation der Herzschlagfrequenz besser verstehen zu können, werden seine Eigenschaften kurz zusammengefasst. Der I_f -Strom wird durch HCN-Kanäle getragen. Diese werden durch Hyperpolarisation aktiviert und durch zyklische Nukleotide (cAMP) moduliert. Die cAMP-Bindestelle (*cyclic nucleotide-binding domain*, CNBD) befindet sich im zytosolischen C-Terminus der HCN-Kanäle (→ Abb. 1.5A).

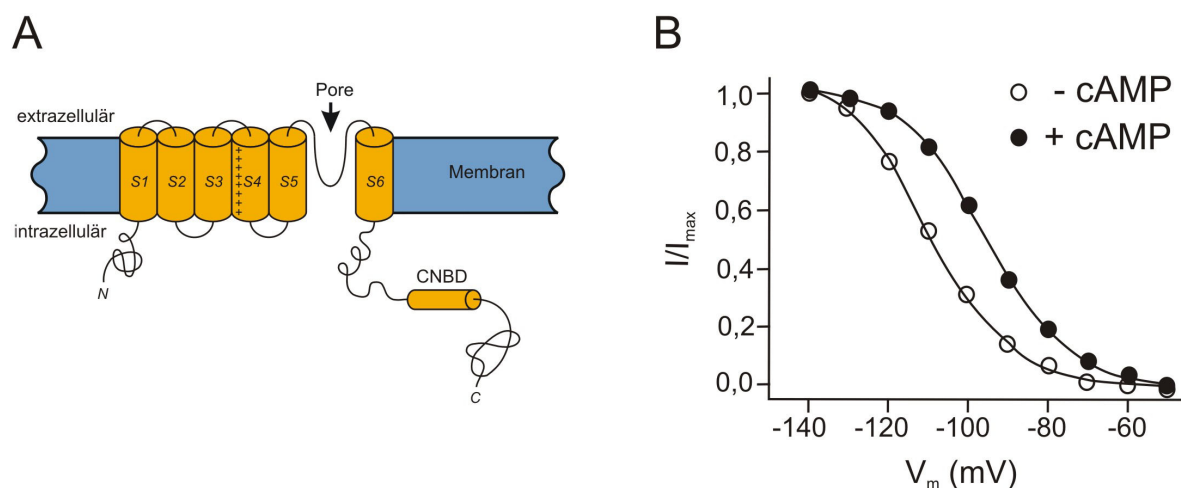


Abb. 1.5: A. Transmembranale Topologie der HCN-Kanäle. Die einzelnen Membrandomänen sind mit S1-S6 bezeichnet. Der Spannungssensor S4 ist zusätzlich mit + gekennzeichnet. N- und C-Terminus liegen, wie die cAMP-Bindestelle (CNBD), im Zytosol. **B. Aktivierungskurve des HCN4-Kanals.** Aufgetragen ist der normalisierte Strom ($I/I_{\max}$) gegen die Membranspannung (V_m). Die weißen Kreise verdeutlichen den Stromverlauf ohne, die schwarzen Kreise den Stromverlauf mit $100 \mu\text{M}$ cAMP (modifiziert aus: Biel et al., 2002).

Welche Auswirkung die Bindung von cAMP auf die Kanalaktivität hat, zeigt die Aktivierungskurve des HCN4-Kanals in Abbildung 1.5B. In Abwesenheit von cAMP ist der Kanal bei -60 mV vollständig geschlossen (→Abb. 1.5B ○). Er öffnet bei zunehmender Hyperpolarisation und ist bei -130 mV maximal aktiviert. Bindet cAMP an den Kanal, verschiebt sich die Aktivierungskurve zu positiveren Membranspannungen (→Abb. 1.5B ●). Betrachtet man die Spannung, bei der der Kanal halbmaximal geöffnet ist ($I/I_{\max} = 0,5$), liegt diese ohne cAMP bei ca. -110 mV, mit cAMP jedoch bei -90 mV (Biel et al., 2002). Diese Verschiebung der Aktivierungskurve zu positiveren Membranspannungen ist die Grundlage für die postulierte Beteiligung des I_f an der Modulation der Herzschlagfrequenz. Bei basaler autonomer Kontrolle führt die Aktivierung des I_f bei maximalem diastolistischen Potenzial

(MDP) zu einer spontanen Depolarisation, die schließlich das Aktionspotenzial auslöst (→ Abb. 1.4). Bei β -adrenerger Stimulation steigt die intrazelluläre cAMP-Konzentration über die Aktivierung membranständiger Adenylatzyklen an. DiFrancesco (1991) sowie Accili und Kollegen (1997) konnten zeigen, dass cAMP direkt die Aktivität des I_f -Stroms während des MDP erhöht. Die diastolische Depolarisation steigt dadurch an, der Schwellenwert zur Auslösung des Aktionspotenzials wird schneller erreicht und die Herzschlagfrequenz nimmt zu. Welche der beiden Theorien die Erhöhung der Herzschlagfrequenz erklärt, konnte bisher noch nicht eindeutig gezeigt werden.

1.3 Physiologische Funktion von HCN4 außerhalb des Herzens

Der I_f -Strom spielt nicht nur in der Rhythmusbildung im Herzen, sondern auch in der Ausbildung spontaner rhythmischer Aktivität in Neuronen eine wichtige Rolle. Dort wird der Strom als I_h bezeichnet. Man findet alle vier HCN-Isoformen im Gehirn (Moosmang et al., 2001). HCN4 wird in Neuronen des Bulbus olfaktorius, der Habenula und des Thalamus exprimiert (Ludwig et al., 1998; Santoro et al., 1998; Seifert et al., 1999; Shi et al., 1999). In den letzten Jahren ist hauptsächlich die Rolle des I_h im Thalamus untersucht worden. Der Thalamus ist ein wichtiger Gehirnbereich für die Verarbeitung sensorischer Informationen von der Peripherie zum Cortex. Er kontrolliert u.a. den Schlaf-Wachzyklus. Durch EEG-Messungen konnten Oszillationen identifiziert werden, die mit dem Schlaf-Wachzyklus korrelieren (Steriade et al., 1993). Während die Wachphase durch hochfrequente tonische Aktivität gekennzeichnet ist, treten in der Schlafphase langsamere Erregungsmuster auf. Eine Erregungsform in der Schlafphase sind die so genannten „*spindle waves*“ (Steriade et al., 1993, Kim et al., 1995). Sie sind durch eine Periode rhythmischer Aktivität (7-14 Hz) über einen Zeitraum von 1-3 s und einer anschließenden Refraktärzeit von 5-20 s charakterisiert. Über die physiologische Funktion dieser Erregungsabfolge ist noch nicht viel bekannt. Untersuchungen an einem *in vitro*-Modell eines thalamokortikalen Netzwerks identifizierten den I_h -Strom als ein Schlüsselement für die Ausbildung dieses speziellen Erregungsmusters (McCormick und Bal, 1996, Lüthi und McCormick, 1998). Demnach korreliert die Refraktärzeit mit einer langsam verlaufenden Depolarisation (*after depolarizing potential*, ADP), für die eine dauerhafte Aktivierung des I_h -Stroms verantwortlich ist (Bal und McCormick, 1996). Damit sinkt die Wahrscheinlichkeit der Erregungsbildung. Eine erneute Erregung kann erst entstehen, wenn die Depolarisation durch die Deaktivierung des I_h -Stroms

beendet wird. Der I_h -Strom bestimmt damit wesentlich, wann die rhythmische Aktivität eines Neurons beendet wird und wie lang die Refraktärzeit zwischen zwei Aktionspotenzialen ist. Lüthi und McCormick (1999) konnten zeigen, dass ihre dauerhafte Aktivierung des I_h durch einen Ca^{2+} -induzierten Anstieg der cAMP-Konzentration entsteht. Vermutlich stabilisiert die Bindung von cAMP den Offenzustand der HCN-Kanäle und ermöglicht so eine dauerhafte Aktivierung. Es ist bis jetzt unklar, welche HCN-Isoform(en) an diesem Mechanismus beteiligt ist bzw. sind.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist, die physiologische Bedeutung der cAMP-Modulation des HCN4-Kanals zu untersuchen. Sowohl im Herzen als auch im Gehirn spielt die cAMP-Modulation der HCN-Kanal vermittelten Ströme eine wichtige Rolle bei der Ausbildung rhythmischer Aktivität. HCN4 findet man in der primären Schrittmacherregion des Herzens, dem Sinusknoten, und in rhythmisch aktiven Neuronen des Thalamus. Wie kann man *in vivo* in Signalwege eingreifen, um deren physiologische Funktion genau zu untersuchen? Eine Möglichkeit ist die gezielte Veränderung von Genen in der Maus, das so genannte *gene targeting*. Diese Methode erlaubt es, Gene zu deletieren oder Gene in mutierter Form in das Genom einzubringen, und so die Proteinexpression bzw. die Proteinsequenz spezifisch zu verändern. Für HCN4 wurde bereits eine *Knock-out* Mauslinie hergestellt (Stieber et al., 2004). Die Analyse der HCN4-Funktion ist jedoch schwierig, da HCN4-defiziente Mäuse während der Embryonalentwicklung sterben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wollte ich eine Mauslinie generieren, in der nur die Bindung von cAMP an den HCN4-Kanal unterbunden wird, die spannungsabhängige Aktivierung jedoch unbeeinflusst bleibt. Ich habe deshalb die cAMP-Bindestelle des HCN4-Kanals auf Aminosäureebene mit den Bindestellen der drei anderen HCN-Isoformen und mit homologen Bindestellen zyklisch Nukleotid-bindender Proteine verglichen (→ Abb. 1.6)

		αA	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 5$	
mHCN1	472	FVTAMLSKLRFEVFQPGDYII	REGAVGKKMYFIQHGVAGVITK	--SSKEM				
mHCN2	525	FVTAMLTKLKFEVFQPGDYII	REGTIGKKMYFIQHGVVSVLTK	--GNKEM				
mHCN3	435	FVTAVLTKLRFQVFQPGDLVV	REGSVGRKMYFIQHGLLSVLAR	--GARDT				
mHCN4	653	FVTSMLTKLRFEVFQPGDYII	REGTIGKKMYFIQHGVVSVLTK	--GNKET				
bCNGA1	485	LLVELVLKLQPVYSPGDYI	CKKGDIGREMYIIKEGKLAVVADD	-GITQ-				
CAP	10	TLEWFLSHCHIHKYPSTLI	HQGEKAETLYYIVKGSVAVLIKDEEGKEM					
		$\beta 5$	$\beta 6$	$\downarrow$ $\beta 7$	$\beta 8$	αB		
mHCN1		---KLT	DGSYFGEICLL	-----TKGRRTASVRADTYCRLYSLSVDNFNEVLE				
mHCN2		---KLS	DGSYFGEICLL	-----TRGRRTASVRADTYCRLYSLSVDNFNEVLE				
mHCN3		---RLT	DGSYFGEICLL	-----TRGRRTASVRADTYCRLYSLSVDNFNEVLE				
mHCN4		---KLAD	DGSYFGEICLL	-----TRGRRTASVRADTYCRLYSLSVDNFNEVLE				
bCNGA1		-FVVL	SDGSYFGEISIL	NIKGSKAGNRRTANIKSIGYSDLEFCLSKDDLMEALT				
CAP		ILSYLNQGD	FIGELGLFEE	-----GQERSAWVRAKTACEVAEISYKKERQLIQ				
		αC						
mHCN1		EYPMMRRAFETVAIDRLDRIGKKNS	588					
mHCN2		EYPMMRRAFETVAIDRLDRIGKKNS	641					
mHCN3		EYPMMRRAFETVAMDRLDRIGKKNS	551					
mHCN4		EYPMMRRAFETVALDRLDRIGKKNS	719					
bCNGA1		EYPDAKGMLEEKKGQILMKDGLLDI	609					
CAP		VNPDILMRLSAQMARRLOVTSEKVG	132					

Abb. 1.6: Aminosäuresequenzvergleich verschiedener cNMP-Bindestellen. Zum Vergleich sind die Bindestellen der HCN-Kanäle aus der Maus (mHCN1-4) sowie der A1-Untereinheit des CNG-Kanals aus Rinder-Sehstäbchen (bCNGA1) und des bakteriellen cAMP-regulierten „Catabolite gene activator“ Proteins (CAP) abgebildet (Übersicht: Kaupp & Seifert, 2001). Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt. Grau unterlegte Aminosäuren kennzeichnen konservative Aminosäureaustausche. Der Pfeil markiert das für die cAMP-Bindung wichtige Arginin (R). Zur Optimierung des Sequenzvergleichs wurden Lücken (-) eingefügt. Oberhalb der Sequenz sind die Sekundärstrukturelemente angegeben. β -Faltblattstrukturen sind mit $\beta 1$ -8, α -helikale Abschnitte mit αA -C gekennzeichnet.

Aus Mutationsstudien ist bekannt, dass das in Abb. 1.6 mit einem roten Pfeil markierte Arginin (R) essentiell für die Bindung von cAMP ist (Weber et al., 1987; Tibbs et al., 1998). Das Arginin geht eine elektrostatische Wechselwirkung mit einem negativ geladenen Sauerstoffatom der zyklischen Phosphatgruppe des Nukleotids ein. Tauscht man diese Aminosäure gegen eine neutrale Aminosäure durch gezielte Mutagenese aus, ist nur die cAMP-Bindung, jedoch nicht das spannungsabhängige Öffnen der Kanäle beeinflusst (Chen et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit sollte das HCN4-Kanalgen der Maus so mutiert werden, dass das Arginin an Position 669 gegen ein Glutamin (R669Q) ausgetauscht wird. Die Analyse dieser Mauslinie soll zeigen, welche physiologische Bedeutung HCN4 und dessen Modulation durch cAMP in den HCN4-exprimierenden Geweben wie dem Herzen und dem Thalamus hat.

2 Material und Methoden

In dieser Arbeit beschriebene Methoden wurden – soweit nicht anders vermerkt – aus Sambrook & Russel (2001) entnommen oder in Anlehnung daran modifiziert.

2.1 Material

Es wurden Chemikalien in p.A. Qualität der Firmen AppliChem (Darmstadt), Amersham Biosciences (Freiburg), Biozym (Hess. Oldendorf), Merck (Darmstadt), MWG-Biotech (Ebersberg), Pierce (Rockford, USA), Qiagen (Hilden), Riedel-de Haën AG (Seelze), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und USB (Bad Homburg) bezogen. Enzyme und deren Puffer wurden von Ambion (Austin, USA), Amersham Biosciences, GIBCO BRL (Eggenstein), MBI Fermentas (Vilnius, Litauen), NEB (Schwalbach) und Roche Applied Science (Mannheim) geliefert. Für die Erhaltung und Vermehrung von Bakterienkulturen wurden Medien der Firma Sigma (Deisenhofen) verwendet. Radionukleotide lieferte Amersham Biosciences. Proteine wurden auf die PVDF-Membran Immobilon P der Firma Millipore (Eschborn) transferiert. Für den Transfer von Nukleinsäuren wurden Hybond N+ Membranen von Amersham Biosciences verwendet. Für Autoradiographie und Chemilumineszenz wurden X-OMAT AR Röntgenfilme (Kodak) und ECL Hyperfilme (Amersham Biosciences) verwendet.

Alle Lösungen wurden mit zweifach destilliertem Wasser hergestellt. Soweit erforderlich, wurden die Lösungen durch Autoklavieren (20 min; 121°C) sterilisiert.

2.2 *E. coli*-Zellkultur

2.2.1 Bakterienstämme und Plasmidvektoren

In dieser Arbeit wurde der Stamm *Escherichia coli* K12, XL1-Blue (Bullock et al., 1987) (recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r_K^- , m_K^+), supE44, relA1, λ^- , lac [F'proAB, lacI^qZΔM15, Tn10 (Tet^r)] zur Anreicherung von pBluescript-Derivaten verwendet.

In dieser Arbeit wurden folgende Plasmidvektoren benutzt:

pBlueskript SK⁻:

(Short et al., 1988; Stratagene) Dieses Plasmid wurde als Vektor für die Klonierung rekombinanter DNA und zur Sequenzierung verwendet.

pcDNA3.1(+):

(Invitrogen, Groningen) Dieses Plasmid wurde für die transiente Expression von Genen in Zellen der menschlichen, embryonalen Nierenzelllinie 293 (HEK 293-Zellen) verwendet.

neo-flox-8:

Dieses Plasmid wurde mir freundlicherweise von Dr. Jan Deussing, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München, zur Klonierung des Targeting-Vektors zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Kulturmedien

LB (Luria-Bertani)-Medium

1% (w/v)	Baktotrypton
0,5% (w/v)	Hefeextrakt
1% (w/v)	NaCl

Zur Herstellung von LB-Agar-Platten wurden 1,5% (w/v) Agar zugesetzt.

Alle Flüssigmedien wurden autoklaviert (20 min; 121°C) und bei RT gelagert. Medien mit Agar wurden autoklaviert und in sterile Petrischalen gegossen (25-30 ml / Schale). Zur Selektion auf plasmidkodierte Antibiotikaresistenz wurde dem LB-Medium Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) zugesetzt. Die Platten wurden bei 4°C gelagert.

2.2.3 Anzucht von *E. coli*-Bakterienkulturen

E.coli-Zellen einer Bakterienkolonie oder einer Vorkultur wurden mindestens 8 h in LB-Flüssigmedium in einem Rotationsinkubator (New Brunswick, Nürtingen) oder in einem

Warmluftschüttler (Braun-Dissel, Melsungen) bei 37°C angezogen. Zur Selektion auf Plasmide wurde das Medium mit geeignetem Antibiotikum (→ 2.2.2) versetzt.

2.2.4 Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation von Plasmid-DNA

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der CaCl₂-Methode nach Mandel & Higa (1970).

50 ml LB-Medium wurde mit einer *E.coli*-Übernachtskultur (ÜK) angeimpft, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bei 37°C inkubiert und 10 min auf Eis abgekühlt. In den folgenden Schritten wurden ausschließlich vorgekühlte Lösungen und Gefäße verwendet und die Zellen stets auf Eis gehalten. Die Zellen wurden zentrifugiert (Sigma 3K12, 5000 x g, 4°C, 10 min), der Niederschlag vorsichtig in 1 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert, auf 25 ml aufgefüllt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml kaltem 0,1 M CaCl₂/25% Glycerin resuspendiert und auf 5 ml aufgefüllt. Nach 2 bis 4 h auf Eis wurden die Zellen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.3 Präparation von Plasmid-DNA

DNA-Präparationen wurden in TE-Puffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH 7,4) aufgenommen und gelagert:

2.3.1 Mini-Präparation

Plasmid-Präparationen wurden durch alkalische Lyse nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Die pelletierten Bakterienzellen aus 1,5 ml Kulturvolumen wurden in 100 µl Lösung I resuspendiert und mit 120 µl Lösung II lysiert, wobei die chromosomale DNA an der Zellwand gebunden bleibt. Zelltrümmer und Proteine wurden nach Zugabe von 150 µl Lösung III ausgefällt und zentrifugiert (Sigma 2K15, 18.000 x g, 4°C, 10 min).

Der Überstand wurde mit Phenol/Chloroform (→ 2.5.1) extrahiert und die Nukleinsäuren mit Ethanol (→ 2.5.2) präzipitiert. Das Pellet wurde getrocknet und in 20 µl TE resuspendiert.

Für die Sequenzierreaktion wurde die DNA mit der LiCl-Methode gereinigt. Dabei werden insbesondere RNA-Verunreinigungen entfernt, so dass die Sequenzierreaktion nicht gestört wird. Die Bakterienzellen aus einer 5 ml Übernachtskultur wurden durch zwei Zentrifugationsschritte (Sigma 2K15, 18.000 x g, RT, 1 min) pelletiert und in 150 µl Lösung I resuspendiert. Die Zellen wurden mit 180 µl Lösung II lysiert und Zelltrümmer und Proteine nach der Zugabe von 225 µl Lösung III präzipitiert. Die Lösung wurde zentrifugiert (Sigma 2K15, 18.000 x g, 4°C, 5 min) und mit Ethanol präzipitiert (→ 2.5.2). Das Pellet wurde in 120 µl 30 mM Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert und zur Präzipitation der RNA mit 200 µl 4 M LiCl versetzt, vorsichtig gemischt und zentrifugiert (Sigma 2K15, 18.000 x g, 4°C, 5 min). Der Überstand wurde mit 1 ml kaltem Ethanol versetzt und zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert und für maximal 1 min im Vakuum getrocknet. Die DNA wurde in 100 µl TE aufgenommen, mit 4 µl RNase-Cocktail (Ambion) versetzt für 5-10 min bei 37°C inkubiert. Zur Reinigung der DNA wurde eine Phenol/Chloroformextraktion (→ 2.5.1) durchgeführt. Die wässrige Phase wurde mit 10 µl 3M NaAc und 300 µl kaltem Ethanol versetzt und zentrifugiert (Sigma 2K15, 18.000 x g, 4°C, 10 min). Das Pellet wurde in einem letzten Schritt mit 70%igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert und in 20 µl TE gelöst.

Lösung I

50 mM Glucose

25 mM Tris/HCl, pH 7,4

10 mM EDTA

Lösung II:

0,2 M NaOH

1% (w/v) SDS

Lösung III:

3 M KAc pH 4,8

2.3.2 Alkalische Maxi- und Mega-Präparationen

Größere DNA-Mengen wurden mit der LiCl-Plasmidpräparation isoliert. Für eine Maxi-Präparation wurden die Bakterienzellen aus einer 250 ml ÜK pelletiert (Beckman J2-21, 5.000 x g, 4°C, 10 min), in 20 ml Lösung I (→ 2.3.1) resuspendiert und mit 24 ml Lösung II (→ 2.3.1) lysiert. Proteine, chromosomale DNA und SDS wurden durch Zugabe von 30 ml Lösung III (→ 2.3.1) gefällt und pelletiert (Sigma 3K12, 5.000 x g, RT, 10 min). Die Lösung wurde durch einen Faltenfilter filtriert (Schleicher & Schuell, 595½, Ø150 mm) der Überstand mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt, zentrifugiert (5.000 x g, 10 min,

4°C) und die Nukleinsäuren in 1,45 ml H₂O und 50 µl 1 M Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert. Durch Zugabe von 2,5 ml 4 M LiCl wurde die RNA gefällt und pelletiert (Sigma 3K12, 5.000 x g, 4°C, 5 min). Der Überstand wurde abgenommen und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 12 ml Ethanol gefällt (→ 2.5.2). Nach einer Zentrifugation (Sigma 3K12, 5.000 x g, 4°C, 15 min) wurde das Pellet in 300-500 µl TE resuspendiert, mit 5 µl RNase-Cocktail (Ambion) versetzt und für mind. 15 min bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend durch Phenol-Extraktion (→ 2.5.1) gereinigt und durch Ethanol-Präzipitation (→ 2.5.2) gefällt. Das Pellet wurde getrocknet und in 200-300 µl TE aufgenommen.

Mega-Plasmidpräparationen wurden aus 500 ml Bakterienkulturen angefertigt. Die Volumina der Lösungen werden entsprechend angepasst.

2.4 Isolierung von genomischer DNA

2.4.1 Isolierung genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen

Embryonale Stammzellen aus der Maus wurden bis zur Konfluenz in 96 well Mikrotiterplatten kultiviert. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 50 µl Lysispuffer/well (10 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 0,5% (w/v) Sarkosyl, 0,4 mg/ml Proteinase K) bei 56°C in einer Feuchtkammer ü.N. inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte auf RT abgekühlt und anschließend mit 100 µl 100% Ethanol für 1 h bei RT inkubiert. Dadurch präzipitiert die genomische DNA. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und die DNA dreimal mit 70% Ethanol gewaschen. Nach Trocknen des Pellets bei RT wurde die DNA entweder in TE gelöst oder direkt mit Restriktionsenzymen inkubiert (→ 2.17.4.5).

Lysispuffer:

10 mM NaCl

10 mM Tris/HCl pH 7,5

10 mM EDTA

0,5% (w/v) Sarkosyl

0,4 mg/ml Proteinase K (frisch hinzu geben)

2.4.2 Präparation genomischer DNA aus Dottersäcken von Embryonen sowie aus Schwanzspitzen von Mäusen

Der Dottersack wurde, wie in 2.18 beschrieben, von den jeweiligen Embryonen isoliert. Zur Amputation der Schwanzspitzen wurden drei Wochen alte Mäuse mit Isofluran betäubt. Nach Setzen der Ohrlochmarkierungen wurde ihnen ein ca. 0,5 cm langes Stück der Schwanzspitze amputiert.

Eine Schwanzspitze bzw. ein Dottersack wurde in 500 µl Lysispuffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM EDTA; 0,5% (w/v) SDS; 1 mg/ml Proteinase K) bei 56°C über Nacht in einem Wasserbad inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Ansatz mehrmals invertiert und zentrifugiert (Sigma 2K15, 18.000 x g; 4°C, 10 min). Der Überstand wurde abgenommen, mit 500 µl Isopropanol versetzt und zentrifugiert (Sigma 2K15, 18.000 x g; 4°C, 30 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 200 µl eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und zentrifugiert (Sigma 2K15; 18.000 X g; 4°C, 5 min). Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 75 µl für einen Dottersack bzw. 150 µl TE für eine Schwanzspitze gelöst.

2.5 Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren

2.5.1 Phenol/Chloroformextraktion

Verunreinigungen von DNA-Lösungen mit Proteinen, Membranbestandteilen etc., die in organischen Lösungsmitteln löslich sind, wurden durch Phenol/Chloroformextraktion entfernt. Das Phenol war TE gesättigt und enthielt 0,01% (w/v) 8-Hydroxychinolin. Die DNA-Lösungen wurden mit dem gleichen Volumen einer 1:1-Mischung aus Phenol und Chloroform versetzt, gut gemischt und zur Phasen-Trennung zentrifugiert (Sigma 2K15, 15.000 x g; RT, 3 min). Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert um Phenolreste zu entfernen. Die DNA wurde anschließend mit Ethanol präzipitiert (→ 2.5.2).

2.5.2 Ethanol-Präzipitation

Um DNA zu konzentrieren oder umzupuffern, kann sie durch Einstellung definierter Salz- und Alkoholkonzentrationen präzipitiert werden. Die DNA-Lösung wurde auf eine LiCl-Konzentration von 0,3 M eingestellt, mit dem 3fachen Volumen Ethanol (abs.) versetzt und gut gemischt. Die DNA wurde durch Zentrifugation (Sigma 2K15, 18.000 x g, 4°C, 5 min) pelletiert. Die Zentrifugationszeit richtete sich nach der Größe und Konzentration der DNA. Je kleiner und je geringer konzentriert die DNA war, desto länger wurde zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in TE aufgenommen.

2.5.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.5.3.1 Konzentrationsbestimmung mit Hilfe von Agarose-Gelen

Die DNA-Menge, die auf ein Agarose-Gel mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 1 µg/ml) (→ 2.5.4) aufgetragen wurde, konnte durch Vergleich mit einem aufgetragenen Größen- und Mengenstandard (→ 2.5.5) anhand der Fluoreszenz-Intensitäten der Banden unter UV-Licht (302 nm) abgeschätzt werden.

2.5.3.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur photometrischen Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Absorption bei 260 nm gemessen. Eine Absorption von 1,0 entspricht 50 µg DNA/ml oder 33 µg Oligonukleotid/ml. Eine Aussage über Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenolresten kann durch Bestimmung der Absorptionen bei 280 nm getroffen werden. Bei reinen DNA-Präparationen sollte der Quotient $A_{260/280}$ nicht kleiner als 1,8 sein.

2.5.4 Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen

Mit der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren für analytische und präparative Zwecke der Größe nach getrennt werden. Für Trennungen im Bereich von 500-10.000 Bp wurden 0,75-2% (w/v) Agarose-Gele verwendet. Als Puffersystem für die Auftrennung in Agarose-Gelen diente 1 x TBE. Die Ethidiumbromidkonzentration betrug sowohl im Gel als auch im Laufpuffer 1 µg/ml. Vor dem Auftrag wurden die Proben mit 1/5 Volumen Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde mit 1 x TBE als Laufpuffer bei 90-120 V durchgeführt. Die DNA-Fragmente konnten unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

10 x TBE:

1 M Tris Base
1 M Borsäure
20 mM EDTA

Probenpuffer (5 x):

100 mM EDTA
20% (w/v) Ficoll 400
0,01% (w/v) Xylencyanol
0,01% (w/v) Bromphenolblau

2.5.5 DNA-Größen- und Mengenstandard

Als DNA-Größenstandard für Agarose-Gele diente EcoRI/HindIII geschnittene λ (cl857 Sam 7)-DNA (MBI Fermentas; Vilnius, Litauen). Die Fragmentgrößen und DNA-Mengen betrugen: 21.226 Bp ($\approx$ 292 ng), 5.184 Bp ($\approx$ 71 ng), 4.973 Bp ($\approx$ 69 ng), 4.268 Bp ($\approx$ 59 ng), 3.530 Bp ($\approx$ 49 ng), 2.027 Bp ($\approx$ 28 ng), 1.904 Bp ($\approx$ 27 ng), 1.584 Bp ($\approx$ 24 ng), 1.375 Bp ($\approx$ 19 ng), 947 Bp ($\approx$ 13 ng), 831 Bp ($\approx$ 11 ng), 564 Bp ($\approx$ 8 ng), 125 Bp ($\approx$ 2 ng). Des Weiteren wurde der DNA-Größenstandard Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (Fermentas) verwendet.

2.5.6 Elution von DNA aus Agarose-Gelen mit der Zentrifugationsmethode

DNA-Fragmente wurden aus Agarose-Gelen mit der Zentrifugationsmethode (Heery et al., 1990) isoliert. Der Deckel eines Eppendorfreaktionsgefäßes wurde entfernt, der Boden mit

einer Kanüle durchstoßen und mit silanisierter Glaswatte gefüllt. Das ausgeschnittene Agarosestück wurde auf die Glaswatte gelegt. Das Reaktionsgefäß wurde in ein zweites Gefäß gesetzt und in einer Eppendorffzentrifuge zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415C, 7.000 x g, RT, 4 min). Das Eluat enthielt das DNA-Fragment. Eine höhere DNA-Ausbeute konnte mit Hilfe des Qiaex II Gel Extraction System (Qiagen, Hilden) erzielt werden. Dabei wurde laut Protokoll des Herstellers verfahren.

2.6 Isolierung von Gesamt-RNA aus embryonalen Mausherzen

Die Gesamt-RNA wurde mit der AGPC-Methode („acid guanidinium-phenol-chloroform“) nach Chomczynski & Sacchi (1987) isoliert. Die RNA wurde als Isopropanolfällung bei -80 °C gelagert.

2.7 Manipulation von Nukleinsäuren

2.7.1 Restriktion von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die DNA wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurden die Ansätze in 1 x Inkubationspuffer (vom Hersteller mitgeliefert) bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur geschnitten. Inkubationen mit mehreren Enzymen wurden bei übereinstimmenden Pufferbedingungen gleichzeitig durchgeführt. Stimmt die Pufferbedingungen nicht überein, wurden zwischen den Inkubationen durch Zugabe der entsprechenden Salze die neuen Pufferbedingungen eingestellt, nach Ethanol-Präzipitation (→ 2.5.2) umgepuffert oder das benötigte Restriktionsfragment aus einem präparativen Agarose-Gel eluiert (→ 2.5.4, 2.5.6). Die Enzymeinheiten, die ein effizientes Schneiden der DNA ermöglichen, wurden berechnet. Das Volumen eingesetzter Nukleasen sollte 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschreiten, da Glycerin (Konzentration > 5%) eine so genannte „Sternaktivität“ bei bestimmten Enzymen auslösen kann. Restriktionsansätze mit Plasmid-DNA aus alkalischer Mini-Präparation, wurden zusätzlich mit RNase-Cocktail (Ambion) versetzt.

Restriktionsanalysen wurden in einem Volumen von 20 µl durchgeführt und, wenn nicht anders vermerkt, nach 1 h Inkubation auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Das Volumen für präparative Ansätze betrug 20-100 µl und wurde vollständig auf das Gel aufgetragen.

2.7.2 Restriktion von genomischer DNA

Die Restriktion genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen wurde in 96-well Multiwellplatten (→ 2.17.4.) durchgeführt. Genomische DNA aus Schwanzspitzen (~8 µg) wurde mit 150 µl Restriktionsmix (1 x Restriktionspuffer, 15 µg BSA/Ansatz, 1 µl RNase-Cocktail, 50 Units Restriktionsenzym) ü.N. bei 37°C inkubiert.

2.7.3 Modifizierung von DNA-Fragmenten

2.7.3.1 Glätten überhängender Einzelstrang-Enden

Überhängende 5'-Enden wurden mit dem Klenow-Fragment der *E.coli* DNA-Polymerase I aufgefüllt (5'→3'-Polymeraseaktivität). Durch die 3'→5'-Exonukleaseaktivität des Enzyms wurden überhängende 3'-Enden abgeschnitten. Der Reaktionsansatz (2 U Klenow-Enzym/µg DNA, Restriktionspuffer A, 100 µM dNTPs) wurde 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend 5 bis 10 min bei 68°C inaktiviert.

2.7.3.2 Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten

Da PCR-Fragmente (→ 2.9) keine endständigen 5'-Phosphat-Gruppen besitzen, wurden sie vor der Ligation (→ 2.7.4.1) in Vektoren phosphoryliert. Die DNA wurde mit 5-10 U T4-Polynukleotidkinase (Roche Diagnostics, Mannheim) in dem mitgelieferten Puffer und 1 mM ATP 1 h bei 37°C inkubiert. Nach 10minütiger Hitze-Inaktivierung der Kinase bei 65°C wurden die Fragmente für die Ligation eingesetzt. Im Falle einer zuvor durchgeführten Klenow-Reaktion mussten die Desoxynukleotide entweder durch Ethanol-Präzipitation (→ 2.5.2) oder durch Agarose-Gelelektrophorese (→ 2.5.4) entfernt werden.

2.7.3.3 Dephosphorylierung von DNA-Vektoren

Die Enden geschnittener Vektor-DNA wurden mit alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim) dephosphoryliert, um eine Religation der Enden zu vermeiden. Die Plasmid-DNA wurde mit 1 U des Enzyms in dem mitgelieferten Puffer für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen EGTA (250 mM) und 10 min Inkubation bei 65°C inaktiviert. Die DNA wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert (→ 2.5.1) und anschließend mit Ethanol präzipitiert (→ 2.5.2) oder gelelektrophoretisch aufgetrennt (→ 2.5.4, 2.5.6) und eluiert.

2.7.4 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.7.4.1 Ligation

In einer Ligation wurden ca. 50 ng geschnittener Vektor und ein 3-5facher molarer Überschuss des DNA-Fragments in 1 x Ligasepuffer (des Herstellers) eingesetzt. Wiesen die Fragmente komplementäre überhängende Einzelstrang-Enden auf, wurde mit 1 U T4-DNA-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim, 1 U/μl) 60 min bei RT bzw. über Nacht bei 16°C ligiert. Fragmente mit glatten Enden wurden mit ~6 μl T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia Biotech, 6,2 U/μl) über Nacht bei 16°C ligiert. Das Reaktionsvolumen betrug 10-20 μl.

2.7.5 Transformation

Der Ligationsansatz (→ 2.7.4.1) wurde zu 50 μl kompetenter Zellen (→ 2.2.4) gegeben, vorsichtig gemischt und mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen auf LB-Agar (100 μg Ampicillin/ml) ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert.

Eine "Retransformation" wurde benutzt, um Plasmid-DNA erneut amplifizieren zu können. Dazu wurden 0,5-1 μl Plasmid-DNA mit 30-50 μl der kompetenten Zellen versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde auf LB-Agar mit Antibiotikum ausplattiert.

2.8 Nachweis spezifischer DNA

2.8.1 Transfer und Immobilisierung von DNA auf Nylonmembran („Southern Blot“)

Der Transfer von DNA auf Membranen wurde nach dem Protokoll von Amersham Bioscience („Alkalischer Transfer von Nukleinsäuren auf Hybond N+“) durchgeführt. Nach der Restriktion wurde die DNA in einem Agarose-Gel aufgetrennt ($\rightarrow$ 2.5.4). Das Gel wurde nach der Elektrophorese für 10 min in 0,25 M HCl, danach für 20 min in 0,4 M NaOH inkubiert. Durch Diffusion wurde die DNA mit Transferpuffer (0,4 M NaOH, 0,6 M NaCl) in 4-12 h auf eine Nylonmembran (Amersham Bioscience, Hybond N+) übertragen. Die Immobilisierung der DNA erfolgte in einem Stratalinker (Stratagene, Heidelberg) durch UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$, $0,12 \text{ J/cm}^2$).

2.8.2 Radioaktive Markierung spezifischer DNA-Sonden

DNA-Fragmente auf Southern Blots wurden mit spezifischen DNA-Sonden nachgewiesen, die mit der „Random priming“-Methode nach Feinberg & Vogelstein (1983) radioaktiv markiert wurden. Die Markierung wurde mit dem „Ladderman Labeling Kit“ (Takara, BIO Inc.) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Radionukleotid diente [α - ^{32}P]-dCTP (spezifische Aktivität $> 6.000 \text{ Ci/mmol}$). Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Gelfiltration über Sephadex G75-Säulen (Pharmacia, Uppsala/Schweden) abgetrennt. Die Markierungseffizienz wurde mit einem Szintillationszähler (Tricarb 2000 CA, United Technologies Packard) bestimmt.

2.8.3 Hybridisierung von immobilisierter DNA mit radioaktiv-markierten DNA-Sonden

Die Hybridisierung wurde bei 65°C durchgeführt. Die Southern Blots wurden für 1-2 h in einer Prähybridisierungslösung (8,46 ml H_2O , 1 mg Dextransulfat, 1 ml 10% SDS; 30 min bei 65°C inkubieren, 0,58 g NaCl hinzugeben, 15 min bei 65°C inkubieren) inkubiert. Die radioaktiv-markierten Sonden (10^6 cpm/ml) wurden mit 5 ml Prähybridisierungslösung aufgefüllt. Diese Hybridisierungslösung wurde über Nacht bei 65°C mit dem Southern Blot

inkubiert. Nach der Hybridisierungsreaktion wurden die Membranen mit Waschpuffer (1x SSC, 0,1% (w/v) SDS) bei 65°C gewaschen. Spezifische Hybride wurden durch Autoradiographie nachgewiesen. Die Belichtung der Röntgenfilme (Hyperfilm ECL) erfolgte für 2-5 Tage unter Verwendung von Verstärkerfolien (Cronex Hi plus, Du Pont) bei -80°C.

20x SSC:

3 M NaCl,

0,3 M Na₃-Citrat, pH 7,0

2.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) können DNA-Fragmente spezifischer Länge und Sequenz amplifiziert werden. In mehreren Zyklen wird die Matrizen-DNA hitzedenaturiert, mit geeigneten Oligonukleotiden ("Primern") hybridisiert und diese mit einer hitzestabilen Polymerase verlängert (Mullis et al., 1986).

Das PCR-Fragment kann mit Restriktionsendonukleasen geschnitten (→ 2.7.1) und in einen geeigneten Vektor kloniert (→ 2.7.2) werden.

2.9.1 Synthese von Oligonukleotiden

Oligonukleotide ("Primer") wurden von der Firma MWG Biotech AG sowie von der Firma Operon synthetisiert und als Lyophilisat geliefert.

2.9.2 Bedingungen für die PCR-Reaktionen

Die Reaktionen wurden in einem "DNA Thermal Cycler" (Perkin Elmer) oder in einem "TRIO-Thermoblock" (Biometra) durchgeführt. Vor dem ersten Zyklus wurde die DNA 2 min bei 95°C denaturiert. Während der Zyklen wurde für je 45 s denaturiert und 50 s

hybridisiert. Die Hybridisierungstemperatur entsprach der niedrigeren Schmelztemperatur (T_m) der beiden Primer. Sie wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$T_m = (G/C) \times 4^\circ\text{C} + (A/T) \times 2^\circ\text{C} - (\text{Basenfehlpaarung}) \times 4^\circ\text{C} - 4^\circ\text{C}$$

Zur Strangverlängerung wurde bei 72°C inkubiert. Die Zeitspanne der Inkubation richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments (1 min für 1 kbp). Es wurden 25 Zyklen zur Klonierung sowie 40 Zyklen zur Genotypisierung durchgeführt. Anschließend erfolgte eine letzte Verlängerung bei 72°C für 2 min (Klonierung) bzw. für 5 min (Genotypisierung). Zur Klonierung wurde die KOD Hot Start DNA Polymerase (Novagen) verwendet und die PCR laut Anleitung angesetzt. Zur Genotypisierung wurde die Thermoprime Plus DNA Polymerase (ABgene) verwendet.

Ein 30 μl PCR-Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

- 1,5 μl Schwanz-DNA
- 0,3 μM je spezifischer Primer
- 3 μl 10 x Thermoprime Plus-Puffer
- 0,7 mM dNTP-Mix
- 2,5 mM MgCl_2
- 0,3 μl Polymerase (2,5 U/ μl)
- ad 30 μl mit H_2O

2.9.3 PCR-Reaktion zur DNA-Mutagenese

Mit der Pfu-Polymerase (Stratagene) wurden gezielt Mutationen eingefügt. Dazu wurde eine PCR-Reaktion, angelehnt an das QuickChange® Site-Directed Mutagenesis-Kit (Stratagene), durchgeführt.

Für einen 50 μl Ansatz wurden folgenden Komponenten verwendet:

- 5 μl Pfu-Puffer
- 50 ng Matrizen-DNA
- 125 ng spezifische Primer
- 0,75 μl 20 mM dNTP
- H_2O zu einem Endvolumen von 50 μl
- 1,0 μl Pfu-Polymerase (2,5 U/ μl)

Die Reaktion wurde in den in 2.9.2 genannten Geräten durchgeführt. Vor dem ersten Zyklus wurde die DNA für 3 min bei 95°C denaturiert. Zu Beginn jedes Zyklus wurde die DNA 35 s denaturiert. Es folgte eine Hybridisierung bei 55°C für 1 min und eine Strangverlängerung von 12 min bei 68°C. Dieser Ablauf wurde 12-18 Mal wiederholt. Eine letzte Verlängerung erfolgte für 5 min bei 72°C.

2.9.4 Reinigung der PCR-Produkte

PCR-Produkte wurden auf ein Gel aufgetragen (→ 2.5.4) und die Fragmente der gewünschten Größe eluiert (→ 2.5.6). Falls diese Reinigung nicht ausreichte, wurden die PCR-Produkte auf ein Gel aufgetragen (→ 2.5.4) und mit Hilfe des Qiaex II Gel Extraction System (→ 2.5.6) eluiert.

2.9.5 Umschreiben von Gesamt-RNA aus embryonalen Mausherzen in cDNA (RT-PCR)

Die RNA eines embryonalen Herzens (→ 2.6) wurde mit Oligo(dT)-Primern und Reverser Transkriptase in Einzelstrang-cDNA (sscDNA) umgeschrieben. Gesamt-RNA eines embryonalen Herzens und 0,5 µg Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer (Invitrogen) wurden in 10 µl H₂O (DEPC-behandelt) für 10 min bei 65°C inkubiert. Die Primer-Hybridisierung erfolgte für 2 min auf Eis. Die cDNA-Synthese erfolgte in einem Endvolumen von 50 µl mit 25 nmol dNTP-Mix, 46 U RNAGuard (Amersham Pharmacia Biosciences), 1 × Erststrang-Puffer (Invitrogen), 0,5 mM Dithiothreitol (Invitrogen), 500 U M-MLV Reverse Transkriptase (Invitrogen) für 1 h bei 37°C. Die sscDNA-Produkte wurden 2 × Phenol/Chloroform gereinigt (→ 2.5.1) und mit Ethanol präzipitiert (→ 2.5.2).

2.10 DNA-Sequenzierung mit dem LI-COR DNA-Sequenzierer

Die Sequenzierung erfolgte im "LI-COR DNA Sequencer Long ReadIR 4200" (MWG-Biotech, Ebersberg) und beruht auf der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al.,

1977). Die DNA-Markierung erfolgte durch eine PCR (→ 2.7) mit IRD800-Fluorophor-markierten Primern. Zur Sequenzauswertung wurde die Software des Geräteherstellers, sowie die Programme PCGene (Bairoch, 1991) und PCSupp (Dr. W. Bönigk, IBI 1/Forschungszentrum Jülich) eingesetzt.

2.10.1 Sequenzierreaktion

Es wurde das Sequitherm Excel II-Kit von BIOzym nach Protokoll des Herstellers verwendet. Pro Kilobasenpaar der zu sequenzierenden DNA wurden ca. 65 ng DNA eingesetzt. Es wurden 0,6 – 0,8 µl der IRD800-Fluorophor-markierten Primer (2 pmol/µl, → Anhang) wurden zugegeben. Die Ansätze wurden mit 17 µl Chill-out 14 Liquid Wax (MJ Research) überschichtet und zur Sequenzier-PCR (→ 2.10.1) eingesetzt.

2.10.2 PCR zur Sequenzierung

Die Reaktionen wurden in einem "TRIO-Thermoblock" (Biometra) durchgeführt. Vor dem ersten Zyklus wurde die DNA 2 min bei 94°C denaturiert. Während der Zyklen wurde 40 s denaturiert. Die Hybridisierung der Primer erfolgte bei 50°C für 40 s. Zur Strangverlängerung wurde bei 70°C für 1 min inkubiert. Es wurden 30 Zyklen durchgeführt.

Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 3 µl Stopp-Puffer, der zusätzlich Xylencyanol (Endkonzentration: 0,2%) enthält, beendet. Zur Denaturierung wurden die Ansätze 2 min auf 70°C erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. 1,8 µl der Proben wurden auf ein Sequenziergel (→ 2.10.3) aufgetragen.

2.10.3 Acrylamid-Gelelektrophorese zur Sequenzierung

Zwei 66 cm lange Glasplatten wurden gründlich mit H₂O und Ethanol gereinigt. Sie wurden durch 0,25 mm starke Abstandshalter getrennt und mit Schraubschienen zusammengedrückt. 41,6 ml einer 4,6% Acrylamid-Gellösung (siehe unten) wurden durch Sonifizieren entgast und mit 350 µl 10% (w/v) APS und 50 µl TEMED versetzt. Die Gellösung wurde in eine

60 ml-Spritze gefüllt und luftblasenfrei zwischen den Gelplatten gegossen. Ein Teflonkamm wurde in das Gel gedrückt, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach 1 h war die Polymerisation des Gels abgeschlossen.

Nachdem das Gel in die Kammer eingespannt war, wurde sie mit 1 x TBE gefüllt. Die Probestaschen wurden von einem "Haifischzahn"-Kamm gebildet, der leicht in die Geloberfläche eingedrückt wurde. Die Elektrophorese wurde bei 45 W und 45°C durchgeführt. Nach einem 30 minütigen Vorlauf wurden die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese dauerte 20 h. Die Leseweiten betrugen zwischen 600 und 1000 Bp.

10 x TBE:

1,34 M Tris Base
450 mM Borsäure
25 mM EDTA
pH 8,3-8,7

4,6% Acrylamid-Gellösung:

21 g Harnstoff
5 ml 10 x TBE
0,5 ml DMSO
5,6 ml Rapid Gel XL (USB; Bad Homburg)
30,5 ml H₂O

2.11 Heterologe Genexpression in HEK 293-Zellen

Die in dieser Arbeit präsentierten stabilen Zelllinien wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Holger Pfeiffer (2006) hergestellt.

Für die heterologe Expression wurden folgende Zelllinien verwendet:

Flp-In-293 Zellen:

In dieser Arbeit wurden HEK (*human embryonic kidney*) Flp-In-293 Zellen (Invitrogen) verwendet.

2.11.1 Kulturbedingungen für Flp-In-293 Zellen

Flp-In-293 Zellen wurden in DH10-Medium bei 37°C, 5% CO₂ und ~95% Luftfeuchtigkeit in Petrischalen (Ø 5 cm) kultiviert. Das DH10-Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt.

Die Generationszeit der Zellen betrug etwa 24 h. Bei ca. 90%iger Konfluenz wurden die Zellen abgelöst und auf neue Schalen verteilt.

Dazu wurden die Zellen zunächst mit 3 ml PBS gewaschen und dann mit 300 µl Trypsin/EDTA bei 37°C abgelöst. Die Zellen wurden in 5 ml DH10-Medium resuspendiert. In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zelldichte der Suspension bestimmt. Für die Erhaltung wurden $\sim 0,5 \times 10^5$ Zellen auf Ø 5 cm Schalen mit frischem DH10-Medium ausgesät. Für die Transfektion wurden 2×10^5 Zellen auf Ø 5 cm Schalen oder 9×10^5 Zellen auf Ø 9 cm Schalen ausplattiert. Nach 30 Passagen wurden die Zellen verworfen und ein neues Aliquot tiefgefrorener Zellen für die Aussaat vorbereitet.

Für die Langzeitlagerung wurden Zellen geerntet, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase (60-70% Konfluenz) befanden, und zu $\sim 2 \times 10^6$ Zellen/ml DH10-Medium mit 10% (w/v) DMSO in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Auftauen der Zellen wurde folgendermaßen durchgeführt: Sie wurden schnell bei 37°C aufgetaut und vorsichtig zu 10 ml DH10 Medium (vorgewärmt) in die Schalen pipettiert und gleichmäßig verteilt im Brutschrank inkubiert.

DH10-Medium:

DMEM (hoch Glukose, Glutamax, Invitrogen)

10% (v/v) FCS (Gibco/BRL)

2 mM L-Glutamin (Gibco/BRL)

1% Penicillin/Streptomycin (Gibco/BRL)

1% nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco/BRL)

PBS:

8 g/l NaCl

0,2 g/l KCl

1,15 g/l Na₂HPO₄

0,2 g/l KH₂PO₄

Trypsin/EDTA:

0,05% (w/v) Trypsin

0,02% EDTA

2.11.2 Stabile Expression von mHCN4 bzw. mHCN4R669Q in Flp-In-293 Zellen

Zunächst wurde die cDNA in den Plasmidvektor pcDNA3.1(+) (Pfeiffer, 2006) kloniert, der die stabile Expression der Gene in Flp-In-293 Zellen ermöglicht. Die Transfektion wurde nach der CaPO_4 -Methode (Chen & Okayama, 1987) durchgeführt. Die Transfektionsansätze hatten folgende Zusammensetzung:

Tabelle 2.1: Komponenten der CaPO_4 -Methode:

	Ø 5 cm Schale
DNA	5-10 µg in 124 µl H_2O
CaCl_2 (1 M)	41 µl
2 x BBS (pH 6,95) (1)	165 µl

(1) 2 x BBS (pH 6,95): 50 mM N,N-bis-(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure (BES); 280 mM NaCl; 1,5 mM Na_2HPO_4

Die Transfektionsansätze wurden 20 min (RT) inkubiert und anschließend zu den Zellen (→ 2.11.1) pipettiert. Die DNA wurde durch eine 20-22 h Inkubation bei 35°C, 3% CO_2 und ~95% Luftfeuchtigkeit präzipitiert. Das Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitat wurde mit 1x PBS/EDTA (2 g EDTA/l) entfernt und die Zellen mit 300 µl Trypsin/EDTA (0,05 % Trypsin, 0,2 g/l EDTA) vom Schalenboden gelöst (~ 5 min bei 37°C). Die Zellen wurden in 4,7 ml DH10-Medium resuspendiert und auf 9 cm-Schalen verteilt. Transfizierte Flp-In-293 Zellen wurden mit dem Antibiotikum G418 (1 mg/ml) selektioniert. Isolierte Kolonien wurden vermehrt, die Membranproteine isoliert (→ 2.12.1) und im Western Blot (→ 2.15) sowie mit immunzytochemischen Methoden (→ 2.16) auf die Expression der Proteine mHCN4 bzw. mHCN4R669Q untersucht. Zellen, die diese Proteine konstitutiv exprimierten, wurden als Flp-In-293mHCN4 (WT) bzw. mHCN4R669Q-Zellen (RQ) bezeichnet.

Für immunzytochemische Methoden wurden die Zellen nach Entfernen des Präzipitats mit 300 µl Trypsin/EDTA versetzt und bis zur Ablösung bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden in 5 ml DH10-Medium resuspendiert und auf Poly-L-Lysin (Sigma) beschichtete Glas-Plättchen in Multiwell-Platten pipettiert (300 µl/Plättchen). Die Plättchen waren zuvor in den Multiwell-Platten mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml, >1 h) inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und dann mit 100 µl DH10-Medium überschichtet worden. Die Zellen wurden 20-22 h bei 37°C, 5% CO_2 und ~ 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.12 Präparation von Membranproteinen

2.12.1 Präparation von heterolog exprimierten Membranproteinen aus Fp-In-293 Zellen

Für Western-Blot Analysen wurden Membranproteine aus Fp-In-293mHCN4 bzw. mHCN4R669Q Zellen isoliert. Das Kulturmedium wurde abgenommen und die Zellen zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Die adhärent wachsenden Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgelöst und zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415 C, 200 x g, 5 min, RT). Der Niederschlag wurde in 0,2 ml (5 cm Schale) Puffer A (10 mM NaCl, 2 mM EDTA, 25 mM HEPES pH 7,5, 0,5 mg/ml Pefabloc SC) aufgenommen, mit einem Pistill homogenisiert und zur Lyse der Zellen für 10 min auf Eis inkubiert.

Nach einer Zentrifugation (Sigma 2K15, 18.000 x g, 4°C, 30 min) wurde der Niederschlag in 30 µl Puffer B (200 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5, 0,5 mg/ml Pefabloc SC) resuspendiert. Tropfenweise wurde das gleiche Volumen einer 2%igen CHAPS-Lösung zugegeben. Die Membranproteine wurden 10 min auf Eis solubilisiert und die entstandenen Micellen zentrifugiert (Sigma 2K15, 8.000 x g, 4°C, 10 min). Der Überstand enthielt die solubilisierten Membranproteine. Die Proteinkonzentration konnte anschließend mit der Amidoschwarz-Methode (→ 2.13.1) bestimmt werden.

2.12.2 Präparation von Gesamtproteinen aus embryonalen Herzen

Zur Präparation der Gesamtproteine wurden 9-10 embryonale Herzen (E9.5-10.5) vereinigt. Das Gewebe wurde in Lysispuffer aufgenommen, mechanisch zerkleinert, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 2 x 15 s sonifiziert (Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company). Anschließend wurde die Lösung mit SDS-Probenpuffer (→ 2.15.1) versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Die gesamte Lösung wurde auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Lysispuffer:

Puffer A (→ 2.12.1)

3 mM DTT

2.13 Quantifizierung von Proteinen

2.13.1 Konzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz

Die Protein-Konzentration von Proben, die mit Detergenzien bzw. Lipiden versetzt waren, wurde mit der Amidoschwarz-Methode bestimmt. Dabei wurde der Amidoschwarz 10B-Farbstoff von Merck (Darmstadt) verwendet. Die Probe wurde mit H₂O auf 200 µl aufgefüllt und mit 20 µl 10% (w/v) SDS vermischt, um die Proteine zu denaturieren. Danach wurden 30 µl 1% (w/v) SDS/1 M Tris/HCl pH 7,5 hinzugegeben. Nach dem Mischen wurden 60 µl 104% (w/v) Trichloressigsäure (TCA) zur Fällung der Proteine hinzugegeben. Die Proben wurden 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf einen Membranfilter (Typ HA, Porengröße: 45 µm; Millipore, Eschborn), der zuvor auf einer Vakuumfilteranlage (Millipore, Eschborn) mit 6% TCA benetzt wurde, aufgetragen. Der Filter wurde mit 2 ml 6% TCA gewaschen und für 3 min mit Färbelösung (0,5% (w/v) Amidoschwarz 10B, 45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 45% (v/v) Wasser) inkubiert, kurz mit H₂O gespült und dreimal für 1 min in Entfärbelösung (90% (v/v) Methanol, 2% (v/v) Essigsäure, 8% (v/v) Wasser) gegeben. Zum Vergleich wurden BSA-Proben (NEB) bekannter Konzentration mit aufgetragen.

2.14 Modifikation von Membranproteinen

2.14.1 Deglykosylierung von Membranproteinen

Die Deglykosylierung von Membranproteinen erfolgte in zwei Schritten: Zunächst wurden die Proteine in 0,5% (w/v) SDS/1% (w/v) β-Mercaptoethanol für 10 min bei 37°C denaturiert. Danach erfolgte die Deglykosylierung in 50 mM PBS/1% Nonidet P-40. Der Ansatz wurde 4 h bei 37°C mit 500 U der Peptid/N-Glykosidase F (PNGase F, NEB) inkubiert. Als Negativkontrolle wurde der gleiche Reaktionsansatz ohne Enzym inkubiert.

2.15 Nachweis immobilisierter Proteine

2.15.1 Trennung von Proteinen durch Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung der Proteine wurde nach Laemmli (1970) in 7,5%igen bis 12,5%igen denaturierenden PAA/SDS-Gelen (Verhältnis Acrylamid : Bisacrylamid = 37,5 : 1) durchgeführt.

Die SDS-PAGE wurde in einer "Minigel Twin"-Kammer (Biometra; Göttingen) (Gelmaße: 0,1 x 8 x 10 cm) durchgeführt. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen SDS-Probenpuffer (1,6% (w/v) β -Mercaptoethanol, 50 mM Tris/HCl pH 7,6, 12,5% (w/v) Glycerin, 0,013% (w/v) Bromphenolblau, 4% (w/v) SDS) versetzt. Die elektrophoretische Trennung (Elektrodenpuffer: 25 mM Tris/HCl, 0,1% (w/v) SDS, 192 mM Glyzin) im Biometra-System erfolgte bei 15 mA im Sammelgel und 20 mA im Trenngel.

2.15.2 Verwendete Protein-Größenstandards

Bei der SDS-PAGE dienten als Größenstandards die Proteine des "Low Molecular Weight Calibration Kit" (LMW-Größenstandard) und des "High Molecular Weight Calibration Kit" (HMW-Größenstandard) von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg. Vor dem Auftrag auf das Proteingel wurde der Marker mit 1 x SDS-Probenpuffer ($\rightarrow$ 2.15.1) versetzt.

Tabelle 2.2: Größenstandards

LMW-Größenstandard		HMW-Größenstandard	
Molekulargewicht (kDa)	Protein	Molekulargewicht (kDa)	Protein
94	Phosphorylase b	212	Myosin
67	Albumin	170	α_2 -Makroglobulin
43	Ovalbumin	116	β -Galaktosidase
30	Carboanhydrase	76	Transferrin
20,1	Trypsin-Inhibitor	53	Glutamat-Dehydrogenase
14,4	α -Lactalbumin		

2.15.3 Transfer und Immobilisierung von Proteinen ("Western-Blot")

Die Proteine wurden im SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt (→ 2.15.1) und in Anlehnung an Towbin et al. (1979) auf PVDF-Membranen ("Immobilon P"; Millipore; Eschborn) transferiert.

Der Transfer ("Western-Blot") wurde in einem "Multiblot-Transfergerät" (Roth, Karlsruhe) im Halbtrockenverfahren nach Herstellerangaben (30 min, 5 mA/cm² Gelfläche, d.h. ~245 mA/Gel) durchgeführt. Der Transfer wurde durch reversible Färbung mit 0,2% Ponceau S (Sigma) in 5% (v/v) Essigsäure überprüft.

2.15.4 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteinen

Der immunologische Nachweis immobilisierter Proteine erfolgte in drei Schritten. Im ersten Schritt wurden die unspezifischen Bindestellen auf der Membran blockiert. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper (Erstantikörper) inkubiert. Der spezifische Antigen-Antikörperkomplex wurde dann mit einem sekundären Antikörper (Zweitantikörper) nachgewiesen, an den Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt war. Die Inkubationsschritte wurden entweder 30-60 min bei RT oder bei 4°C ü.N. durchgeführt. Zwischen den Inkubationsschritten wurde die Membran gewaschen. Alle Inkubations- und Waschschrte erfolgten auf einem Taumler. Die Zusammensetzung der Inkubations- und Waschlösungen sowie der Ablauf der Arbeitsschritte sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst. Die spezifischen Antigen-1.Antikörper-2.Antikörper-Komplexe wurden mit dem "ECL Western-Blot Detection Kit" (Amersham Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben detektiert. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte durch Belichtung von Röntgenfilmen (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) für 10 s bis 2 h.

Tab. 2.3: Zeitlicher Ablauf des immunologischen Nachweises von Proteinen

Arbeitsschritt	Inkubationszeit (-temperatur)	Inkubationslösung
Blockierungsreaktion	30 min (RT) oder ü.N. (4°C)	Blockierungslösung ⁽¹⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	Waschlösung I ⁽²⁾
1. Antikörperinkubation	1-4 h (RT)	Erstantikörper-Inkubationslsg. ⁽³⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	Waschlösung I ⁽⁵⁾
2. Antikörperinkubation	30 min (RT)	Zweitantikörper-Inkubationslsg. ⁽⁴⁾
Waschen	2 x 20 min (RT)	Waschlösung II ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ PBS, 0,05% Tween-20, 5% Milchpulver⁽²⁾ PBS⁽³⁾ 1. Antikörper in PBS⁽⁴⁾ 2. Antikörper in PBS, 0,05% Tween-20⁽⁵⁾ PBS, 0,05% Tween-20**1 x PBS (pH 7,4):**137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄

Folgende Erstantikörper wurden für den immunologischen Nachweis eingesetzt:

a) Erstantikörper:

- PG2-7H9 1:2 (monoklonaler Antikörper aus der Ratte gegen mHCN4, hergestellt im Rahmen der Doktorarbeit von Frau Anja Mataruga, FZ Jülich, → 6.4)
- mHCN4-beta 1:2000 (polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen mHCN4, hergestellt im Rahmen der Doktorarbeit von Frau Anja Mataruga, FZ Jülich, → 6.4)

b) Zweitantikörper:

- Ziege-anti-Ratte, HRP-gekoppelt 1:5000 (Jackson)
- Esel-anti-Kaninchen, HRP-gekoppelt 1:5000 (Amersham Biosciences)

2.16 Immunzytochemie**2.16.1 Fixierung und immunzytochemische Färbungen von HEK 293-Zellen**

Fp-In-293mHCN4 bzw. mHCN4R669Q-Zellen wurden auf Glasplättchen umgesetzt (→ 2.11.2). Nach 24 h wurden die Zellen mit 4% (w/v) Paraformaldehydlösung (PA) auf den Glasplättchen fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

Die immunzytochemische Färbung erfolgte in drei Schritten. Im ersten Schritt wurden die Zellen mit einer Vorinkubationslösung inkubiert. Im Anschluss erfolgte die

Erstantikörperinkubation. Im dritten Schritt wurde der spezifische Antigen-Antikörperkomplex mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweiantikörper nachgewiesen.

Die Zusammensetzung der Inkubations- und Waschlösungen sowie der Ablauf der Arbeitsschritte sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst. Die Schnitte wurden unter einem Konfokalen Laser Mikroskop (Leica TCS) analysiert. Durchlichtaufnahmen wurden ebenfalls mit dem konfokalen Mikroskop und einer Differenziellen Interferenz (DIC oder Normarski)-Optik digital aus einer einzigen Bildebene erzeugt.

Tab. 2.4: Zeitlicher Ablauf des immunzytochemischen Nachweis von Proteinen

Arbeitsschritt	Inkubationszeit (-temperatur)	Inkubationslösung
Blockierungsreaktion	30 min (RT) oder ü.N. (4°C)	Vorinkubationslösung ⁽¹⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	PBS
1. Antikörperinkubation	1 h (RT)	Erstantikörper-Inkubationslsg. ⁽²⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	PBS
2. Antikörperinkubation	30 min (RT)	Zweitantikörper-Inkubationslsg. ⁽⁴⁾
Waschen	2 x 20 min (RT)	PBS

⁽¹⁾ PBS; 0,5% (w/v) Triton X-100, 10% Normal Goat Serum (NGS) ⁽³⁾ 2. Antikörper in PBS⁺

⁽²⁾ 1. Antikörper in PBS⁺

PBS⁺: 5% NGS, 0,5% (w/v) Triton X-100 in PBS

Folgende Antikörper wurden für den immunzytochemischen Nachweis eingesetzt:

- a) Erstantikörper: PG2-1A4 unverdünnt (monoklonaler Antikörper aus der Ratte gegen mHCN4, hergestellt im Rahmen der Doktorarbeit von Frau Anja Mataruga, FZ Jülich, → 6.4)
- b) Zweitantikörper: Ziege-anti-Ratte Alexa488 1:500 (Molecular Probes)

2.17 Embryonale Stammzellkultur

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) sind pluripotente Zellen, die aus Blastozysten isoliert und in Zellkultur überführt werden können (Evans und Kaufmann, 1981; Martin, 1981). In Kultur können die Zellen genetisch manipuliert (Gossler et al., 1986; Robertson et al., 1986) und anschließend in eine Blastozyste injiziert werden. Sie nehmen dann am Aufbau aller

Gewebe des sich entwickelnden Embryos einschließlich der Keimzellen teil. Auf diese Weise erhält man chimären Tiere, die sowohl aus „verändertem“ Stammzellmaterial als auch aus unverändertem „Blastozystenmaterial“ bestehen (Bradley et al., 1984). Einige der Chimären enthalten Keimzellen, die aus den verwendeten ES-Zellen hervorgegangen sind. Verpaart man nun diese Chimären mit Wildtypmäusen, entstehen Nachkommen, die von den „veränderten“ ES-Zellen abstammen.

Diesen „Zustand“ nennt man Keimbahntransmission. Bei der Herstellung veränderter Stammzellen ist es wichtig, Zellkultur-Bedingungen zu wählen, die den undifferenzierten Zustand der Zellen aufrechterhalten. Hierzu werden die Zellen auf mitotisch inaktivierten, primären embryonalen Fibroblasten (Feederzellen) gehalten. Dazu wird dem Medium LIF, ein Cytokin (Myeloische-Leukämie-inhibierender Faktor) zugesetzt (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988). Auf den Feederzellen bilden die ES-Zellen Kolonien. Ihr Differenzierungszustand wird am Mikroskop kontrolliert. Die ES-Zellkolonien dürfen sich nicht berühren. Deshalb müssen sie regelmäßig auf eine neue Platte mit Feederzellen passagiert werden.

Die nachfolgend aufgeführten Techniken sind angelehnt an Protokolle aus Torres und Kühn (1997), Joyner (1993) und Hogan et al. (1994).

Alle Arbeiten mit embryonalen Stammzellen wurden an der Universität zu Köln im Institut für Genetik in der AG von Dr. Ari Waisman durchgeführt.

2.17.1 Medien und Lösungen

Feederzellmedium (EF-Medium):

500 ml DMEM (Hohe Glukose mit Natriumpyruvat, mit Glutamax, Invitrogen)

60 ml FCS (Fötales Kälberserum, für die Zellkultur getestet, GIBCO/BRL)

6 ml Natriumpyruvat 100 x (GIBCO/BRL)

Mitomycin C:

2 mg (Sigma) in 2 ml EF-Medium, in 200 ml EF-Medium verdünnt und steril filtriert.

ES-Zellmedium (ES-Medium):

500 ml DMEM (Hohe Glukose mit Natriumpyruvat, Invitrogen)

75 ml FCS (GIBCO/BRL)

6 ml Natriumpyruvat 100 x (GIBCO/BRL)

6 ml L-Glutamin 100 x (GIBCO/BRL)

6 ml nicht-essentielle Aminosäuren 100 x (GIBCO/BRL)

0,6 ml LIF (Überstand einer Zelllinie, → 2.17.2.4)

0,6 ml 0,1 M β -Mercaptoethanol (50 μ l in 7 ml PBS, steril filtrieren, Merck)

LIF-Medium:

500 ml alpha-MEM-Medium (GIBCO/BRL) ohne Nukleoside

10% (v/v) FCS (GIBCO/BRL)

2 mM Glutamin

5 ml Penicillin/Streptomycin 100 x (GIBCO/BRL)

1 x Trypsin:

10 ml Trypsin 10 x (GIBCO/BRL)

90 ml PBS

Elektroporationspuffer:

20 mM Hepes pH 7,0

137 mM NaCl

5 mM KCl

0,7 mM NaH_2PO_4

6 mM Dextrose

0,1 mM β -Mercaptoethanol

2.17.2 Allgemeine Zellkulturtechniken**2.17.2.1 Sterilarbeit**

Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer Umluft-Werkbank (Heraeus) durchgeführt. Die Isolierung von ES-Zellkolonien fand unter einer Gegenstrom-Werkbank (Stolco) statt.

2.17.2.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen in Einfriermedium (10% (w/v) DMSO in Kulturmedium, 10% (v/v) FCS, auf Eis gekühlt) aufgenommen und in Einfrierröhrchen auf Eis aliquotiert. Die Zellen wurden zunächst bei -80°C eingefroren und zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen im Einfrierröhrchen in einem 37°C Wasserbad geschwenkt und, sobald sie aufgetaut waren, in 9 ml Medium überführt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (Beckman J2-T21, 1.500 rpm, 5 min, 4°C), der Überstand abgenommen und das Zellpellet in Kulturmedium aufgenommen und ausplattiert.

Das Einfrieren von Zellen kann auch in Multiwell-Platten erfolgen. Hierzu werden die Platten mit PBS gewaschen, die Zellen mit 25 µl/well (96-well-Platte) Trypsin abgelöst und die Reaktion mit 25 µl Kulturmedium gestoppt. Dann wurden 25 µl Einfriermedium (20% (w/v) DMSO in Kulturmedium, 10% (v/v) FCS) hinzu gegeben und die Platte bei -80°C eingefroren.

Zum Auftauen werden 500 µl Kulturmedium (vorgewärmt) in jedes well gegeben und die Zellen resuspendiert. Der gesamte Inhalt einer Vertiefung wird dann in eine 24-well-Platte überführt.

2.17.2.3 Bestimmung der Zellenzahl

Eine kleine Menge einer Zellsuspension wurde unter das Deckglas einer Neubaur-Zählkammer gegeben und unter einem Mikroskop die Zellzahl bestimmt. Um die Zellzahl/ml zu erhalten, muss mit 10^4 multipliziert werden.

2.17.2.4 Gewinnung des LIF-Proteins

Das LIF-Protein wurde mir freundlicherweise von Dr. Ari Waisman, Institut für Genetik, Universität zu Köln, zur Verfügung gestellt. Für die Herstellung des Cytokins wurde die CHO Zelllinie 8/24 720 LIF verwendet. Wenn die Zellen in der Kulturschale konfluent gewachsen sind, werden sie dreimal mit PBS gewaschen und weitere 2-3 Tage in MEM-Medium

inkubiert. Dann wird der Überstand abgenommen, die Zelltrümmer abzentrifugiert, die Lösung steril filtriert, aliquotiert und bei -20°C eingefroren. In dem Überstand ist das LIF-Protein enthalten.

2.17.3 Embryonale Feederzellen

2.17.3.1 Präparation embryonaler Feederzellen

Die Feederzellen wurden mir freundlicherweise von Dr. Ari Waisman, Institut für Genetik, Universität zu Köln, zur Verfügung gestellt. Zur Präparation embryonaler Feederzellen wurden Männchen einer IL-4 transgenen Mauslinie (Neomycin-Resistenzgen, Müller et al., 1991) mit C57Bl/6 Weibchen verpaart und die Embryonen am Tag 13.5 unter der Sterilbank entnommen. Vor der Präparation der Zellen wurden Kopf sowie Leber und Herz der Embryonen entfernt. Das Gewebe wurde in einem Erlenmeyerkolben unter leichtem Schütteln zusammen mit sterilen Glasperlen (4-5 mm, 1 x Trypsin) bei 37°C für 30 min verdaut. Der Verdau wurde durch Zugabe von EF-Medium gestoppt und die Zellen abzentrifugiert (1.500 rpm, RT, 5 min). Das Zellpellet wurde in EF-Medium resuspendiert und ca. $2,5 \times 10^6$ Zellen/15 cm Schale ausplattiert. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert. Ca. 5×10^6 Zellen/Aliquot wurden bei -80°C eingefroren, und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.17.3.2 Vermehrung von Feederzellen

Feederzellen können 3-4 Mal passagiert und vermehrt werden bevor sie altern und ihre Teilungsaktivität verlieren. Unmittelbar nach dem Auftauen erhielten die Zellen die Bezeichnung EF₁, nach der ersten Passage und Expansion EF₂ usw. In der Regel wurden nur Feederzellen bis EF₃ verwendet.

2.17.3.3 Mitomycin C-Behandlung

Bevor Feederzellen für die ES-Zellkultur verwendet werden können, müssen sie mitotisch inaktiviert werden. Dies geschieht durch Behandlung mit Mitomycin C (10 µg/ml) für mind. 2 h. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, 5 min mit 1 x Trypsin inkubiert und abzentrifugiert (1.500 rpm, 4°C, 5 min). Das Zellpellet wurde in EF-Medium resuspendiert und $2,5 \times 10^6$ Zellen/9 cm Schale ausplattiert. Nach 24 h wurden die Zellen für die ES-Zellkultur verwendet.

2.17.4 Embryonale Stammzellen

In dieser Arbeit wurden V6.5 embryonale Stammzellen (Open Biosystems) benutzt. Dabei handelt es sich um ES-Zellen, die aus F₁-Embryonen einer Zucht aus C57Bl/6 mit 129/SV-Tieren isoliert wurden.

2.17.4.1 Vermehrung

ES-Zellen teilen sich etwa alle 24 h. Daher wurden sie täglich unter einem inversen Phasenkontrastmikroskop betrachtet und bei zu großer Koloniedichte passagiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 3 min bei 37°C mit 1x Trypsin inkubiert. Anschließend wurde das 2 fache Volumen ES-Medium hinzu gegeben, die Zellen durch pipettieren vereinzelt und zentrifugiert (1.500 rpm, 4°C, 5 min). Das Zellpellet wurde in ES-Medium resuspendiert, $0,8 - 1 \times 10^6$ Zellen/9 cm Platte ausplattiert und das Medium täglich gewechselt.

2.17.4.2 Elektroporation

Für die Elektroporation embryonaler Stammzellen benötigt man eine große Menge sehr einer DNA. 50 µg linearisierte Plasmid-DNA wurde Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend mit 1/10 Vol 3 M NaAc pH 5,0 und 3 Vol Ethanol präzipitiert. Das Pellet wurde

mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und vor der Elektroporation unter sterilen Bedingungen in 100 µl Elektroporationspuffer aufgenommen.

Vor der Elektroporation wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Nach einigen Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und zentrifugiert. Die Zellen wurden in PBS resuspendiert, gezählt und abermals zentrifugiert. $8 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Zellen wurden in 800 µl Elektroporationspuffer aufgenommen und mit der DNA in einer Elektroporationsküvette gemischt (Gene Pulser Cuvette, 0,4 cm, gap 50, BioRad) und bei 25 µF und 400 V bei Raumtemperatur elektroporiert (Gene Pulser, BioRad). Nach der Elektroporation wurden die ES-Zellen auf Feederzellen in frischem ES-Medium ausplattiert.

2.17.4.3 Selektion

Der in dieser Arbeit verwendete Targeting-Vektor ermöglicht eine Positiv-Selektion über G418. Der Targeting-Vektor enthält das Neomycin-Resistenzgen, so dass in Anwesenheit von G418 nur die rekombinanten ES-Zellklone überleben. Mit der Selektion wurde 48 h nach der Elektroporation begonnen. Dem ES-Medium wurden 225 µg/ml G418 (Gibco/BRL) zugegeben. Der Zelltod setzte nach ca. 2 Tagen ein. Die Selektion wurde bis zur Isolierung der resistenten Klone für ca. 9-10 Tage aufrechterhalten.

Zusätzlich besitzt der Targeting-Vektor einen negativen Selektionsmarker – das Gen für Diphtheria-Toxin. Es wird von einem eigenen Promotor getrieben und führt zum Tod von Stammzellklonen, die den Targeting-Vektor nicht-homolog rekombiniert in das Genom integriert haben.

2.17.4.4 Isolierung resistenter embryonaler Stammzellklone

Nach 9-10 Tagen wurden resistente ES-Zellklone mikroskopisch identifiziert. Zur Isolierung der Zellklone die Schale mit PBS gewaschen und mit 10 ml PBS überschichtet. Mit einer P20-Pipette wurden unter dem Stereomikroskop einzelne Kolonien in 20 µl PBS abgenommen und in 50 µl 1 x Trypsin in eine 96-well-Platte übertragen. Nach 15-20 min wurde die Platte bei 37°C für 3 min inkubiert und die Enzymreaktion mit 80 µl ES-Medium gestoppt. Mit Hilfe einer Mehrkanalpipette wurden die Zellen resuspendiert und je 50 µl Zellsuspension in Vertiefungen von drei 96-well-Feederplatten verteilt. Die Vertiefungen

wurden mit 300 µl ES-Medium aufgefüllt und die Zellen bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Zwei der Triplikat-Platten wurden bei -80°C eingefroren. Die Zellen der dritten Platte wurden nach dem Waschen mit PBS trypsinisiert und auf 96-well-Platten ohne Feederzellen verteilt. Aus diesen Zellklonen wurde die DNA isoliert.

2.17.4.5 Analyse der resistenten embryonalen Stammzellklone

Die Identifizierung homolog rekombinanter ES-Zellklone erfolgte mit Southern Blot. Die zur Hybridisierung benutzten Sonden liegen 5'- bzw. 3'-wärts der Homologiebereiche.

Die DNA wurde, wie unter 2.4.1 beschrieben, isoliert. In jede Vertiefung wurden 35 µl des Restriktionsmixes pipettiert und ÜN bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert.

Restriktionsmix:

30 U EcoRI (50 U/µl, Invitrogen)

3,5 µl Puffer 3 (10 x, Invitrogen)

1 mM Spermidin

1 mM DTT

50 µg/ml RNase

3,5 µl 100 x BSA

ad 35 µl H₂O

2.17.5 Blastozysten-Injektion von embryonalen Stammzellen

Die Präparation der Blastozysten, die Injektion der ES-Zellen sowie der Embryo-Transfer wurden im Zentrum für Mausgenetik von Herrn Frank Steiger durchgeführt.

2.17.5.1 Isolierung von Blastozysten

Blastozysten des Inzuchtstamms C57Bl/6 wurden nach Hogan et al., (1994) am Tag 3,5 nach Befruchtung isoliert. Die Blastozysten wurden bis zur Injektion der ES-Zellen bei 37°C und 10% CO₂ im Brutschrank gelagert. Zur Erhaltung des pH-Wertes wurden die Blastozysten in

Hepes-gepuffertem Medium (Blastozystenmedium) inkubiert und mit sterilem Paraffinöl (Sigma) überschichtet.

Um die Anzahl der Blastozysten pro Maus zu erhöhen, wurden die Weibchen durch Gonatropin-Gaben superovuliert (→ 2.23.2).

Blastozystenmedium:

500 ml DMEM (mit Glutamax, ohne Natriumpyruvat, Gibco/BRL)

90 ml FCS (Gibco/BRL)

6 ml Natriumpyruvat (Gibco/BRL)

6 ml nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco/BRL)

6 ml Penicillin/Streptomycin (Gibco/BRL)

6 ml L-Glutamin (Gibco/BRL)

16,7 ml Hepes (Gibco/BRL)

2.17.5.2 Injektion von ES-Zellen

Am Tag der Injektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und im 8 ml ES-Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (1.200 rpm, 4°C, 5 min) und auf eine neue 9 cm Schale ohne Feederzellen ausgesät. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde der Überstand abgenommen und zentrifugiert (1.200 rpm, 4°C, 5 min). In diesem Überstand befinden sich die ES-Zellen, da sich die Feederzellen während der 30 min Inkubation schon abgesetzt haben. In die Schale wurde nach Abnahme des ersten Überstands erneut 10 ml ES-Medium gegeben, kurz geschwenkt, der Überstand wieder abgenommen und zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in jeweils 0,5 ml Injektionsmedium aufgenommen und auf Eis gehalten. Dann erfolgte die Injektion in die Blastozysten an, die nach Hogan et al., (1994) durchgeführt wurde. Nach der Injektion wurden die Blastozysten noch für ca. 1 h bei 37°C und 10% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Es folgte der Embryo-Transfer.

Injektionsmedium:

50 ml Blastozystenmedium

0,0075 g DNase (Sigma)

2.17.5.3 Embryo-Transfer in scheinschwangere Mäuse

Scheinschwangere Weibchen (C57Bl/6) wurden durch Verpaarung mit vasktomierten Männchen (C57Bl/6) gewonnen. 2,5 Tage nach der Paarung wurden die Embryonen in den Uterus transferiert (Hogan et al., 1994).

2.17.5.4 Identifizierung von Chimären

Da es sich um F₁-Stammzellen (C57Bl/6 x 129/SV) handelt und C57Bl/6-Blastozysten verwandt wurden, erfolgte die Identifizierung der Chimären anhand des Agouti-Fellmarkers. Männliche Mäuse mit einem hohen Agouti-Anteil wurden mit C57Bl/6 Weibchen rückgekreuzt. Bei Agouti-farbenen Nachkommen handelt es sich um Keimbahn-transmittierte Tiere, bei schwarzen Tieren ist dies nicht eindeutig zu sagen. Alle Tiere wurden im Alter von 3 Wochen genotypisiert.

2.18 Isolierung von Mausembryonen

Am embryonalen Tag E9.5-12.5 wurden die Embryonen aus dem Uterus der schwangeren Weibchen isoliert. Dazu wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert, dekapitiert und der Bauchraum des Weibchens geöffnet. Der Uterus wurde entnommen und in ADS Puffer (37°C) überführt. Die Präparation der Embryonen aus dem Uterus und das Entfernen des Dottersacks erfolgten unter einem präparativen Binokular (STEMI DV4, Zeiss).

ADS-Puffer:

116 mM NaCl

5 mM KCl

0,8 mM MgSO₄

1 mM NaH₂PO₄

20 mM Hepes

5,5 mM Glukose

pH 7,3

2.19 Immunhistochemie

2.19.1 Anfertigen von Gefrierschnitten

Nach Präparation der Embryonen wurden sie 30 min in 4% Paraformaldehyd fixiert und anschließend dreimal mit Phosphatpuffer (PP) gewaschen. Zur Kyroprotektion wurden die Embryonen für 1 h in 10% Sukrose/PP und ÜN in 30% Sukrose/PP bei RT inkubiert. Danach wurden das Gewebe in Tissue Tek (Sakura) eingebettet und eingefroren. In einem Cryostaten (Reichert-Jung) wurden 16 µm dicke Saggitalschnitte angefertigt und auf Objektträger (SuperFrost Plus, Menzel-Gläser) übertragen. Die Schnitte wurden bei 20°C gelagert.

2.19.2 Immunhistochemische Färbungen

Die Färbung fixierter Schnittpräparate erfolgte in drei Schritten. Zunächst wurde das Gewebe mit Blockierungslösung vorinkubiert. Daran schloss sich eine Inkubation ÜN mit dem Erstantikörper an. Im dritten Schritt wurde der spezifische Antigen-Antikörper-Komplex mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltem Zweiantikörper detektiert. Die Zusammensetzung der Inkubations- und Waschlösungen sowie der Ablauf der Arbeitsschritte sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst. Die Schnitte wurden unter einem Konfokalen Laser Mikroskop (Leica TCS) analysiert.

Tab. 2.5: Zeitlicher Ablauf der immunhistochemischen Färbungen

Arbeitsschritt	Inkubationszeit (-temperatur)	Inkubationslösung
Blockierungsreaktion	1 h (RT)	Blockierungslösung ⁽¹⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	PP
1. Antikörperinkubation	ÜN (RT)	Erstantikörper-Inkubationslsg. ⁽²⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	PP
2. Antikörperinkubation	1 h (RT)	Zweitantikörper-Inkubationslsg. ⁽³⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	PP

⁽¹⁾ PP, 0,5% (w/v) Triton X-100, 5 % (w/v) Chemiblocker ⁽³⁾ 2. Antikörper in PP, 5% (w/v) Chemiblocker (Chemicon)

⁽²⁾ 1. Antikörper in PP, 0,5% (w/v) Triton X-100, 5% Chemiblocker, 0,05% (w/v) NaN₃

Folgende Antikörper wurden für die immunhistochemischen Färbungen eingesetzt:

- a) Erstantikörper: PPcK73 1:400 (polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen mHCN4, hergestellt im Rahmen der Doktorarbeit von Herrn Alexander Scholten, FZ Jülich, → 6.4)
- b) Zweitantikörper: Ziege-anti-Ratte Alexa488 1:500 (Molecular Probes)

2.20 Analyse der embryonalen Herzfunktion

2.20.1 Isolierung embryonaler Mausherzen

Embryonen wurden aus dem Uterus schwangerer Weibchen in ADS-Puffer präpariert (→ 2.18). Danach wurden die Herzen in eine 6-well-Platte in Herzmedium überführt, ÜN bei 37°C und 10% CO₂ im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag untersucht.

Herzmedium:

DMEM (hohe Glukose, mit Natriumpyruvat, mit Glutamax, Gibco/BRL)

10% (v/v) FCS (Gibco/BRL)

2.20.2 Physiologische Untersuchung der embryonalen Herzfrequenz

Die Bestimmung der embryonalen Herzfrequenz wurde folgendermaßen durchgeführt. Die Herzen wurden einzeln in eine Messkammer, die mit Basalmedium gefüllt war, überführt. Das Medium wurde über eine Peltier-Element (Dynamic Temperature Controller, Life Science Resources) auf 37°C konstant temperiert und kontinuierlich ausgetauscht. Die Herzfrequenz wurde mit einer Videokamera (ViewFinder, TILL photonics GmbH) aufgenommen und auf einen Monitor dargestellt. Zur Datensicherung wurden die Aufnahmen auf Videokassetten gespeichert. Zur Stimulation der Herzfrequenz wurde Isoproterenol (2 µM, Sigma) bzw. NKH477 (Colforsin, 100 µM, Tocris) eingesetzt. Beide Substanzen wurden als Stocklösungen in H₂O gelöst, ins Medium auf die entsprechende Konzentration verdünnt und über eine kontinuierlich den Herzen zugeführt. Zur Blockierung der HCN-Kanäle wurde ZD7288 (5 µM, Tocris) eingesetzt. Die Substanz wurde in DMSO (Sigma) als

100 mM Stocklösung gelöst. Die Inkubation der Herzen mit ZD7288 erfolgte über eine kontinuierliche Perfusion. Zur Verdeutlichung ist der Versuchsaufbau in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt:

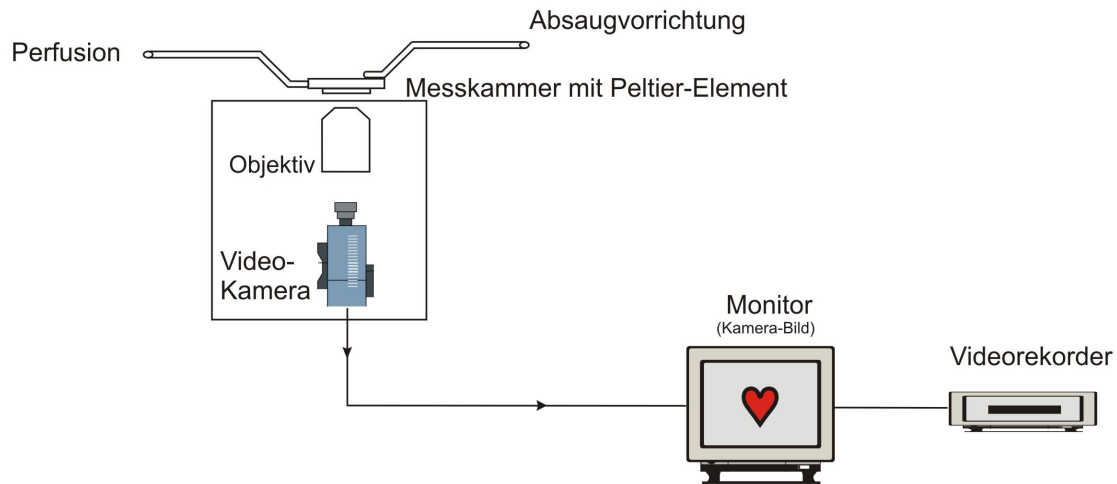


Abb. 2.1: Versuchsaufbau zur physiologischen Untersuchung der embryonalen Herzfrequenz

Eine Videokamera zeichnet die Herzfrequenz auf. Das Bild wird auf einen Monitor übertragen und mit auf eine Videokassette gespeichert. Das Peltier-Element ist in die Messkammer integriert und hält das Medium auf konstant 37°C. Die Erneuerung des Mediums erfolgt über eine kontinuierliche Perfusion.

Die Herzfrequenz wurde in Origin6.1 (Origin Lab Corporation) eingegeben und ausgewertet (→ 2.25). Sowohl die Datenaufnahme als auch die –auswertung erfolgte „blind“, d.h. ohne Kenntnis des Genotyps.

Basalmedium:

Herzmedium (→ 2.20.1)

10 mM Hepes pH 7,4

2.21 Elektrophysiologische Untersuchung

Die elektrophysiologische Charakterisierung der heterolog exprimierten HCN-Kanäle in Flp-in-293 Zellen als auch der nativen Kanäle in embryonalen Kardiomyozyten wurde von Dr. Reinhard Seifert (IBI-1, Forschungszentrum Jülich) durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit der „Patch clamp“-Technik (Hamill et al., 1981) in der „whole-cell“ Konfiguration. Der Pipettenwiderstand betrug 5-20 MΩ. Die elektrophysiologischen Messungen wurden bei

definierter Spannung (Spannungsklemme) bzw. definiertem Strom (Stromklemme) (Axopatch 200A, Axon Instruments, Burlingame, USA) durchgeführt. Die Messwerte wurden auf einem IBM-kompatiblen Computer gespeichert (A/D-Wandler: TL-1 und Software: pClamp 6.03, Axon Instruments, Burlingame, USA). Den Analysen liegen folgende Überlegungen zugrunde: Die Amplitude I des gemessenen Stroms bei einer gegebenen Spannung hängt durch folgende Beziehung von der Anzahl der Kanäle in der Zelle bzw. im Patch (N), dem Einzelkanalstrom (i) und der Offenwahrscheinlichkeit (P_o) der Kanäle ab:

$$I = N \cdot i \cdot P_o$$

Sowohl der Einzelkanalstrom als auch die Offenwahrscheinlichkeit sind Funktionen der angelegten Spannung. Die Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit wurde bei konstantem i bestimmt. Dazu wurden, ausgehend von einem Haltepotenzial von +10 mV, Testpotenziale zwischen 10 mV und -120 mV angelegt. Im Anschluss an die Testpotenziale wurde ein Messpotenzial von -80 mV angelegt. Das Messpotenzial bestimmt i , die Offenwahrscheinlichkeit unmittelbar nach dem Spannungssprung resultiert jedoch noch aus dem zuvor angelegten Testpotenzial. Die bei dem Messpotenzial angelegten Ströme werden als *tail currents* bezeichnet. Zur Auswertung wurden die *tail currents* auf den maximalen *tail current* ($I/I_{\max}$) normiert. $I/I_{\max}$ entspricht der relativen Offenwahrscheinlichkeit ($P_o/P_{\max}$). Wird $I/I_{\max}$ gegen das Testpotenzial aufgetragen, erhält man die Aktivierungskurve des Kanals.

Die Parameter zur Bestimmung der Aktivierungskurve wurden mit der Boltzmann-Gleichung bestimmt:

$$I = (I_{\max} - I_{\min}) (1 + \exp((V_m - V_{1/2})/s))^{-1} + I_{\min}$$

2.21.1 Untersuchungen der heterolog exprimierten HCN-Kanäle

Die elektrophysiologische Untersuchung der heterolog exprimierten HCN-Kanäle erfolgte wie in 2.21 beschrieben.

Lösungen:

Die extrazelluläre Lösung enthielt (in mM): 140 NaCl, 5,4 KCl, 1,8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES, 10 Glukose, pH 7,4 (NaOH). Die intrazelluläre Lösung enthielt (in mM): 130 KAsp, 10 NaCl, 2 MgCl₂, 1 EGTA, 2 NaATP, 10 HEPES, pH 7,2 (KOH). Zusätzlich enthielt die intrazelluläre Lösung, wenn angegeben, 100 µM cAMP.

2.21.2 Untersuchungen der nativen HCN-Kanäle in embryonalen Kardiomyozyten**2.21.2.1 Isolierung embryonaler Kardiomyozyten**

Am Tag E9.5 – 11 wurden Embryonen aus schwangeren Mäusen entnommen (→ 2.18) und die Herzen in PBS (4°C) isoliert. Anschließend wurden die Herzen in Collagenase-Lösung überführt und für 25 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde der größte Teil des Überstands vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Collagenase-behandelten Herzen wurde mit 20% DMEM (siehe unten) versetzt und für 30 min in einem Tischrüttler bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Einzelzellen auf mit 0,1% (w/v) Gelatine beschichteten Glasplättchen ausplattiert. Alternativ wurden die Zellen auf unbeschichtete Deckel von 3 cm Petrischalen (Greiner) ausgesät. Nach 12 h wurde das Medium gewechselt.

Collagenase-Lösung:

1 mg/ml Collagenase B (Roche Diagnostics GmbH)
120 mM NaCl
5,4 mM KCl
5 mM MgSO₄
5 mM Natriumpyruvat
20 mM Taurin
10 mM Hepes
20 mM Glukose
30 µM CaCl₂

20% DMEM:

→ für 100 ml Medium:

20 ml FCS (Gibco/BRL)

1 ml nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco/BRL)

1 ml Penicillin/Streptomycin (Gibco/BRL)

100 µl Stocklösung β -Mercapthoethanol

78 ml DMEM

(Stocklösung β -ME: 35 µl β -ME in 5 ml PBS)

2.21.2.2 Elektrophysiologische Untersuchungen

Die elektrophysiologische Untersuchung der embryonale Kardiomyozyten erfolgte wie in 2.21 beschrieben. Die Aktionspotenziale der Kardiomyozyten wurden mit der Methode der Stromklemme ($I = 0$ pA) aufgezeichnet.

Lösungen:

Die extrazelluläre Lösung enthielt DMEM mit 10 mM HEPES, pH 7,4 (NaOH). Die intrazelluläre Lösung enthielt (in mM): 130 KAsp, 10 NaCl, 2 MgCl₂, 1 EGTA, 2 NaATP, 10 HEPES, pH 7,2 (KOH). Zusätzlich enthielt die intrazelluläre Lösung, wenn angegeben, 100 µM cAMP.

2.22 Fluoreszenzoptische Messungen in Multiwellplatten

Die hier präsentierten Messungen wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Holger Pfeiffer (2006) durchgeführt.

2.22.1 Spannungssensitive Fluoreszenzfarbstoffe

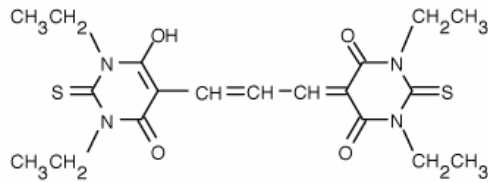


Abb.2.2: Strukturformel des spannungssensitiven Farbstoffs bis-(1,3-diethylthio-barbituric acid) trimethine oxonol (DiSBAC₂(3)). Dieser anionische Oxonol-Farbstoff gehört zur Gruppe der „langsamen“ Farbstoffe

Spannungssensitive Fluoreszenzfarbstoffe lassen sich in zwei Klassen unterteilen: „langsame“ und „schnelle“ Farbstoffe. Zu den „langsamen“ spannungssensitiven Farbstoffen gehören z.B. positiv geladene Farbstoffe auf Cyanin- oder Rhodaminbasis, oder auch anionische Oxonol-Farbstoffe (→ Abb. 2.2).

In der Zelle und in der Zellmembran zeigen diese Farbstoffe eine intensive Fluoreszenz, während sie in der wässrigen extrazellulären

Phase nur sehr schwach fluoreszieren. Eine

Änderung der Membranspannung (V_m) führt bei diesen Nernst-Farbstoffen zu einer Umverteilung von Farbstoffmolekülen zwischen extrazellulärer Phase, der Zellmembran und dem Zellinneren (Übersicht: Plasek & Sigler, 1996). Dadurch lässt sich eine spannungsabhängige Änderung der Fluoreszenzintensität der Zelle beobachten. Da der Umverteilungsprozess relativ langsam ist, betragen die Zeitkonstanten für die Änderungen der Fluoreszenzintensität, je nach Farbstoff, ca. 1-20 s. Die absolute Änderung der Fluoreszenzintensität beträgt bei dieser Farbstoff-Gruppe ca. 1-2% pro 1 mV Änderung des Membranpotenzials.

Zur Klasse der „schnellen“ spannungssensitiven Farbstoffe zählen z.B. Styryl-Farbstoffe und auch einige Oxonole. Diese amphiphatischen Moleküle fluoreszieren praktisch nicht in wässriger Lösung. Sie lagern sich jedoch in die Membran von Zellen ein und zeigen dort eine starke Fluoreszenz. Eine Änderung von V_m führt bei den sog. elektrochromen Farbstoffen (z.B. Styryl-Farbstoffe) zu einer Änderung der Elektronenverteilung im Farbstoffmolekül (sog. *Stark shift*). Dadurch verschiebt sich das Fluoreszenzspektrum der Farbstoffe. Andere „schnelle“ Farbstoffe (z.B. Oxonole) verändern spannungsabhängig ihre Position in der Membran, was ebenfalls zu einer Änderung der spektralen Eigenschaften führt. Die Zeitkonstanten für diese Prozesse betragen weniger als eine Millisekunde. Die spannungsabhängige Verschiebung des Spektrums ist sehr klein. Deshalb kann selbst bei optimaler Filterwahl meist nur eine geringe Änderungen (ca. 0,1% pro 1 mV) der Fluoreszenzintensität detektiert werden (Überblick: Ebner & Chen, 1995).

Für die hier gezeigten Messungen wurde als Fluoreszenzfarbstoff das „Membrane Potential Kit“ (MolecularDevices) eingesetzt. Es enthält „langsame“ Farbstoffe. Diese wurden in ES-Lösung gelöst und nach Herstellerangaben verwandt.

ES-Lösung:

120 mM NaCl

5 mM KCl

2 mM MgCl₂

2 mM CaCl₂

10 mM HEPES

10 mM Glucose

pH 7,4

2.22.2 Ausplattieren von HEK 293-FlpIn Zellen auf Multiwellplatten

Für die Messungen wurden Zellen in 384-well-Platten (Greiner; Microplatte, 384 wells, PS, F-Boden µClear, High Binding, Schwarz) ausgesät. Die Zellen (auf Ø 9 cm Schalen) wurden bei ca. 90 %iger Konfluenz mit 5 ml PBS gewaschen, mit 1 ml Trypsin/EDTA bei 37°C für einige Minuten inkubiert und in 9 ml DH10-Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde anschließend mit DH10-Medium auf 4×10^5 Zellen/ml verdünnt. Von dieser Suspension wurden entweder 50 µl ($\approx$ 20000 Zellen/well) oder 25 µl ($\approx$ 10000 Zellen/well) in die Vertiefungen der 384-well-Platten gegeben. Die Platten wurden zuvor mit einer Poly-L-Lysin Lösung (01mg/ml) für mindestens 1 h inkubiert. Die Messungen erfolgten 24 h bzw. 48 h nach dem Ausplattieren der Zellen.

Für die Experimente wurde das DH10-Medium vorsichtig mit einer kleinen Kanüle abgesaugt und durch die jeweilige Messlösung bzw. Farbstofflösung ersetzt. Die Fluoreszenzänderungen wurden nach Zugabe folgender Substanzen untersucht: NKH477 (Tocris), Isoproterenol (Sigma), ZD7288 (Tocris).

2.22.3 Messungen

Fluoreszenzoptische Messungen der Zellen in Multiwellplatten wurden mit der FlexStationII³⁸⁴ der Firma MolecularDevices durchgeführt. Dieses System ermöglicht die zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenzintensität in den Vertiefungen (*wells*) von 96- bzw. 384-well-Platten. Die Messung kann in einer einzelnen Vertiefung oder in bis zu 384 Vertiefungen gleichzeitig erfolgen (*KinetikMode*). Diese werden an einem optischen Messkopf vorbeigeführt. Die maximale Zeitauflösung für Messungen an einer einzelnen Vertiefung beträgt 50 ms. Werden 384 Vertiefungen simultan gemessen, so kann für jede maximal alle 29 Sekunden ein Datenpunkt aufgenommen werden. Die Fluoreszenz kann entweder von oben, für zellfreie Assays (*top read*), oder von unten, für Assays mit adherenten Zellen (*bottom read*), angeregt und detektiert werden. Abbildung 2.3 verdeutlicht das Messprinzip für beide Konfigurationen.

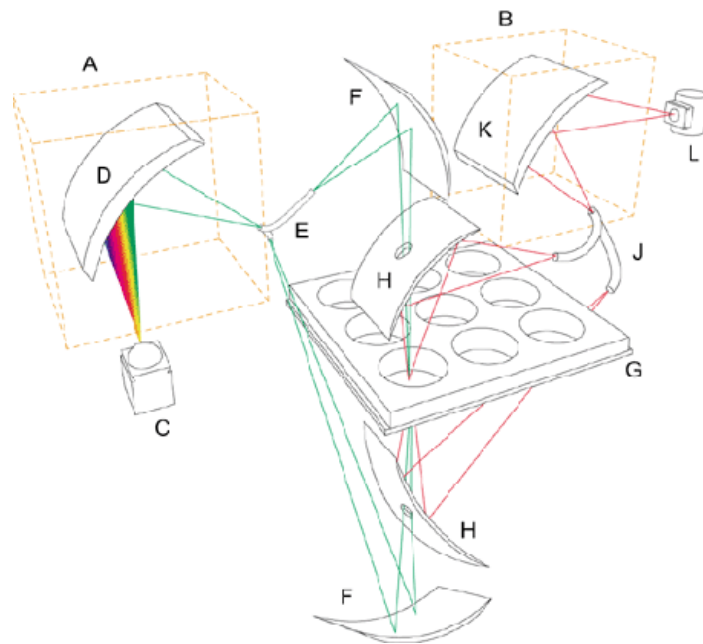


Abb 2.3: Prinzip der Anregung (grüne Linien) und Detektion (rote Linien) von Fluoreszenz in Multiwellplatten mit der FlexStationII³⁸⁴. Die Fluoreszenz kann entweder von oben (*top read*) oder von unten (*bottom read*) angeregt und detektiert werden. Das System verfügt über einen Anregungsmonochromator (A) und einen Emissionsmonochromator (B). Als Lichtquelle dient eine Xenon Blitzlampe (C). Über das bewegliche Ablenksgitter (D) kann Licht einer bestimmten Wellenlänge (grüne Linie) aus dem Spektrum der Xenonlampe ausgewählt werden. Dieses Licht wird über Lichtleiter (E) und Spiegel (F) entweder von oben oder von unten in die Vertiefung der Mikrowellplatte (G) fokussiert. Emittiertes Fluoreszenzlicht gelangt über fokussierende Spiegel (H) und Lichtleiter (J) zum beweglichen Emissions-Ablenksgitter (K). Hiermit wird die gewünschte Wellenlänge aus dem Spektrum des emittierten Lichtes ausgewählt. Ein Photomultiplier (L) detektiert und verstärkt die Intensität des emittierten Lichtes. (Abbildung: www.moleculardevices.com)

Die FlexStationII³⁸⁴ verfügt über einen 16-Kanal-Pipettierkopf. Der Pipettierkopf ermöglicht einen „plate to plate“ Transfer von Lösungen (*FlexMode*) zur zeitaufgelösten Messung der

Fluoreszenzintensität von Vertiefungen einer Spalte. Dabei können zwischen 1-30 µl Lösung aus einer *compound plate* in die Vertiefungen der *assay plate* pipettiert werden. Dafür werden Einwegspitzen (MolecularBioproducts oder MolecularDevices) verwendet.

2.23 Versuchstiere

2.23.1 Haltung und Zucht

Die Mäuse wurden in der Zentralen Tierhaltung des Forschungszentrums Jülich gehalten. Die Tiere wurden *ad libitum* mit einer „Zuchtdiät für Ratten und Mäuse“ (Altronin 1314) gefüttert und mit Trinkwasser versorgt. Im Alter von drei Wochen wurden die Nachkommen von ihren Müttern abgesetzt, nach Geschlechtern getrennt und genotypisiert.

Heterozygote Tiere, die die Neomycin-Selektionskassette enthalten ($\text{HCN4}^{+/\text{neoR669Q}}$), wurden mit Cre „deleter“ Mäusen (CMV-Cre) verpaart. In den Nachkommen ist dadurch die Selektionskassette in alle Zellen, inkl. Keimzellen, deletiert. Diese heterozygoten Nachkommen ($\text{HCN4}^{+/\text{R669Q}}$) wurden dann miteinander verpaart. Die Mäuse haben einen gemischten Hintergrund aus C57Bl/6 und 129/Sv, da die embryonalen Stammzellen aus F1-Embryonen aus einer Zucht von C57Bl/6 mit 129/Sv Tieren stammen. Daher wurden die Tiere auf einen reinen C57Bl/6 Hintergrund rückgekreuzt.

2.23.2 Versuchstiere

Um das genaue Alter der Embryonen bestimmen zu können, wurden die Mäuse kontrolliert verpaart. Dazu wurde den heterozygoten Weibchen ($\text{HCN4}^{+/\text{R669Q}}$) am ersten Tag 10 IU Intergonan (Intervet GmbH, 323291) i.p. gespritzt. Am dritten Tag wurden die Weibchen mit 10 IU Ovogest (Intervet GmbH, 20303) gespritzt und 1:1 mit heterozygoten Männchen ($\text{Hcn4}^{+/\text{R669Q}}$) Männchen verpaart. Am vierten Tag wurden die Weibchen auf Vaginalpfropf (plug) untersucht. Ist dieser vorhanden, wird dieser Tag als embryonaler Tag 0,5 (E0,5) festgelegt.

2.24 Analyse der Herzfunktion in adulten Mäusen

Die Analyse der Herzfunktion wurde an 12-15 Wochen alten C57Bl/6 HCN4^{+/+} und HCN4^{+/R669Q} Mäusen durchgeführt. Alle Messungen wurden von Priv.Do. Dr. Paulus Kirchhof, Universitätsklinik Münster durchgeführt.

2.24.1 Telemetrisches Elektrokardiogramm (EKG)

Den Mäusen wurde unter Narkose (50 mg Ketamin, 20 mg Xylazin i.p.) ein telemetrischer EKG-Transmitter (Data Science; Minneapolis, MN) in die Bauchhöhle implantiert. Die EKG-Elektroden wurden subkutan in den Bereich der rechten Schulter und des linken Beins platziert, so dass eine Ableitung II nach Einthoven ermöglicht wird.

Nach der Implantation wurde ca. 2 Wochen gewartet, bis sich die Tiere vollständig von dem Eingriff erholt hatten. Danach wurden die Messungen durchgeführt.

- a) 24 h EKG: Über einen Zeitraum von 24 h wurde in jeder Stunde für 5 min das EKG gemessen.
- b) Schwimmen: Diese Messungen wurden tagsüber durchgeführt. Das EKG wurde zunächst über einen Zeitraum von 1 h gemessen. Dabei wurde für die Analyse ein Zeitraum von 5 min gewählt. Dann wurden die Tiere in einen mit Wasser gefüllten Behälter gegeben. Um an der Wasseroberfläche zu bleiben, müssen die Tiere schwimmen. Diese Belastung ist submaximal für die Tiere. Nach dem „Schwimmtest“ werden die Tiere zurück in den Käfig gesetzt und das EKG für 1 h aufgezeichnet. Es wurden wiederum 5 min für die Datenanalyse herangezogen.
- c) Heißer Luftstrom: Die Messung wurde analog zu b) durchgeführt. Bei diesem Test wird den Tieren durch den heißen Luststrom die Nähe eines Feindes suggeriert.

2.24.2 Untersuchung isolierter Herzen in der Langendorff-Apparatur

Die Herzen der Mäuse wurden durch mediane Thorakotomie zügig explantiert und in einer vertikalen Langendorff-Apparatur (Hugo Sachs Harvard Apparatus; March-Hugstetten, Germany) mit Krebs-Henseleit Lösung (37°C) perfundiert. Nach einer Erholungsphase von 10 min wurden die Herzen konstant mit 90–100 mmHg perfundiert und die Flussrate

gemessen. Danach wurde die Flussrate konstant bei $4 \text{ ml} \pm 1 \text{ ml}$ gehalten. Währenddessen wurde ein oktopolarer Katheter (CI'BER mouse, NuMed) in das rechte Atrium und in den rechten Ventrikel eingeführt. Zusätzlich wurden zwei monophasische Aktionspotential-Katheter auf das Epikard des linken und rechten Ventrikels befestigt. Nach einer erneuten Erholungsphase von 10 min wurde der spontane Herzrhythmus über 5 min gemessen. Das rechte Atrium wurde daraufhin mittels des Oktopolaren Katheters auf eine konstante Schlagfrequenz (Zykluslänge: 80 – 140 ms, entspricht einer Schlagfrequenz von 430 – 750 Schläge/min) eingestellt. Die jeweilige Frequenz wurde für 1,5 min gehalten und währenddessen die Aktionspotenzialdauer (APD) bestimmt. Danach wurde die Refraktärzeit bestimmt. Dabei handelt es sich um den Abstand zwischen zwei Stimuli, bei dem der nachfolgende Stimulus keine Aktion des Atriums mehr auslöst. Die Refraktärzeit wurde mittels kontinuierlicher Stimulation und nachfolgendem Extrastimulus des rechten Atriums ermittelt. Das Protokoll wurde analog während der Perfusion mit Orciprenalin ($0,74 \mu\text{M}$) wiederholt. Das Herz wurde zunächst 2 min mit Orciprenalin perfundiert bevor über einen Zeitraum von 10 min die Zunahme der Herzschlagfrequenz bestimmt wurde. Danach wurde auf normale Krebs-Henseleit-Lösung gewechselt und das Orciprenalin über 5 min ausgewaschen.

Krebs-Henseleit Lösung:

118 mM NaCl

24,88 mM NaHCO_3

41,2 mM KH_2PO_4

5,55 mM Glukose

2 mM Na-Pyruvat

0,83 mM MgSO_4

1,8 mM CaCl_2

4,7 mM KCl

2.24.3 Datenanalyse

Die Daten der telemetrischen EKG-Messungen sowie die Messungen der isolierten Herzen in der Langendorff-Apparatur wurden von Priv.Do. Dr. Paulus Kirchhof mittels eines, für diese Anwendung geschriebenen, Software-Programms analysiert.

Die Auswertung erfolgte „blind“, d.h. der Genotyp des Versuchstieres war nicht bekannt. Mit Hilfe des telemetrischen EKGs wurde die Herzfrequenz anhand der Zykluslänge bestimmt. Zusätzlich wurden die Länge des PQ-Intervalls sowie die Standardabweichung des RR-Intervalls ($\equiv$ 1 Zyklus) über einen Zeitraum von 2 h als Maß für die Variabilität des Herzschlags bestimmt. Anhand der Messungen in der Langendorff-Apparatur konnte die spontane Zykluslänge vor und während der Stimulation mit Orciprenalin sowie die ventrikuläre Aktionspotentialdauer (APD) bestimmt werden. Sowohl die Daten des telemetrischen EKGs als auch die Daten aus den Messungen am isolierten Herzen wurden manuell nach Arrhythmien untersucht.

2.25 Statistische Analyse

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit Origin6.1 (Origin Lab Corporation). Die ermittelten Werte sind als arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung bzw. Standardfehler angegeben. Für die Prüfung auf Signifikanz wurde der t-Test für unverbundene Stichproben angewandt.

3. Ergebnisse

HCN-Kanäle sind an der Ausbildung spontan rhythmischer Aktivität im Herzen und im Gehirn beteiligt. Dabei scheint besonders der Einfluss von cAMP auf die Kanalaktivität eine wichtige Rolle in der Ausbildung und Regulation der rhythmischen Aktivität zu spielen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit Hilfe einer HCN4^{R669Q} *Knock-in* Mauslinie untersucht werden, welche physiologische Bedeutung die Bindung von cAMP an HCN4 im Herz und im Gehirn hat.

Der Ergebnisteil dieser Arbeit gliedert sich in fünf Abschnitte. Im ersten Abschnitt werden die Untersuchungen an den heterolog exprimierten HCN4-Kanalgenen beschrieben. Der zweite Abschnitt erläutert die Herstellung der HCN4^{R669Q} *Knock-in* Mauslinie. Die Charakterisierung dieser Mauslinie wird in den folgenden Abschnitten beschrieben.

3.1 Charakterisierung der heterolog exprimierten mHCN4-Kanalgene

Die cDNA des mHCN4-Kanals und der mHCN4^{R669Q}-Mutante wurden stabil in Flp-In-293 Zellen integriert (→ 2.11). Die Analyse der Proteinexpression und der elektrophysiologischen Eigenschaften des mutierten Kanals im Vergleich zum Wildtypkanal bildeten die Grundlage für die Herstellung der HCN4^{R669Q} *Knock-in* Mauslinie.

3.1.1 Analyse der Proteinexpression

Die Expression der HCN4-Proteine in den Zelllinien Flp-In-293mHCN4 (WT) und Flp-In-293mHCN4^{R669Q} (RQ) wurde mit biochemischen und immunzytochemischen Methoden untersucht. Abbildung 3.1 zeigt das Ergebnis der Western-Blot-Analyse für jeweils einen Klon der beiden Zelllinien.

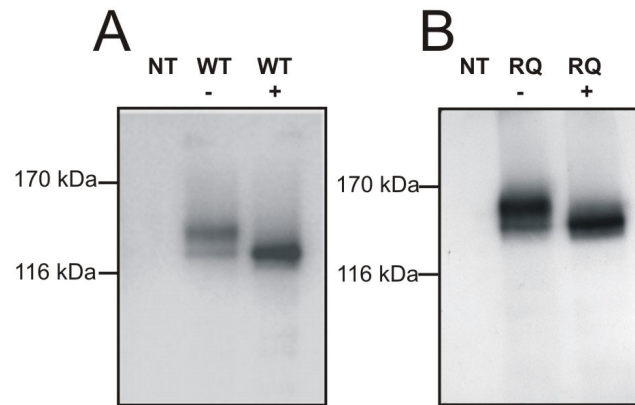


Abb. 3.1: Western-Blot-Analyse der Zelllinien Flp-In-293mHCN4 und Flp-In-293mHCN4^{R669Q}. Der Größenstandard ist links neben den Teilabbildungen (kDa) angegeben. **A.** NT: Membranproteine aus nicht-transfizierten Zellen (6,5 µg). WT-: Membranproteine aus Flp-In-293 mHCN4-Zellen, Klon 3D2 (6,5 µg) ohne PNGaseF, WT+: siehe WT-, mit PNGaseF-behandelt. **B.** NT: Membranproteine aus nicht-transfizierten Zellen (6,5 µg). RQ-: Membranproteine aus Flp-In-mHCN4R669Q-Zellen, Klon 2A5 (6,5 µg) ohne PNGaseF, RQ+: siehe RQ-, mit PNGaseF-behandelt. Antikörper: 1. mHCN4-beta 1:2000, 2. Esel-anti-Kaninchen, HRP-gekoppelt 1:5000.

Für die Western-Blot-Analyse des Wildtypkanals wurde der Zellklon 3D2 und für die Kanalmutante der Klon 2A5 verwendet. Von diesen Zellen wurden die Membranproteine präpariert, entweder unbehandelt oder mit PNGaseF behandelt in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen (→ 2.15). Zur Kontrolle wurden Membranproteine nicht-transfizierter Zellen aufgetragen. In dieser Kontrollspur (NT) erkennt der spezifische HCN4-Antikörper kein Protein. In der Spur, in der die Proteine der 3D2 Zelllinie aufgetragen sind, erkennt der Antikörper zwei Banden (~150 und ~130 kDa) (Abb. 3.1.A, Spur WT-). Dabei stimmt die untere Bande mit dem errechneten Molekulargewicht des Proteins (132 kDa) überein, das vom längsten offenen Leserahmen der mHCN4-cDNA kodiert wird. Die obere Bande wird durch die PNGaseF-Behandlung auf die Größe von ~130 kDa reduziert (Abb. 3.1A, Spur WT+). Das bedeutet, dass das HCN4-Protein in den Zellen glykosyliert vorliegt. Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse des Klons 2A5 der Flp-In-293mHCN4^{R669Q}-Zelllinie und der 3D2-Zelllinie sind ähnlich. Auch hier erkennt der Antikörper in unbehandelten Proben zwei Banden. Nach PNGaseF-Behandlung ist nur noch die 130 kDa-Bande vorhanden, die dem errechneten Molekulargewicht des HCN4-Proteins entspricht (Abb. 3.1B).

Immunzytochemische Untersuchungen der Zelllinien (→ 2.16) ergaben für beide Zelllinien spezifische HCN4-Färbungen im Bereich der Plasmamembran (Abb. 3.2).

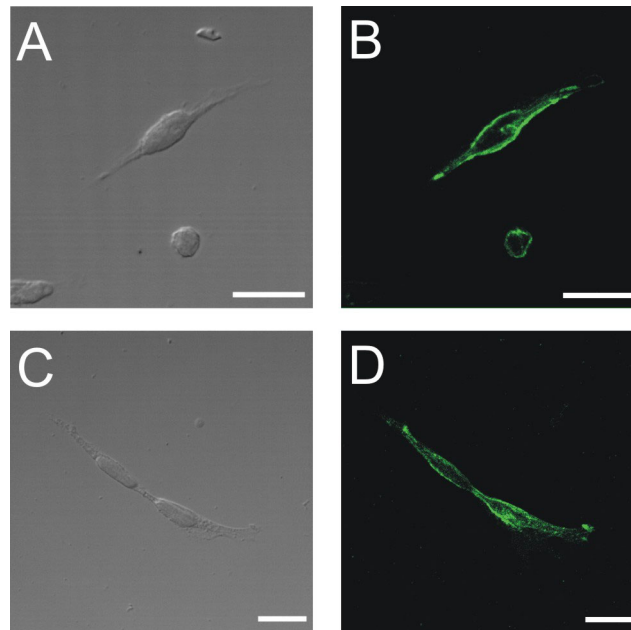


Abb. 3.2: Immunzytochemische Färbungen der Zelllinien Flp-In-293mHCN4 und Flp-In-293mHCN4^{R669Q}. **A.** Durchlichtaufnahme von Zellen des Flp-In-293mHCN4 Klon 3D2. **B.** Fluoreszenzaufnahme der Zelle aus A. **C.** Durchlichtaufnahme von Zellen des Flp-In-293mHCN4^{R669Q} Klon 2A5. **D.** Fluoreszenzaufnahme der Zelle aus C. Objektiv: 63x; Längenmaßstab in A-D: 10 µm; Antikörper: 1. PG2-1A4 unverdünnt, 2. Ziege-anti-Ratte Alexa-488 1:500.

3.1.2 Elektrophysiologische Charakterisierung

Die Eigenschaften der HCN4- und HCN4^{R669Q}-Kanäle wurden in der Ganzzellkonfiguration der „patch clamp“ Technik untersucht. Zwei Fragen standen bei der Charakterisierung im Vordergrund: Wie wirkt sich die Mutation auf die Aktivierungseigenschaften der Kanäle aus? Hat cAMP bei der HCN4^{R669Q}-Mutante noch einen Einfluss auf die Kanalaktivität?

Es wurde ein so genanntes Doppelpulsspannungsprotokoll für die Aktivierung der Kanäle gewählt. Dieses Protokoll erlaubt es, die Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit aus den Stromantworten zu bestimmen. Folgende Überlegungen liegen diesem Ansatz zugrunde: Die Stromantwort I einer Zelle auf einen Spannungssprung ist eine Funktion der Anzahl der Ionenkanäle N , des Einzelkanalstroms i sowie der Offenwahrscheinlichkeit p_o : $I = N i p_o$. Sowohl der Einzelkanalstrom i als auch die Offenwahrscheinlichkeit p_o sind von der angelegten Membranspannung V_m abhängig. Zusätzlich ist p_o noch eine Funktion der Zeit, d.h. die Offenwahrscheinlichkeit ändert sich nach einem Spannungssprung mit einer charakteristischen Zeitkonstante. Diese Zeitabhängigkeit macht man sich bei dem Doppelpulsspannungsprotokoll zunutze. Ausgehend von einer Haltestenspannung von 0 mV

werden hyperpolarisierende Spannungssprünge zu verschiedenen Testspannungen angelegt um die Kanäle bis in einen Gleichgewichtszustand zu aktivieren. Im Gleichgewicht gilt:

$$I = N i(V_{\text{test}}) p_o(V_{\text{test}})$$

Anschließend wird ein Spannungssprung nach -80 mV appliziert. Betrachtet man den Strom unmittelbar nach diesem Spannungssprung, also zu einer Zeit, bei der sich die Offenwahrscheinlichkeit noch nicht geändert hat, so gilt:

$$I = N i_{-80 \text{ mV}} p_o(V_{\text{test}}) = \text{const } p_o(V_{\text{test}})$$

Man bezeichnet diesen Strom als *tail current*. Trägt man die *tail currents* gegen die Testspannung V_{test} auf, so erhält man unmittelbar die Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit multipliziert mit einer Proportionalitätskonstante ($N i_{-80 \text{ mV}}$).

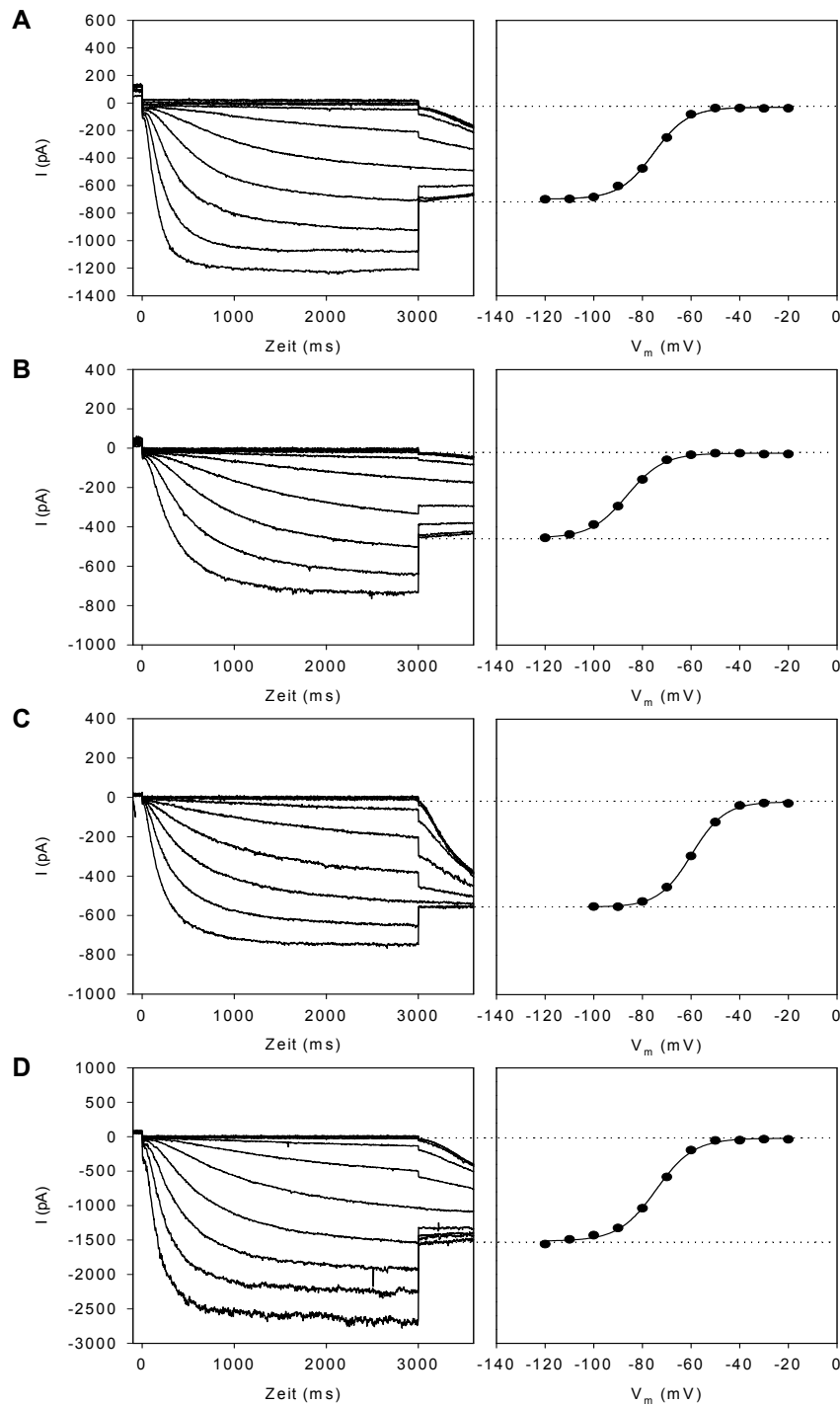


Abb. 3.3: Aktivierung heterolog exprimierter HCN4-Kanäle sowie HCN4^{R669Q}-Kanäle. Ausgehend von einer Haltespannung von 0 mV wurden Spannungen von -20 mV bis -120 mV in 10 mV-Schritten für 3 s an die Zelle angelegt. Anschließend wurde für 0,5 s eine Spannung von -80 mV angelegt. **(A, links)** Stromantwort einer Zelle, die HCN4-Kanäle exprimierte. **(A, rechts)** Die *tail currents* nach dem Spannungssprung zu -80 mV wurden gegen die Testspannung vor dem Spannungssprung aufgetragen. Der Verlauf ist direkt proportional zur Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit der HCN4-Kanäle. Die durchgezogene Linie wurde mit der Boltzmann-Gleichung ($\rightarrow 2.21$) mit folgenden Parametern berechnet: $V_{1/2} = -75,4$ mV; $s = 7,1$; $I_{\min} = -31,1$ pA; $I_{\max} = -698,5$ pA. **(B, links)** Stromantwort einer Zelle, die HCN4^{R669Q}-Kanäle exprimierte. **(B, rechts)** Die *tail currents* nach dem Spannungssprung zu -80 mV wurden gegen die Testspannung vor dem Spannungssprung aufgetragen. Der Verlauf ist direkt proportional zur Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit der HCN4^{R669Q}-Kanäle. $V_{1/2} = -86,4$ mV; $s = 7,5$; $I_{\min} = -24,8$ pA; $I_{\max} = -455,8$ pA. **(C)** Wie (A), jedoch in Gegenwart von 100 μ M cAMP. $V_{1/2} = -59,8$ mV; $s = 6,8$; $I_{\min} = -20,3$ pA; $I_{\max} = -555,0$ pA. **(D)** Wie (B), jedoch in Gegenwart von 100 μ M cAMP. $V_{1/2} = -74,3$ mV; $s = 7,7$; $I_{\min} = -22,1$ pA; $I_{\max} = -1515,6$ pA.

Abbildung 3.3 zeigt die Stromantworten der heterolog exprimierten mHCN4- (Abb. 3.3A) und mHCN4^{R669Q}-Kanäle (Abb. 3.3B) auf das beschriebene Doppelpulsspannungsprotokoll. In den beiden Zelllinien (Flp In-293mHCN4 bzw. mHCN4^{R669Q}) findet man ähnlich große Ströme, die die wesentlichen bekannten Eigenschaften der HCN-Kanäle widerspiegeln: Die Ströme werden durch Hyperpolarisation des Membranpotenzials aktiviert. Die Aktivierung ist vergleichsweise langsam und verläuft sigmoidal. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung ist jeweils in der rechten Teilabbildung dargestellt. Die Abbildungen 3.3C und D zeigen die Aktivierungseigenschaften der Kanäle bei sättigender cAMP-Konzentration in der Pipettenlösung. Ohne zugesetztes cAMP erfolgt die Aktivierung der HCN4-Kanäle tendenziell etwas schneller als die der HCN4^{R669Q}-Kanäle (vergleiche Abb. 3.3A und B). Auch sind die Spannungen, bei denen die verschiedenen Kanäle halbmaximal aktiviert sind, nicht identisch. HCN4-Kanäle sind im Mittel bei $-79.3 (\pm 3,7)$ mV halbmaximal aktiviert, HCN4^{R669Q}-Kanäle bei $-84,5 (\pm 3,4)$ mV (Abb. 3.4). In Gegenwart von cAMP werden die Unterschiede größer. HCN4-Kanäle sind nun schon bei $-55,6 (\pm 2,7)$ mV halbmaximal geöffnet, die mutierten Kanäle sind nahezu unverändert bei $-81,3 (\pm 7,1)$ mV halbmaximal geöffnet (Abb. 3.4).

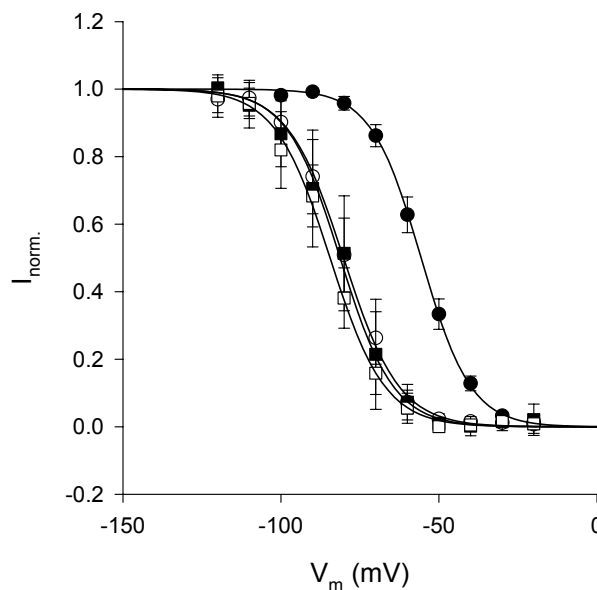


Abb. 3.4: Aktivierungskurven der HCN4- und HCN4^{R669Q}-Kanäle in Anwesenheit und Abwesenheit von cAMP. Dargestellt sind mittlere, normierte *tail-currents* ($\pm$ SD) bei -80 mV für HCN4-Kanäle sowie für HCN4^{R669Q}-Kanäle. Die durchgezogenen Linien wurden mit der Boltzmanngleichung $I_{\text{norm.}} = (1 + \exp((V_m - V_{1/2})/s))^{-1}$ berechnet. ($\circ$) HCN4 ohne cAMP ($V_{1/2} = -79,3 \pm 3,7$; $s = 8,3 \pm 0,7$; $n = 8$). ($\bullet$) HCN4 mit $100 \mu\text{M}$ cAMP ($V_{1/2} = -55,6 \pm 2,7$; $s = 7,9 \pm 1,2$; $n = 3$). ($\square$) HCN4^{R669Q} ohne cAMP ($V_{1/2} = -84,5 \pm 3,4$; $s = 8,7 \pm 2,8$; $n = 7$). ($\blacksquare$) HCN4^{R669Q} mit cAMP ($V_{1/2} = -81,3 \pm 7,1$; $s = 8,4 \pm 0,9$; $n = 5$).

Die HCN4^{R669Q}-Mutante kann also im physiologischen Konzentrationsbereich nicht mehr von cAMP reguliert werden. Unerwartet und viel interessanter sind aber die Unterschiede im cAMP-freien Fall. Wieso ist der HCN4-Kanal schneller und seine Aktivierungskurve im Vergleich zur Mutante nach rechts verschoben? Man könnte spekulieren, dass der HCN4-Kanal eine sehr hohe Affinität für cAMP besitzt und daher schon unter Basalbedingungen in der Zelle signifikant durch cAMP hochreguliert wird. Auf dieses Thema werde ich in der Diskussion noch weiter eingehen.

3.1.3 Fluoreszenzoptische Untersuchung der HCN4-Kanalaktivität

In unserem Institut wurde ein fluoreszenzbasiertes Testverfahren in Mikrotiterplatten entwickelt, das ermöglicht, Änderungen der HCN4-Kanalaktivität in Kulturzellen mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen zu verfolgen (→ 2.22). Gemessen wird dabei das Membranpotenzial von Zellen, die HCN4-Kanäle exprimieren. Zum besseren Verständnis möchte ich kurz erläutern, warum bzw. wie die HCN4-Kanäle in diesen Kulturzellen das Membranpotenzial beeinflussen können.

Im Ruhezustand wird das Membranpotenzial der meisten Zellen durch eine Kaliumleitfähigkeit bestimmt und liegt daher nahe dem Nernstpotenzial für Kalium (-70 bis -100 mV; E_K). Sind gleichzeitig Natriumleitfähigkeiten aktiv, ist das Membranpotenzial positiver. HCN-Kanäle werden durch Hyperpolarisation aktiviert und leiten einen Na^+ -Strom, der die Zelle depolarisiert. Dieser Prozess ist selbst limitierend, da die Kanäle bei Depolarisation schließen. Blockiert man HCN-Kanäle, wird die Natriumleitfähigkeit der Membran verringert, das Membranpotenzial verschiebt sich in Richtung E_K – die Zelle hyperpolarisiert. Eine verstärkte Aktivierung von HCN-Kanälen, z.B. durch Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration, führt dagegen zu einer Zunahme der Natriumleitfähigkeit der Membran – die Zelle depolarisiert. In beiden Fällen stellt sich ein neuer Gleichgewichtszustand ein. Solche HCN-abhängigen Änderungen im Membranpotenzial können bis zu 15 mV betragen.

Mit Hilfe von spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoffen lässt sich das Membranpotenzial von Kulturzellen, die HCN4-Kanäle exprimieren, verfolgen. Hyperpolarisieren die Zellen, nimmt die Fluoreszenzintensität ab, depolarisieren sie, nimmt die Fluoreszenzintensität zu. Die Fluoreszenzänderung beträgt dabei etwa 2,5%/mV. Änderungen der HCN4-Kanalaktivität in den Zellen können so indirekt bestimmt werden.

Mit diesem nicht-invasiven Testverfahren habe ich den Einfluss der intrazellulären cAMP-Konzentration auf die Aktivität von mHCN4- bzw. mHCN4^{R669Q}-Kanäle untersucht. Dazu wurden die Flp-In293mHCN4 und Flp-In293mHCN4^{R669Q} Zelllinien verwendet (im Folgenden vereinfacht als HCN4- bzw. HCN4^{RQ}- Zellen bezeichnet). Die Zellen wurden in die Vertiefungen (*wells*) von Mikrotiterplatten ausgesät und mit einem spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoff beladen ($\rightarrow$ 2.22). Anschließend wurde der Zeitverlauf der Fluoreszenzintensität in den einzelnen *wells* vor und nach Injektion von Isoproterenol bzw. NKH477 aufgenommen. Beide Substanzen führen zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Isoproterenol bindet an endogene β -adrenerge Rezeptoren und führt über einen G-Protein-gekoppelte Signalweg zur Aktivierung von membranständigen Adenylatzyklasten. NKH477, ein Forskolin-Analog, stimuliert direkt die Aktivität membranständiger Adenylatzyklasten.

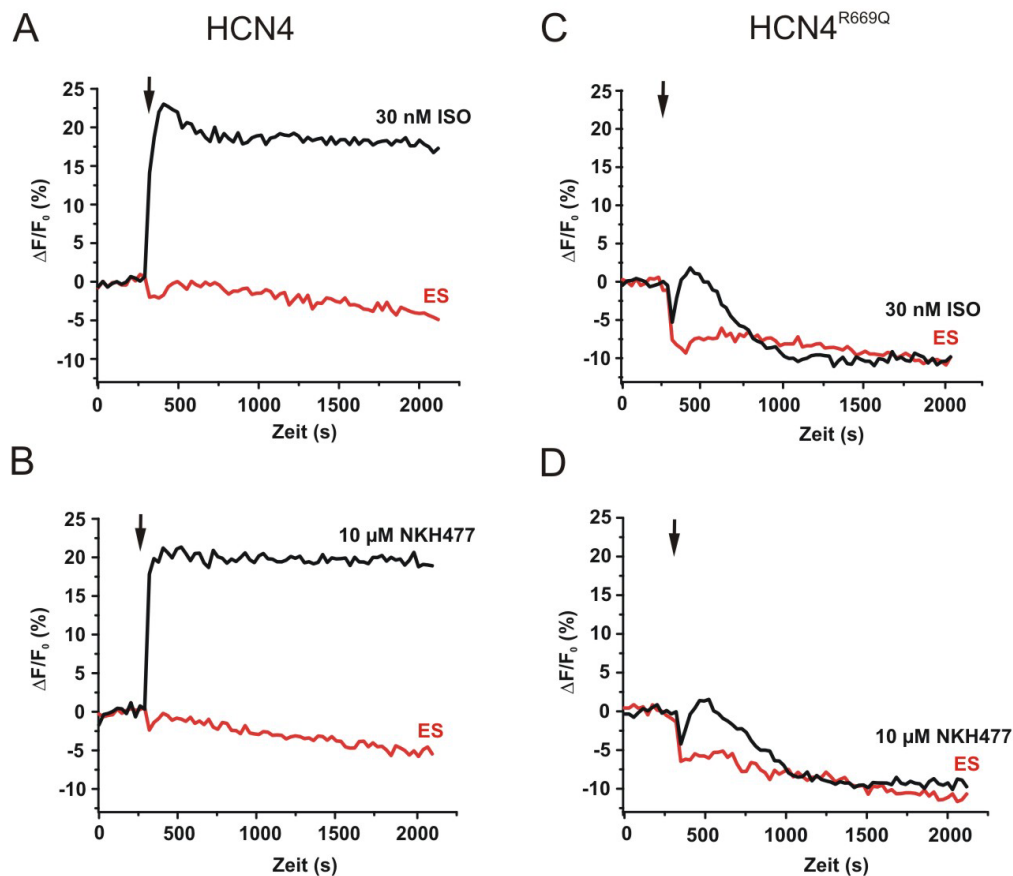


Abb. 3.5: Wirkung von Isoproterenol und NKH477 auf Flp-In 293mHCN4- und mHCN4^{R669Q}-Zellen. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität in Flp-In 293mHCN4- bzw. mHCN4^{R669Q}-Zellen vor und nach der Injektion. Die Pfeile geben den Injektionszeitpunkt an. Die Zellen wurden in 384-well-Platten mit 54 μ l MembraneKit-Lösung (in ES) pro well inkubiert. Im KinetikMode des FlexStationII³⁸⁴-Systems wurde der Zeitverlauf der Fluoreszenzintensität in den wells gemessen. Es wurde jeweils der Mittelwert aus 4 wells berechnet. Dargestellt ist die prozentuale Änderung der Fluoreszenzintensität ($\Delta F/F_0$), bezogen auf die gemittelte Fluoreszenzintensität vor der Injektion. **A.** Flp-In 293mHCN4: Injektion von ES (rot) und Isoproterenol (schwarz, 30 nM Endkonzentration). **B.** Flp-In 293mHCN4^{R669Q}: Injektion von ES (rot) und Isoproterenol (schwarz, 30 nM Endkonzentration). **C.** Flp-In 293mHCN4: Injektion von ES (rot) und NKH477 (schwarz, 10 μ M Endkonzentration). **D.** Flp-In 293mHCN4^{R669Q}: Injektion von ES (rot) und NKH477 (schwarz, 10 μ M Endkonzentration).

Abbildung 3.5A und 3.5B zeigt den Zeitverlauf der Fluoreszenzintensität von HCN4-Zellen vor und nach Injektion von Isoproterenol bzw. NKH477 in die *wells*. In Rot ist jeweils der Fluoreszenzverlauf nach Injektion von einfacher Pufferlösung (ES) dargestellt (Negativkontrolle). Nach der Pufferinjektion nimmt die Fluoreszenzintensität im Verlauf der Messung um wenige Prozent ab. Dies beruht auf Alterungsprozessen der Zellen und des Farbstoffs (Strücker 2005). Die Injektion von Isoproterenol (Abb. 3.5A) bzw. NKH477 (Abb. 3.5B) führt dagegen zu einer anhaltenden Zunahme der Fluoreszenzintensität um etwa 20%. Die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt also zu einer verstärkten Aktivierung von mHCN4-Kanälen in den Zellen. Dadurch stellt sich in den HCN4-Zellen ein etwa 8 mV positiveres Membranpotenzial ein.

Abbildung 3.5C und 3.5D zeigt den Zeitverlauf der Fluoreszenzintensität von HCN4^{RQ}-Zellen vor und nach der Injektion von Isoproterenol und NKH477. In Rot ist wiederum der Fluoreszenzverlauf nach Injektion einfacher Pufferlösung (ES) dargestellt. Hier beobachtet man eine Abnahme der Fluoreszenzintensität von 5-7,5% unmittelbar nach der Injektion. Hierbei handelt es sich um ein typisches Injektionsartefakt, das auftritt, wenn durch die Injektion von Lösung Zellen vom Boden der Wells abgelöst werden. Danach folgt eine weitere, langsame Fluoreszenzabnahme im Laufe der Messdauer, die man auch bei den HCN4-Zellen beobachtet. Nach Injektion von Isoproterenol bzw. NKH477 beobachtet man bei den HCN4^{RQ}-Zellen zunächst ebenfalls die schnelle Fluoreszenzabnahme, die durch die Injektion selber hervorgerufen wird. Danach folgt eine transiente Fluoreszenzzunahme von etwa 5%, die zum Teil von dem Injektionsartefakt überlagert wird. Nach etwa 600 s entspricht die Fluoreszenzänderung nach Injektion von Isoproterenol bzw. NKH477 der Fluoreszenzänderung nach Injektion von Pufferlösung.

Die Fluoreszenzantworten von HCN4^{RQ}-Zellen auf Isoproterenol bzw. NKH477 unterscheiden sich sehr deutlich von den Fluoreszenzantworten der HCN4-Zellen. Im Gegensatz zu den HCN4-Zellen führt eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration bei Zellen, die mHCN4^{R669Q}-Kanäle exprimieren, nicht zu einer anhaltenden Depolarisation des Membranpotenzials. Die Aktivität von mHCN4^{R669Q}-Kanäle wird also nicht von cAMP beeinflusst. Die Ergebnisse dieses nicht-invasiven Testverfahrens unterstreichen die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen.

3.2 Herstellung einer HCN4^{R669Q} *Knock-in* Mauslinie

Ich entwickelte eine gentechnisch veränderte Mauslinie, bei der das Wildtyp HCN4-Gen durch eine Punktmutation verändert wurde, die einen einzelnen Aminosäureaustausch (R669Q) bewirkt. Zunächst musste ich einen Targetingvektor konstruieren, der das modifizierte HCN4-Gen enthält und über homologe Rekombination in den Wildtyp-Genlokus integrieren kann. Der Targetingvektor wurde durch Elektroporation in embryonale Mausstammzellen (ES-Zellen) eingebracht. Aus den Stammzellen, die das HCN4^{R669Q}-Gen homolog in ihr Genom integriert hatten, konnten „transgene“ Mäuse hergestellt werden.

3.2.1 Klonierung des Targetingvektors

Im Rahmen meiner Diplomarbeit (Harzheim, 2003) habe ich den Targetingvektor neoflox8 R/Q kloniert. In dieses Konstrukt habe ich zusätzlich eine Diphterietoxinkassette eingefügt, die eine Negativselektion auf nicht-homologe Integrationsereignisse ermöglicht. Das Diphterietoxin A-Gen wird exprimiert, wenn das Konstrukt nicht-homolog in das Genom integriert ist. Diese Zellen werden vergiftet und sterben.

Das Plasmid pGEMTeasyDTA2, das die Diphterietoxinkassette enthält, wurde mir freundlicherweise von Dr. Thorsten Buch (Institut für Genetik, Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt. Mit den Primern #3554/3555 (→ 6.3) wurde der die Diphterietoxin-kodierende Sequenzabschnitt amplifiziert. Die überhängenden Enden wurden geglättet, phosphoryliert (→ 2.7.3), und das Fragment wurde in einen EcoRV-geschnittenen pBluescriptSK⁻-Vektor kloniert. Aus diesem Vektor wurde die Diphterietoxinkassette mit AatII ausgeschnitten und in den AatII geschnittenen und dephosphorylierten Targetingvektor neoflox-8 R/Q kloniert. Die Diphterietoxinkassette hatte dieselbe Orientierung wie der HCN4-Homologiebereich. Der resultierende Targetingvektor wurde als neofloxmHCN4^{R669Q}DT bezeichnet. Die folgende Abbildung verdeutlicht den Aufbau des Targetingvektors.

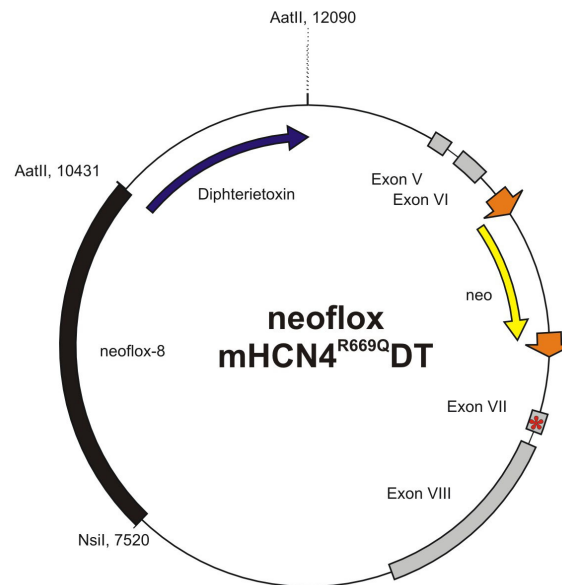


Abb. 3.6: Targetingvektor neofloxmHCN4^{R669Q}DT. Restriktionsschnittstellen und deren Position sind eingezeichnet. Die Neomycinresistenzkassette ist durch einen gelben Pfeil, die Diphterietoxinkassette durch einen blauen Pfeil dargestellt. Die Pfeilspitze gibt die Orientierung der Kassetten an. Der Vektoranteil ist durch einen schwarzen Balken, die Exone des HCN4-Gens durch graue Boxen gekennzeichnet. Die loxP-Elemente sind als rote Pfeile dargestellt. Die Pfeilspitze gibt die Orientierung der loxP-Elemente an. Die Mutation R669Q ist mit (*) gekennzeichnet.

3.2.2 Embryonale Stammzellkultur

Der Targetingvektor neofloxmHCN4^{R669Q}DT wurde mit NsiI linearisiert und in V6.5 ES-Zellen elektroporiert (→ 2.17.4.2). Nach G418-Selektion wurden insgesamt 852 resistente Klone isoliert. Von den Zellklonen wurde die genomische DNA isoliert, mit EcoRI verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet (→ 2.8). Für die Hybridisierung des Southern Blots wurde eine 5'-Sonde mit den Primern #3364/3365 und eine 3'-Sonde mit den Primern #3366/3367 (→ 6.3) amplifiziert. Nach der Hybridisierung mit der 3'-Sonde zeigten 10 Klone die erwarteten Fragmentgrößen. Bei vier Klonen (9D10, 10F2, 10H3, 13C4) konnte die homologe Rekombination auch durch Hybridisierung mit der 5'-Sonde bestätigt werden. Abbildung 3.7 verdeutlicht die Integration des Targetingvektors in den Wildtyp-Lokus. Der rekombinante HCN4-Lokus wird als HCN4^{neoR669Q} bezeichnet. Er besitzt als einzige Veränderung gegenüber dem Wildtyp-Lokus die Mutation, die zum Aminosäureaustausch R669Q führt, in Exon VII und die Neomycinresistenzkassette in Intron VI.

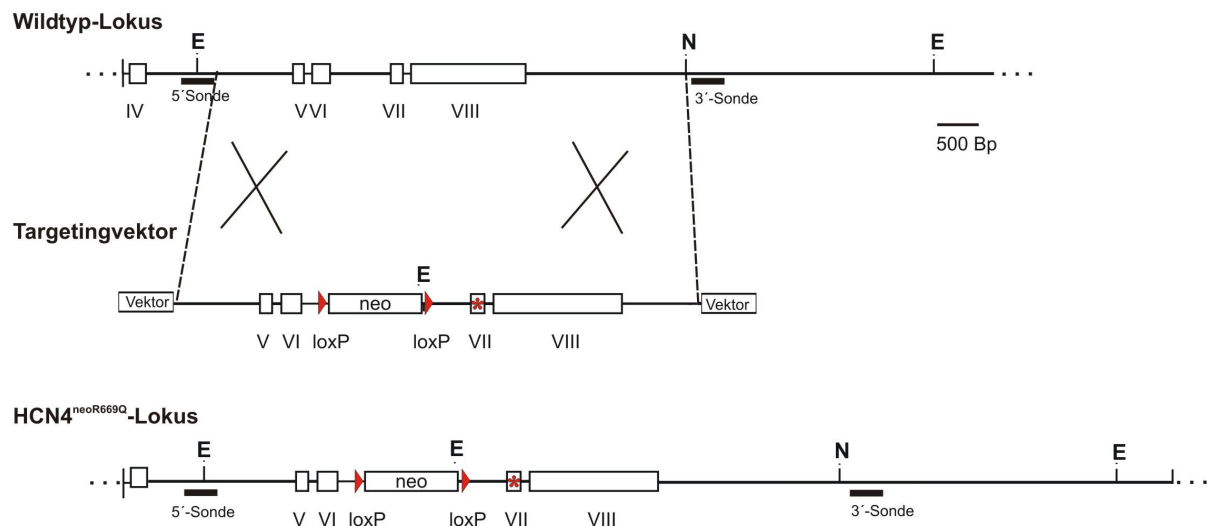


Abb. 3.7: Targetingstrategie HCN4^{R669Q} Knock-in. Der Wildtyp-Lokus, der Targetingvektor und der rekombinante Locus sind linear dargestellt. Der Vektoranteil in der Darstellung des Targetingvektors sowie die Neomycinresistenzkassette sind mit Boxen angedeutet. Die Exone sind durch römische Ziffern und weiße Boxen, wichtige Schnittstellen durch ihren Anfangsbuchstaben gekennzeichnet (E: EcoRI, N: NsiI). Die loxP-Elemente und ihre Orientierung sind durch rote Pfeilspitzen gekennzeichnet. Kreuze zeigen die Bereiche, wo die Rekombination erfolgt. Die zur Hybridisierung des Southern Blots verwendeten Sonden sind durch schwarze Balken unterhalb des Hybridisierungsbereichs gekennzeichnet. Die Mutation R669Q ist mit (*) gekennzeichnet.

Abbildung 3.8 zeigt die Ergebnisse der Southern Blot Hybridisierung. Zur Vereinfachung sind nur zwei der insgesamt 4 positiven Klone gezeigt.

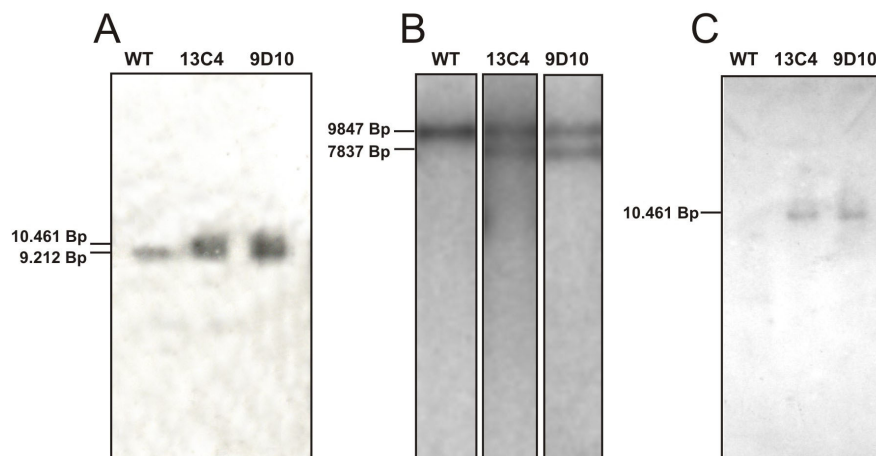


Abb. 3.8: Southern Blot Analyse der positiven ES-Zellklone. Die Größe der Fragmente ist links neben den Teilabbildungen angegeben. WT: Wildtyp ES-Zellklon; 13C4, 9D10: homolog rekombinante ES-Zellklone. Jeweils 10 µg genomische DNA wurden für die Restriktion eingesetzt. **A.** Restriktion mit NsiI, Hybridisierung mit der 5'-Sonde. **B.** Restriktion mit EcoRI, Hybridisierung mit der 3'-Sonde. **C.** Restriktion mit NsiI, Hybridisierung mit der neo-Sonde.

Genomische Wildtyp-DNA der Maus, die mit NsiI geschnitten ist, liefert bei der Hybridisierung mit der 5'-Sonde ein 9.212 Bp großes Fragment (→ Abb. 3.8 A). Für ES-Zellklone, die den Targetingvektor homolog integriert haben, entsteht zusätzlich ein

10.461 Bp großes Fragment. Beide Fragmente sind in der DNA der Klone 13C4 und 9D10 zu erkennen. Genomische Wildtyp-DNA, die mit EcoRI geschnitten ist, liefert bei der Hybridisierung mit der 3'-Sonde ein 9.847 Bp großes Fragment (→ Abb. 3.8 B). Bei homolog rekombinanten ES-Zellklonen entsteht ein zusätzliches Fragment von 7837 Bp. Beide Fragmente sind in der DNA der Klone 13C4 und 9D10 zu erkennen. Um zu kontrollieren, ob der Targetingvektor noch an anderen Stellen im Genom der ES-Zellklone integriert ist, wurde eine Hybridisierung NsiI-geschnittener genomischer DNA mit einer spezifischen neo-Sonde (PCR mit den Primer #3775/3776, → 6.3) durchgeführt. Die neo-Sonde kann nicht mit Wildtyp-DNA hybridisieren, da das Neomycinresistenzgen endogen nicht enthalten ist. Bei homolog rekombinanten ES-Zellklonen erwartet man ein Fragment von 10.461 Bp. Da in Abbildung 3.8C keine zusätzlichen Fragmente zu erkennen sind, ist der Targetingvektor nur homolog integriert.

3.2.3 Blastozysteninjektion und Verpaarung mit Cre-Deleter Mäusen

Die ES-Zellklone 13C4 und 9D10 wurden in Blastozysten (C57Bl/6) injiziert und in scheinchwangere Weibchen reimplantiert (→ 2.17.5). Die daraus resultierenden Nachkommen besaßen einen chimären Anteil von 50 bis 100%. Die Chimären wurden mit C57Bl/6 Mäusen rückgekreuzt und mittels PCR und Southern Blot genotypisiert (→ 2.8, 2.9.2). Heterozygote Mäuse, die den rekombinanten Locus mit der Neomycinresistenzkassette enthalten, wurden mit $\text{HCN4}^{+/\text{neoR669Q}}$ bezeichnet (+: Wildtyp HCN4-Allel). Diese heterozygoten Mäuse wurden mit C57Bl/6 Cre-Deletermäusen zur Deletion der Neomycinresistenzkassette verpaart. Die Cre-Rekombinase bindet an die loxP-Elemente und schneidet den dazwischen liegenden DNA-Abschnitt heraus. Der rekombinante Genlocus enthält dann nur noch die Mutation R669Q in Exon VII und ein loxP-Element in Intron VI (→ Abb. 3.10). Die Genotypisierung der Nachkommen erfolgte durch Southern Blot und PCR (→ Abb. 3.9). Die heterozygoten Nachkommen wurden mit $\text{HCN4}^{+/\text{R669Q}}$ bezeichnet.

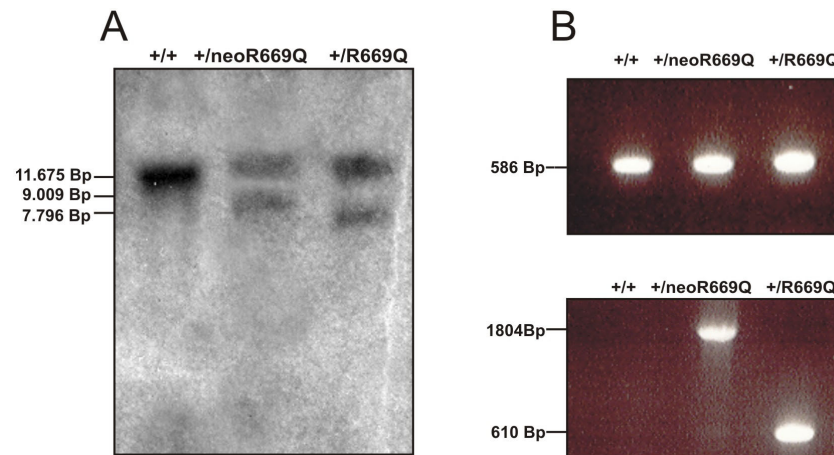


Abb. 3.9: Genotypisierung mittels Southern Blot und PCR. Die Größe der Fragmente ist links neben den Teilabbildungen angegeben. +/+ : HCN4^{+/+}, +/neoR669Q: HCN4^{+/neoR669Q}, +/R669Q: HCN4^{+/R669Q}. **A.** Southern Blot Analyse. Die genomische DNA wurde mit XbaI geschnitten und mit der 3'-Sonde hybridisiert. **B.** PCR. Die obere Abbildung zeigt das Ergebnis für die PCR mit den Primern #3752/3754, die untere Abbildung das Ergebnis für das Primerpaar #3944/3945.

Abbildung 3.9A zeigt, dass genomische Wildtyp-DNA, die mit XbaI geschnitten ist, bei Hybridisierung mit der 5'-Sonde ein 11.675 Bp großes Fragment liefert. Bei HCN4^{+/neoR669Q} Mäusen entsteht eine zusätzliche Bande für das rekombinante Allel von 9.009 Bp. Nach Verpaarung mit den Cre-Deletermäusen ist das rekombinante Allel um die Neomycinresistenzkassette verkürzt und nur noch 7.796 Bp groß. Abbildung 3.9B zeigt die PCR-Analyse der verschiedenen Genotypen: In der PCR, die nur das Wildtypallel amplifiziert (#3752/3754), entsteht für alle drei Genotypen (HCN4^{+/+}, HCN4^{+/neoR669Q}, HCN4^{+/R669Q}) ein Produkt von 586 Bp (obere Abbildung 3.9B). Bei der PCR, mit der das rekombinante Allel amplifiziert wird (#3944/3945), entsteht bei HCN4^{+/+} Tieren kein Produkt, da sie das rekombinante Allel nicht enthalten. Bei HCN4^{+/neoR669Q} Mäusen entsteht ein 1804 Bp großes Produkt. Nach Deletion der Neomycinresistenzkassette ist das Fragment 610 Bp groß (HCN4^{+/R669Q}). Die Hybridisierungsbereiche der Primer sowie die XbaI-Schnittstellen sind in Abbildung 3.10 schematisch dargestellt.

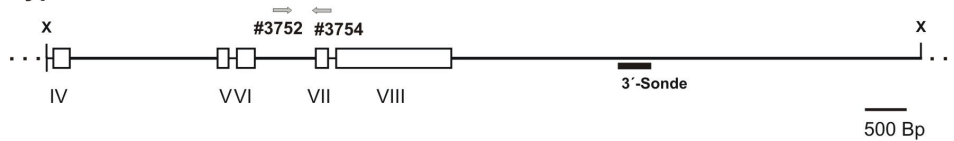
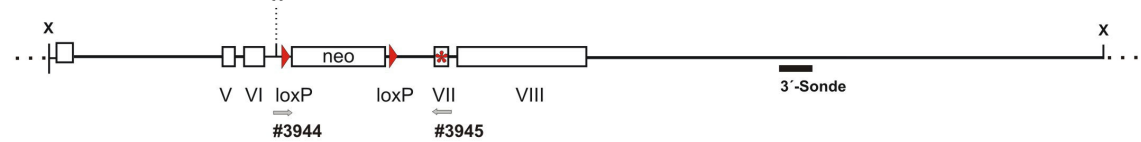
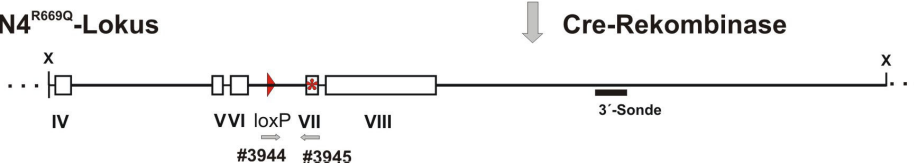
Wildtyp-Lokus**HCN4^{neoR669Q}-Lokus****HCN4^{R669Q}-Lokus**

Abb. 3.10: Schnittstellen und Primerhybridisierungsbereiche im HCN4^{+/+}, HCN4^{+/neoR669Q} und HCN4^{+/R669Q}-Lokus. Die jeweiligen Loci sind linear dargestellt. Die Neomycinresistenzkassette und die Exone sind mit weißen Boxen gekennzeichnet, die Exone sind mit römischen Ziffern beschriftet. XbaI-Schnittstellen sind durch X gekennzeichnet. Die loxP-Elemente und ihre Orientierung sind durch rote Pfeilspitzen markiert. Der Hybridisierungsbereich der 3'-Sonde ist durch einen schwarzen Balken, die Hybridisierungsbereiche der Primer sowie deren Orientierung sind durch graue Pfeile gekennzeichnet.

3.3 Analyse der HCN4^{R669Q} *Knock-in* Mauslinie

3.3.1 Homozygote Embryonen sterben *in utero*

Aus heterozygoten Verpaarungen wurden nur Wildtyptiere (HCN4^{+/+}) und heterozygote Tiere (HCN4^{+/R669Q}), jedoch keine homozygoten Tiere (HCN4^{R669Q/R669Q}) geboren. Das Verhältnis zwischen Wildtyptieren und heterozygoten Tieren war ein Drittel (57/155) zu zwei Drittel (98/155). Dies deutet darauf hin, dass homozygote Tiere nicht lebensfähig sind und während der Embryonalentwicklung sterben. Die heterozygoten Tiere unterscheiden sich in ihrer Vitalität und Lebenserwartung nicht von den Wildtyptieren.

Die Embryonalentwicklung der Maus dauert 19 Tage. Die einzelnen Entwicklungsstadien bzw. -tage werden mit E0,5-E18 bezeichnet. Um den pränatalen Todeszeitpunkt der homozygoten Embryonen zu bestimmen, wurden Weibchen zu definierten Zeitpunkten die Embryonen entnommen. Die Embryonen wurden auf Vitalität und morphologische Auffälligkeiten untersucht.

Tab.3.1: Bestimmung des embryonalen Todeszeitpunktes von $\text{HCN4}^{\text{R669Q/R669Q}}$ Mäusen. Angegeben ist die Anzahl der untersuchten Embryonen.

Embryonaler Tag	Embryonen gesamt	$\text{HCN4}^{+/+}$	$\text{HCN4}^{+/R669Q}$	$\text{HCN4}^{\text{R669Q/R669Q}}$
9,5	100	27	55	18
10,5	60	21	27	12
11	52	12	28	12
12,5	26	5	14	7 (tot)

An den embryonalen Tagen E9,5 bis 11 waren die homozygoten Embryonen von ihren Geschwistern nicht zu unterscheiden. Homozygote Embryonen, die an E12,5 isoliert wurden, waren tot und durch ihre geringere Größe und blasse Farbe deutlich von den anderen Genotypen zu unterscheiden (→ Abb. 3.11).



Abb. 3.11: Aufnahme eines Wildtypembryos (links) und eines homozygoten Embryos (rechts) an Tag E12.5.

Die Genotypisierung der Embryonen erfolgte mit den Primerpaaren #3752/3754 und #3944/3945 (→ 2.9.2). Während das Primerpaar #3752/3754 ausschließlich das Wildtypallel amplifiziert (586 Bp), erhält man mit den Primern #3944/3945 nur dann ein PCR-Produkt, wenn das $\text{HCN4}^{\text{R669Q}}$ -Allel vorliegt (610 Bp). Im Falle von heterozygoten Embryonen sollten beide Primerpaare ein PCR-Produkt liefern. Da die Amplifikationsprodukte beider PCR-Reaktionen nahezu die gleiche Größe haben, werden sie auf zwei Gelen aufgetragen und analysiert. Die folgende Abbildung zeigt exemplarisch das PCR-Ergebnis für die entnommenen Embryonen einer schwangeren Maus.

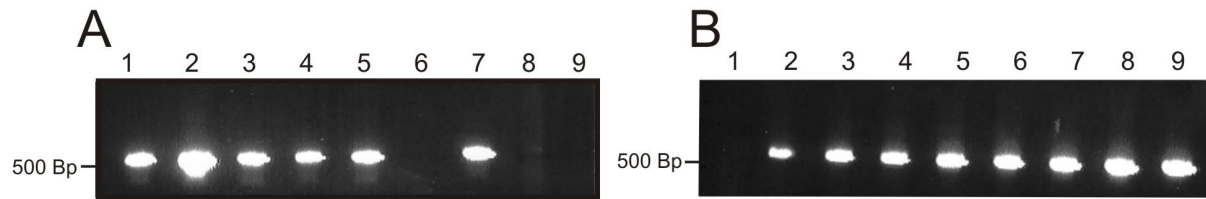


Abb. 3.12: Genotypisierung der Embryonen mittels PCR. Mit 1-9 sind die Embryonen des Wurfes bezeichnet. Die Laufposition des 500 Bp Fragmentes des „1 kb DNA Ladder“ Größenstandards ist links neben der jeweiligen Teilabbildung eingezeichnet. **A.** PCR mit den Primern #3752/3754 (Wildtypallel). **B.** PCR mit den Primern #3944/3945 (rekombinantes Allel).

Abbildung 3.12A zeigt das Ergebnis der PCR mit den Primern #3752/3754 und Abbildung 3.12B das Ergebnis mit den Primern #3944/3945. Embryo 1 ist ein Wildtyp, die Embryonen 6, 8 und 9 sind homozygot für das $\text{HCN4}^{\text{R669Q}}$ -Allel. Alle anderen Embryonen sind heterozygot.

3.3.2 Untersuchung der HCN4-Expression während der Embryonalentwicklung

Das Expressionsmuster der HCN4-mRNA während der Embryonalentwicklung der Maus ist bereits beschrieben worden (Garcia-Frigola et al., 2003; Stieber et al., 2004). HCN4-mRNA ist ab Tag E7,5 im Bereich des sich entwickelnden Herzens nachweisbar. Ab Tag E8 ist eine spezifische Expression im Bereich des Sinus venosus zu beobachten. Außerhalb des Herzens kann ab Tag E10 auch eine schwache Expression im zentralen Nervensystem nachgewiesen werden. Um zu kontrollieren, ob die Mutation R669Q im HCN4-Kanal eine Auswirkung auf die Expression der mRNA bzw. des Proteins hat, wurde sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene die HCN4-Expression am Tag E9,5 untersucht.

3.3.2.1 Analyse der HCN4-mRNA Expression im Herzen mittels RT-PCR

Die Expression der HCN4-mRNA im Herzen wurde am Tag E9,5 für die einzelnen Genotypen ($\text{HCN4}^{+/+}$, $\text{HCN4}^{+/R669Q}$, $\text{HCN4}^{\text{R669Q/R669Q}}$) untersucht. Es wurde Gesamt-RNA aus embryonalen Herzen isoliert und in cDNA umgeschrieben ($\rightarrow$ 2.6, 2.9.5). Mit Hilfe von HCN4-spezifischen Primern wurde eine RT-PCR durchgeführt ($\rightarrow$ 2.9.2). Als Kontrolle diente cDNA aus Herz, Gehirn und Leber adulter Mäuse.

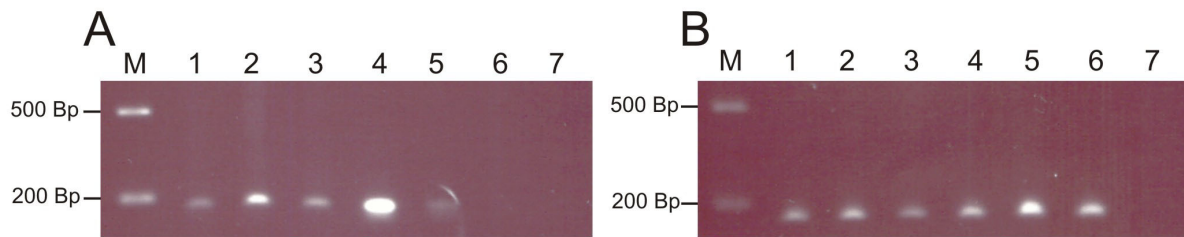


Abb. 3.13: Nachweis der HCN4-mRNA durch RT-PCR. Die Laufposition des 200 und 500 Bp Fragmentes des „1 kb DNA Ladder“ Größenstandards (M) ist links neben der jeweiligen Teilabbildung eingezeichnet. 1. HCN4^{+/+}, 2. HCN4^{+/R669Q}, 3. HCN4^{R669Q/R669Q}, 4. Herz adult (Positivkontrolle), 5. Gehirn adult (Positivkontrolle), 6. Leber adult (Negativkontrolle), 7. H₂O. **A.** HCN4-spezifisches Amplifikationsprodukt (#4247/4248). **B.** Aktin-spezifisches Amplifikationsprodukt (#4249/4250).

Die HCN4-RNA konnte in allen drei Genotypen (HCN4^{+/+}, HCN4^{+/R669Q}, HCN4^{R669Q/R669Q}, siehe Spur 1-3, Abb. 3.13A) nachgewiesen werden. In den heterozygoten Embryonen scheint das Expressionsniveau des HCN4-Transkripts höher zu sein als im Wildtyp und den homozygoten Embryonen. Das Aktin-Expressionsniveau unterscheidet sich hingegen nicht (Abb. 3.13B).

3.3.2.2 Analyse der HCN4 Protein-Expression im Herzen

Die Untersuchung der HCN4-Expression auf Transkriptebene lässt nur bedingt Rückschlüsse auf die Proteinsynthese und -verteilung zu. Deshalb wurde die Expression von HCN4 auch auf Proteinebene untersucht. Es wurden Gefrierschnitte von HCN4^{+/+}, HCN4^{+/R669Q} und HCN4^{R669Q/R669Q} Embryonen von Tag E9,5 bis Tag E11,5 der Embryonalentwicklung angefertigt und mit HCN4-spezifischen Antikörpern gefärbt (→ 2.19). Ab Tag E9,5 wurde eine spezifische Färbung im Bereich des Herzens gefunden. Die nachfolgend gezeigten Färbungen stammen von Embryonen am Tag E9,5.

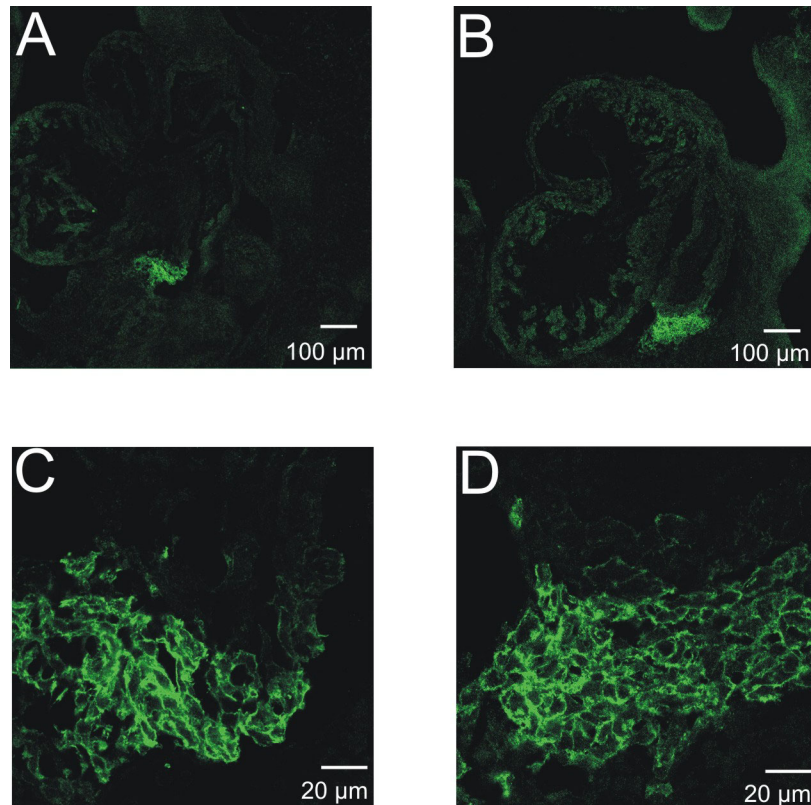


Abb. 3.14: Immunhistochemischer Nachweis von HCN4 im Herzen (E9,5). In Abbildung A und C sind die Färbungen für den Wildtyp (HCN4^{+/+}), in Abbildung B und D sind die Färbungen für die homozygoten Embryonen (HCN4^{R669Q/R669Q}) gezeigt (Sagittalschnitte, 16 µm). Abbildung A und B zeigen Aufnahmen mit 20x Vergrößerung, Abbildung C und D mit 63x Vergrößerung. Antikörper: 1. PPc73K 1:400, 2. Ziege-anti-Kaninchen Alexa-488 1:500.

Sowohl bei Wildtypembryonen (→Abb. 3.14A) als auch bei homozygoten Embryonen (→Abb. 3.14B) beobachtet man eine spezifische Färbung im Bereich des Herzens. Die Färbung befindet sich im Bereich des Sinus venosus, der sich später zum Sinusknoten entwickelt. Zwischen den beiden Genotypen ist kein Unterschied in der Verteilung und Expressionsstärke des HCN4-Proteins zu erkennen. In der höheren Auflösung (Abb. 3.14 C, D) erkennt man, dass auch die subzelluläre Verteilung keine Unterschiede aufweist. Die Färbungen an heterozygoten Embryonen entsprechen denen der anderen Genotypen und sind hier nicht gezeigt. Darüber hinaus wurden auch keine morphologischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen an den Tagen E9,5 bis E11 beobachtet.

Die HCN4-Proteinexpression wurde ebenfalls im Western Blot untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.15 dargestellt.

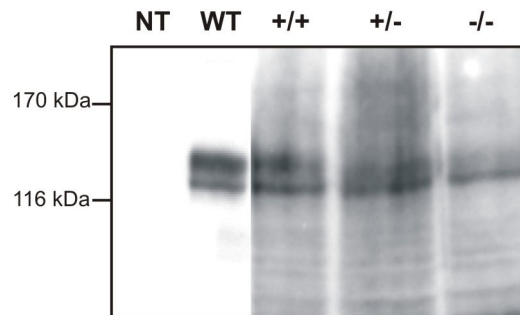


Abb. 3.15: Western-Blot-Analyse des HCN4-Proteins. Der Größenstandard ist links neben den Teilabbildungen (kDa) angegeben. NT: Membranproteine aus nicht-transfizierten Zellen (6,5 µg), WT: Membranproteine aus Flp-In-293 mHCN4-Zellen, Klon 3D2 (6,5 µg), +/+ : Gesamtproteine aus HCN4^{+/+} embryonalen Herzen (100 µg), +/-: Gesamtproteine aus HCN4^{+/-} embryonalen Herzen (100 µg), -/-: Gesamtproteine aus HCN4^{-/-} embryonalen Herzen (100 µg). Die Proteine befinden sich alle auf derselben PVDF-Membran, jedoch wurde die Abbildung aus zwei Filmen mit unterschiedlicher Expositionsdauer zusammengesetzt (Expositionsdauer: NT, WT: 10 s; +/+, +/-, -/-: 5 min). Antikörper: 1. PG2-7H9 1:2, 2. Ziege-anti-Ratte, HRP-gekoppelt 1:5000.

Für die Western-Blot-Analyse des HCN4-Kanalproteins in embryonalen Herzen wurden für jeden Genotyp die Gesamtproteine aus je 10 Herzen präpariert (→ 2.12.2), in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen (→ 2.15). Als Negativkontrolle wurden Membranproteine nicht-transfizierter Zellen, als Positivkontrolle Membranproteine aus Flp-In 293 mHCN4-Zellen aufgetragen. In der Negativkontrolle erkennt der Antikörper keine Proteinbande. In den Spuren, in denen Proteine aus embryonalen Herzen aufgetragen sind, erkennt der Antikörper zwei Banden (~150 und 130 kDa). Beide Banden liegen auf der gleichen Höhe wie die Banden, die der Antikörper in der Positivkontrolle erkennt. Die untere Bande entspricht dem errechneten Molekulargewicht des Proteins (132 kDa), das vom längsten offenen Leserahmen der mHCN4-cDNA kodiert wird. Bei der oberen Bande handelt es sich, wie in Abb. 3.1 gezeigt, um eine glykosylierte Form des HCN4-Kanalproteins. Die Intensität der Bande, die dem errechneten Molekulargewicht entspricht, ist für die einzelnen Genotypen vergleichbar. Der HCN4-Kanal wird somit in allen drei Genotypen in vergleichbaren Mengen exprimiert.

3.4 Funktionelle Untersuchungen der embryonalen Herzfunktion

Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigen, dass das HCN4-Protein ab Tag E9,5 der Embryonalentwicklung im Herzen exprimiert wird. Es konnten keine Unterschiede zwischen Wildtypembryonen (HCN4^{+/+}) und homozygoten Embryonen (HCN4^{R669Q/R669Q}) in der Proteinexpression und der subzellulären Verteilung des HCN4-Proteins nachgewiesen

werden. Ebenso unterscheiden sich die Embryonen morphologisch nicht. Nun sollen funktionelle Untersuchungen der embryonalen Herzfunktion durchgeführt werden, um die mögliche Ursache für den Tod der homozygoten Embryonen in der Embryonalentwicklung zu finden.

3.4.1 Isolierte heterozygote und homozygote embryonale Herzen schlagen langsamer

Um die basale Herzschlagfrequenz zu untersuchen, wurden embryonale Herzen zu unterschiedlichen Embryontagen (E9,5-11) isoliert und für 24 h kultiviert (→ 2.20). Die Herzschlagfrequenz wurde in dem in 2.20.2 beschriebenen Versuchsaufbau untersucht. Die Herzen aller drei Genotypen schlagen gleichmäßig ohne erkennbare Arrhythmien.

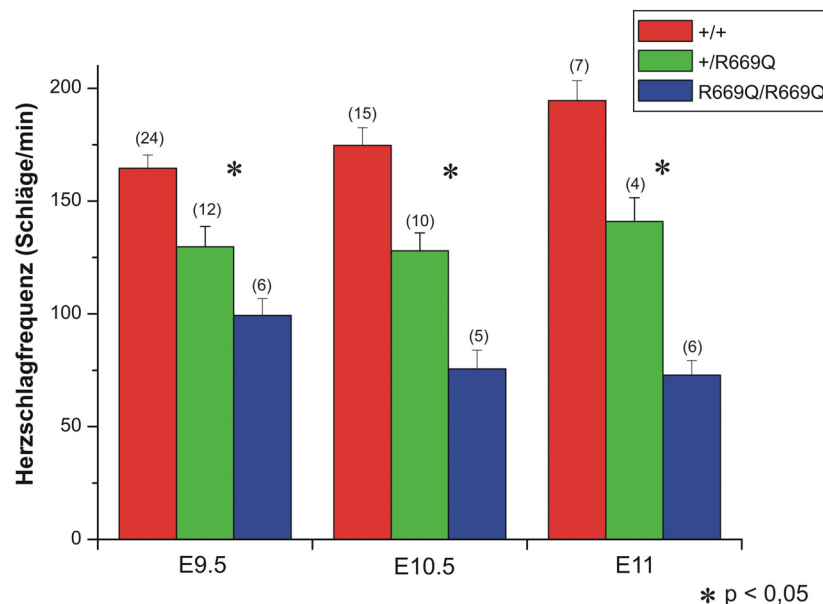


Abb. 3.16: Basale Herzschlagfrequenz isolierter embryonaler Herzen. Aufgetragen ist die Herzschlagfrequenz an Tag E9,5, E10,5 und E11 der Embryonalentwicklung. +/+ : $HCN4^{+/+}$, +/R669Q: $HCN4^{+/R669Q}$, R669Q/R669Q: $HCN4^{R669Q/R669Q}$. Anzahl der untersuchten Herzen (n) in Klammern. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler (SEM), * $p < 0,05$.

In der Abbildung 3.16 ist die mittlere basale Herzschlagfrequenz an den Tagen E9,5 bis E11 für die drei Genotypen $HCN4^{+/+}$, $HCN4^{+/R669Q}$ und $HCN4^{R669Q/R669Q}$ aufgetragen. Die Herzen der heterozygoten ($HCN4^{+/R669Q}$) und der homozygoten ($HCN4^{R669Q/R669Q}$) Embryonen schlagen an allen drei Entwicklungstagen signifikant langsamer als die der Wildtypembryonen ($HCN4^{+/+}$). Die Herzschlagfrequenz der $HCN4^{+/+}$ -Embryonen nimmt in der Embryonalentwicklung von $164,5 \pm 5,9$ (E9,5) und $174,6 \pm 7,8$ (E10,5) auf $194,5 \pm 8,7$ Schläge/min (E11) zu. Die Herzschlagfrequenz der $HCN4^{+/R669Q}$ -Embryonen steigt hingegen kaum an. Sie liegt bei $129,7 \pm 9,0$ (E9,5), $127,9 \pm 7,9$ (E10,5) und $141 \pm 10,5$ Schlägen/min

(E11). Interessanterweise schlagen die Herzen der HCN4^{R669Q/R669Q}-Embryonen immer deutlich langsamer als die der beiden anderen Genotypen. Die Herzschlagfrequenz der homozygoten Embryonen nimmt von $99,3 \pm 7,3$ (E9,5) und $75,6 \pm 8,2$ (E10,5) auf $72,2 \pm 20,4$ Schlägen/min (E11) ab. Die Herzen der homozygoten Embryonen schlagen damit am Tag 9,5 um 40%, am Tag 10,5 um 57% und am Tag 11 sogar um 63% langsamer als die der Wildtypembryonen.

3.4.2 Die Herzfrequenz der homozygoten Embryonen steigt bei β -adrenerger Stimulation nicht an

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss der Mutation auf die Herzschlagfrequenz bei β -adrenerger Stimulation zu untersuchen. Bei einer Aktivierung von β -adrenergen Rezeptoren wird über eine G-Protein-gekoppelte Signalkaskade die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht. Die Frage war, ob in homozygoten Embryonen (HCN4^{R669Q/R669Q}) die Herzfrequenz noch gesteigert werden kann, d.h. ob die Herzfrequenz bei β -adrenerger Stimulation durch direkte Bindung von cAMP an HCN4 erhöht wird. Um die Frage beantworten zu können, wurden die embryonalen Herzen in dem in 2.19.2 beschriebenen Versuchsaufbau mit Isoproterenol, einem Agonisten für β -adrenerge Rezeptoren, superfundiert.

Abbildung 3.17 zeigt exemplarisch die Wirkung von Isoproterenol auf embryonale Wildtypherzen unterschiedlicher Entwicklungstage. Die gemessenen Herzschlagfrequenzen (R = Schläge/min) wurden auf die jeweilige Basalfrequenz (R_0) normiert.

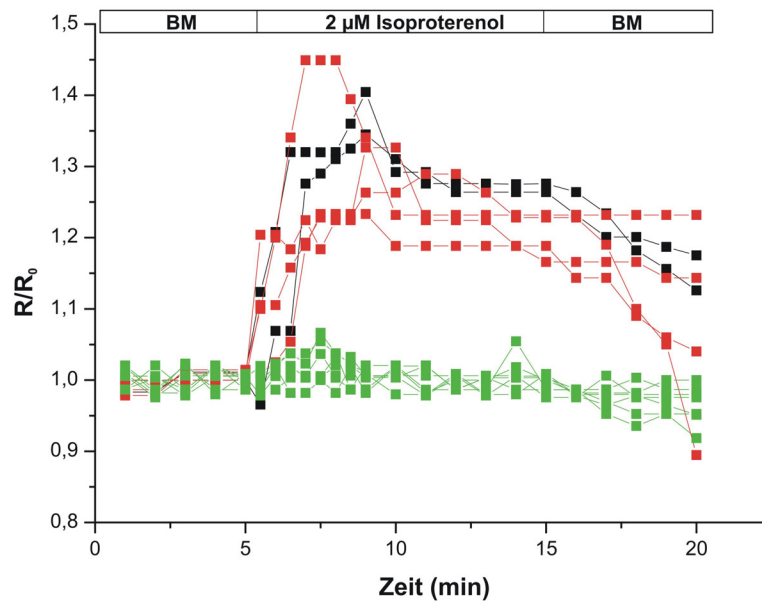


Abb. 3.17: Änderung der Schlagfrequenz embryonaler Wildtypherzen bei Stimulation mit Isoproterenol. Aufgetragen ist die auf die Basalfrequenz (R_0) normierte Herzschlagfrequenz (R/R_0) an den Tagen 9,5- bis 11 der Embryonalentwicklung. Der Wechsel der Badlösung ist im Balken oberhalb des Diagramms angegeben (BM, Basalmedium). Anzahl der Herzen (n): E9,5 (■) n=7, E10,5 (■) n=2, E11 (■) n=4. Angegeben sind Mittelwerte.

Die isolierten Herzen wurden 5 min mit Basalmedium superfundiert ($\rightarrow$ 2.20) und die basale Herzschlagfrequenz bestimmt. Danach wurde auf Basalmedium + 2 μ M Isoproterenol gewechselt und die Änderung der Herzschlagfrequenz über 10 min bestimmt. Abschließend wurden die Herzen wieder für 5 min mit Basalmedium superfundiert. Bei E9,5-Wildtypherzen beobachtet man keine Wirkung von Isoproterenol während der 10-minütigen Stimulationszeit ($\rightarrow$ Abb. 3.17, grün). Vermutlich ist zu diesem Entwicklungszeitpunkt der β -Rezeptor vermittelte Signalweg noch nicht funktionell. Demgegenüber steigt die Herzschlagfrequenz bei E10,5- (schwarz) sowie bei E11-Wildtypherzen (rot) während der Stimulation um 22% bis maximal 45% an. Die Herzen beider Entwicklungsstadien zeigen nur transiente, durch Isoproterenol vermittelte, Signale, d.h. die maximale Herzfrequenz wird während langandauernder Stimulation nur kurz erreicht. Da die Zunahme der Herzschlagfrequenz zwischen Tag 10,5 und 11 ähnlich ist, wurden für den Vergleich der verschiedenen Genotypen die Daten der verschiedenen Entwicklungsstadien statistisch zusammengefasst. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.18 zusammengefasst.

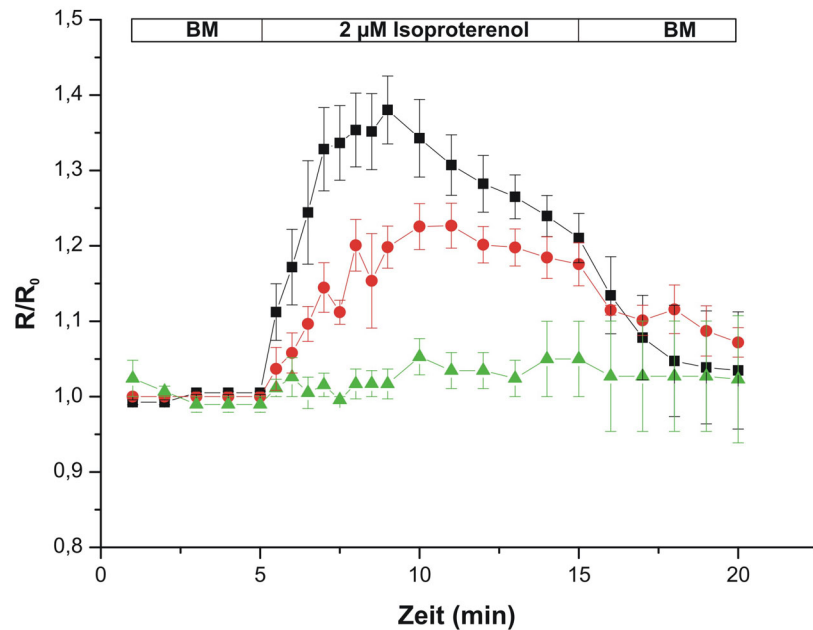


Abb. 3.18: Änderung der Schlagfrequenz embryonaler Herzen bei Stimulation mit Isoproterenol. Aufgetragen ist die auf die Basalfrequenz (R_0) normierte Herzschlagfrequenz (R/R_0) an den Tagen 10,5- bis 11 der Embryonalentwicklung. Der Wechsel der Badlösung ist im Balken oberhalb des Diagramms angegeben (BM, Basalmedium). $+/+$: $HCN4^{+/+}$, $+/R669Q$: $HCN4^{+/R669Q}$, $R669Q/R669Q$: $HCN4^{R669Q/R669Q}$. Anzahl der Herzen (n): $+/+$ (■) n=8, $+/R669Q$ (●) n=6, $R669Q/R669Q$ (▲) n=5. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler (SEM).

In Abbildung 3.18 ist die normierte Herzschlagfrequenz R/R_0 der verschiedenen Genotypen über einen Zeitraum von 20 min gezeigt. Der experimentelle Ablauf erfolgte wie für Abbildung 3.17 beschrieben. Die Frequenz der Wildtypherzen ($HCN4^{+/+}$) steigt in den ersten Minuten der Stimulation mit Isoproterenol um bis zu $38 \pm 4,5\%$ an. Dem gegenüber beobachtet man bei den Homozygoten ($HCN4^{R669Q/R669Q}$) nur eine Zunahme von $5,2 \pm 2,4\%$. Bei den Heterozygoten ($HCN4^{+/R669Q}$) beträgt die Zunahme der Herzschlagfrequenz $22,7 \pm 3,0\%$. Der Effekt ist kleiner als bei Wildtypen jedoch deutlich größer als bei den Homozygoten. Sowohl bei Herzen der Wildtypen als auch bei denen der Heterozygoten sind die durch Isoproterenol vermittelten Signale nur transient, d.h. bei beiden wird die maximale Herzfrequenz während langandauernder Stimulation nur kurz erreicht. Dies geschieht bei den Herzen aus Wildtypembryonen schneller als bei denen aus heterozygoten Embryonen. Jedoch schlagen die Herzen aus heterozygoten Embryonen über einen längeren Zeitraum mit maximaler Frequenz als die der Wildtypembryonen. Die geringe Zunahme der Herzschlagfrequenz bei homozygoten Embryonen erfolgt langsam und korreliert zeitlich nicht mit der Zunahme der beiden anderen Genotypen. Nach dem Wechsel auf normales Herzmedium nähert sich die Herzfrequenz bei allen drei Genotypen der basalen Herzfrequenz zu Beginn des Versuchs. Die Ergebnisse zeigen, dass HCN4 das Zielprotein in der β -adrenerg vermittelten Erhöhung der embryonalen Herzschlagfrequenz ist.

Dass die beobachteten Effekte mit der Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration einhergehen, kann geprüft werden, indem man membranständige Adenylatzyklen (unter Umgehung der β -adrenergen Rezeptoren) direkt aktiviert. NKH477 ist ein wasserlösliches Forskolin-Analog und ein Agonist für membranständige Adenylatzyklen. Zunächst wurden Experimente an embryonalen Wildtypherzen (E9,5, E10,5 und E11) durchgeführt. Der Versuchsablauf und die Auswertung erfolgten wie für Abbildung 3.17 beschrieben. Die Abbildung 3.19 zeigt exemplarisch die Wirkung von NKH477 auf embryonale Wildtypherzen unterschiedlicher Entwicklungsstadien.

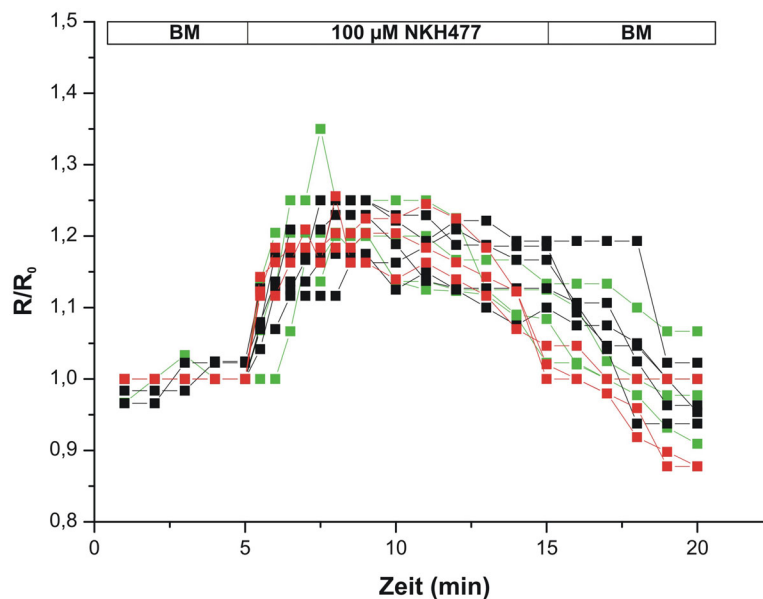


Abb. 3.19: Änderung der Schlagfrequenz embryonaler Wildtypherzen bei Stimulation mit NKH477. Aufgetragen ist die auf die Basalfrequenz (R_0) normierte Herzschlagfrequenz (R/R_0) an den Tagen 9,5- bis 11 der Embryonalentwicklung. Der Wechsel der Badlösung ist im Balken oberhalb des Diagramms angegeben (BM, Basalmedium). Anzahl der Herzen (n): E9,5 (■) n=4, E10,5 (■) n=5, E11 (■) n=3. Angegeben sind Mittelwerte.

Im Unterschied zu Isoproterenol erhöht NKH477 die Herzfrequenz auch schon an Tag E9,5, d.h. der Adenylatzyklase-vermittelte Signalweg ist zu diesem Zeitpunkt schon funktionell. Die Herzen der unterschiedlichen Entwicklungsstadien zeigen nur transiente, durch NKH477 vermittelte, Signale. Die maximale Zunahme liegt bei allen drei Entwicklungsstadien zwischen 17% und 29% und ist damit zwischen den einzelnen Entwicklungsstadien (E9,5-11) vergleichbar. Für den Vergleich der verschiedenen Genotypen wurden daher die Daten der verschiedenen Entwicklungsstadien statistisch zusammengefasst.

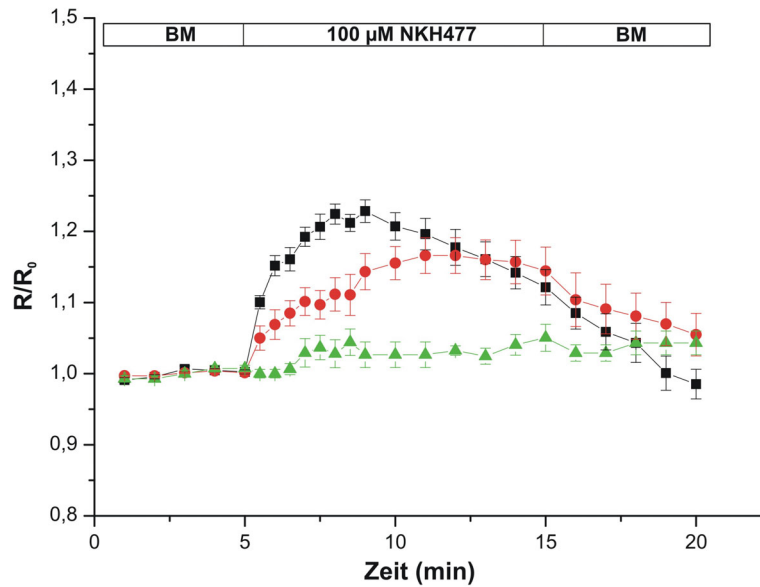


Abb. 3.20: Änderung der Schlagfrequenz embryonaler Herzen bei Stimulation mit NKH477. Aufgetragen ist die auf die Basalfrequenz (R_0) normierte Herzschlagfrequenz (R/R_0) an den Tagen 9,5- bis 11 der Embryonalentwicklung. Der Wechsel der Badlösung ist im Balken oberhalb des Diagramms angegeben (BM, Basalmedium). $+/+$: $HCN4^{+/+}$, $+/R669Q$: $HCN4^{+/R669Q}$, $R669Q/R669Q$: $HCN4^{R669Q/R669Q}$. Anzahl der Herzen (n): $+/+$ (■) n=14, $+/R669Q$ (●) n=13, $R669Q/R669Q$ (▲) n=5. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler (SEM).

In Abbildung 3.20 ist die normierte Herzschlagfrequenz R/R_0 der verschiedenen Genotypen über einen Zeitraum von 20 min gezeigt. Der experimentelle Ablauf erfolgte wie für Abbildung 3.17 beschrieben. Die Zunahme der Herzfrequenz beträgt für NKH477 $22,8 \pm 1,6\%$ für Herzen aus Wildtypembryonen ($HCN4^{+/+}$), $16,6 \pm 2,5\%$ für Herzen aus heterozygoten ($HCN4^{+/R669Q}$) und $4,4 \pm 1,9\%$ für Herzen aus homozygoten Embryonen ($HCN4^{R669Q/R669Q}$). Bei den Wildtypen und Heterozygoten ist also auch mit NKH477 eine deutliche Zunahme in der Herzfrequenz zu beobachten, wohingegen die Homozygoten nur eine sehr geringe Zunahme aufweisen. Die maximale Herzschlagfrequenz wird bei Wildtypembryonen schneller erreicht als bei heterozygoten Embryonen erreicht. Die Signale bei den Wildtypen sind nur transient, d.h. das Maximum wird nur kurz erreicht. Jedoch schlagen die Herzen der Heterozygoten über einen längeren Zeitraum mit maximaler Frequenz. Die Herzschlagfrequenz geht erst beim Mediumwechsel signifikant zurück, d.h. die Signale bei Heterozygoten sind nicht transient. Die geringe Zunahme der Herzschlagfrequenz bei homozygoten Embryonen erfolgt langsam und korreliert zeitlich nicht mit der Zunahme der beiden anderen Genotypen. Nach dem Wechsel auf normales Herzmedium nähert sich die Herzfrequenz bei allen drei Genotypen der basalen Herzfrequenz zu Beginn des Versuchs.

3.4.3 Die Herzschlagfrequenz wird durch einen HCN-Kanalblocker reduziert

Die basale Herzfrequenz ist zwischen den drei Genotypen sehr verschieden ($\rightarrow$ 3.4.1). Um zu überprüfen, welchen Einfluss HCN-Kanäle auf die basale Herzschlagfrequenz haben, wurden die embryonalen Herzen mit einem spezifischen HCN-Kanalblocker (ZD7288, Shin et al., 2001) superfundiert.

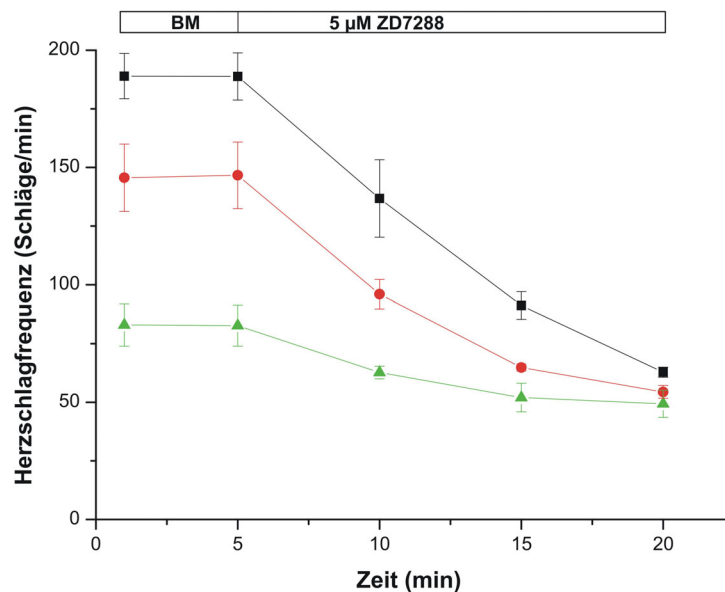


Abb. 3.21: Änderung der Schlagfrequenz embryonaler Herzen unter Einfluss von ZD7288. Aufgetragen ist Herzfrequenz von Tag E11 der embryonalen Entwicklung gegen die Zeit. Der Wechsel der Badlösung ist im Balken oberhalb des Diagramms angegeben (BM, Basalmedium). +/+ : HCN4^{+/+}, +/R669Q: HCN4^{+/R669Q}, R669Q/R669Q: HCN4^{R669Q/R669Q}. Anzahl der Herzen (n): +/+ (■) n=5, +/R669Q (●) n=6, R669Q/R669Q (▲) n=3. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler (SEM).

In Abbildung 3.21 ist der zeitliche Verlauf der Herzfrequenz unter Einfluss von ZD7288 gezeigt. Bei allen drei Genotypen nimmt die Herzschlagfrequenz in Anwesenheit von ZD7288 ab. Bei den Herzen der Wildtypen (HCN4^{+/+}) ist eine Reduktion von $188,9 \pm 9,6$ auf $62,8 \pm 2,2$ Schläge/min, bei Heterozygoten (HCN4^{+/R669Q}) von $145,6 \pm 14,3$ auf $54,4 \pm 2,7$ Schläge/min und bei Homozygoten (HCN4^{R669Q/R669Q}) von $82,9 \pm 9,0$ auf $49,3 \pm 5,8$ Schläge/min zu beobachten. In allen drei Genotypen tragen also HCN-Kanäle zur basalen Herzschlagfrequenz bei. Nach 15 min Superfusion mit ZD7288 ist die Frequenz von heterozygoten und homozygoten Herzen nahezu identisch. Die Frequenz der Wildtypherzen nähert sich der der anderen beiden Genotypen an.

3.5 Untersuchung embryonaler Kardiomyozyten

Die funktionellen Untersuchungen der intakten embryonalen Herzen zeigen, dass die Mutation R669Q einen negativen Einfluss auf die Rhythmusbildung und die β -adrenerge Modulation der Herzfrequenz hat. Im Folgenden wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften einzelner Kardiomyozyten analysiert, um den Einfluss der Mutation auf den I_f -Strom zu untersuchen. Embryonale Herzen wurden isoliert, in Einzelzellen dissoziiert ($\rightarrow$ 2.21.1.2) und für 24-72 h kultiviert.

3.5.1 Elektrophysiologische Charakterisierung

Die embryonalen kardialen Myozyten wurden sowohl im *voltage clamp*- als auch im *current clamp*-Mode untersucht ($\rightarrow$ 2.21). Im Vordergrund stand die Charakterisierung der HCN-Ströme dieser Zellen. Die ersten Untersuchungen ergaben, dass in Zellen ohne spontane Aktivität keine HCN-Ströme nachgewiesen werden konnten. Von diesem Zeitpunkt an wurden nur noch Zellen mit spontanen Kontraktionen ausgewählt. Ich gehe zunächst auf die *current clamp*-Messungen ein. Abbildung 3.22 zeigt eine Zusammenstellung unterschiedlicher Aktionspotenziale, die von verschiedenen Zellen abgeleitet wurden. Einige der Zellen befanden sich noch in einem aktiven Gewebeverband. Bei diesen konnten keine *voltage clamp*-Messungen durchgeführt werden, da durch die elektrischen Kontakte zu den Nachbarzellen keine zuverlässige Spannungsklemme möglich war. Man beobachtet eine Vielzahl verschiedener Aktionspotenzialformen, unter ihnen die bekannten primitiven (Abb. 3.22A), die vorhofartigen (Abb. 3.22B, K, N) sowie die kammerartigen Aktionspotenziale (Abb. 3.22C) ($\rightarrow$ 1.2.1). Einige Zellen zeigten aber auch extrem kurze, fast neuronale Aktionspotenziale (Abb. 3.22D, E). Es ist nicht einfach, diese verschiedenen Typen von Kardiomyozyten zu klassifizieren. So lässt beispielsweise die Morphologie einer dissoziierten Zelle in Kultur keine wesentlichen Rückschlüsse auf ihre Aktionspotenzialform zu.

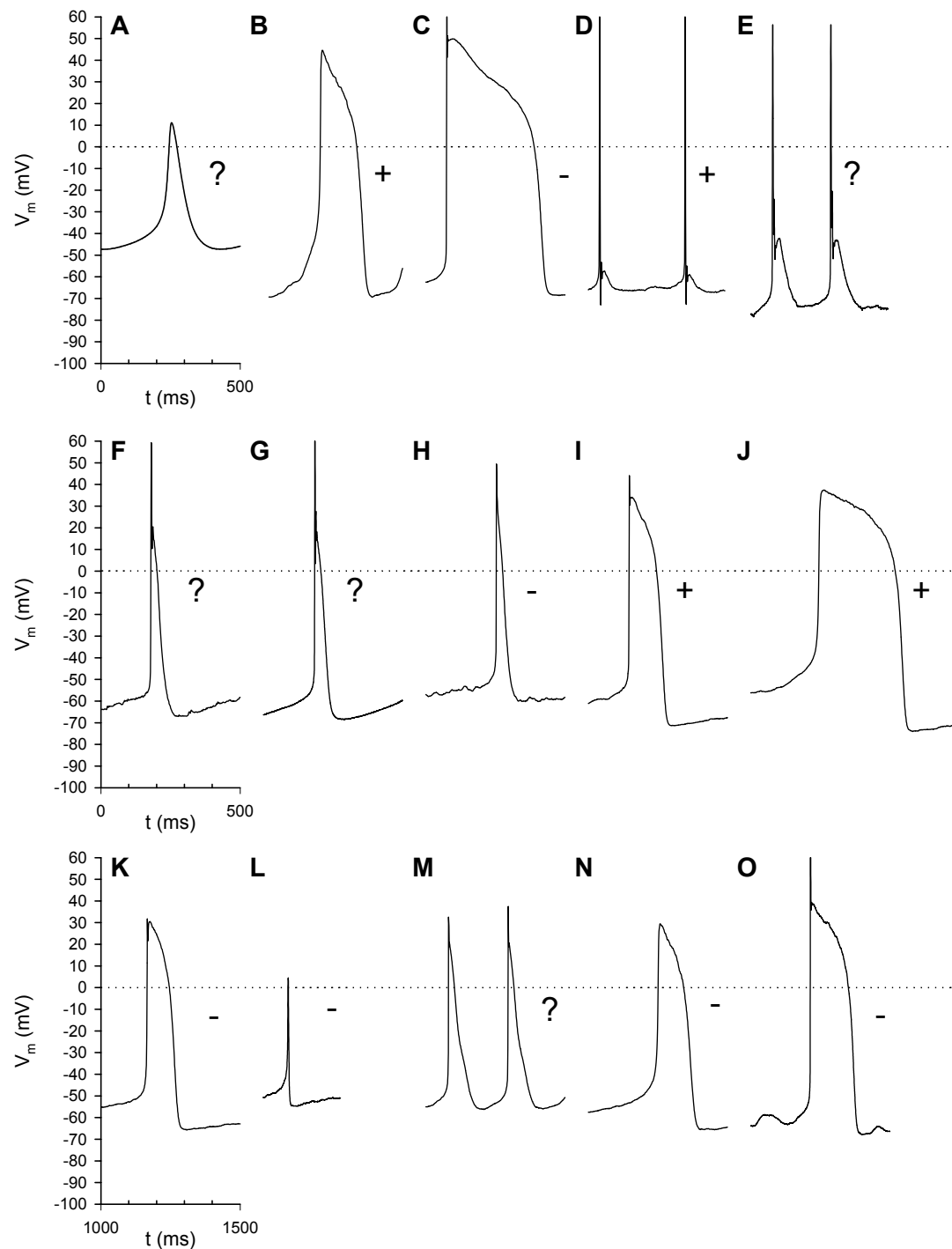


Abb. 3.22: Spontane Aktionspotenziale embryonaler Kardiomyozyten. Die Messungen wurden im *current clamp*-Mode der *patch clamp*-Technik aufgezeichnet. Ein (+) neben dem Spannungsverlauf kennzeichnet Zellen, die HCN-positiv waren, (-) kennzeichnet HCN-negative Zellen; (?) kennzeichnet Zellen, bei denen unklar blieb, ob HCN-Ströme vorhanden waren. Aufgetragen ist die Membranspannung V_m gegen die Zeit t .

Weiterhin wurde bei Zellen mit ähnlichem Aktionspotenzial bisweilen HCN-Strom nachgewiesen, manchmal aber auch nicht. Abbildung 3.23 zeigt beispielsweise die Ableitungen von zwei verschiedenen Kardiomyozyten. Beide Zellen waren von der Morphologie her ähnlich, verhältnismäßig groß und rund. Die Aktionspotenziale

(Abb. 3.23A, C) sind von Zeitverlauf, Aktivierungsschwelle und Repolarisation vergleichbar, man könnte diese beiden Zellen in dieselbe Klasse embryonaler Kardiomyozyten einordnen. Eine der Zellen wies eindeutig eine HCN-Leitfähigkeit auf (Abb. 3.23B), die andere jedoch nicht (Abb. 3.23D).

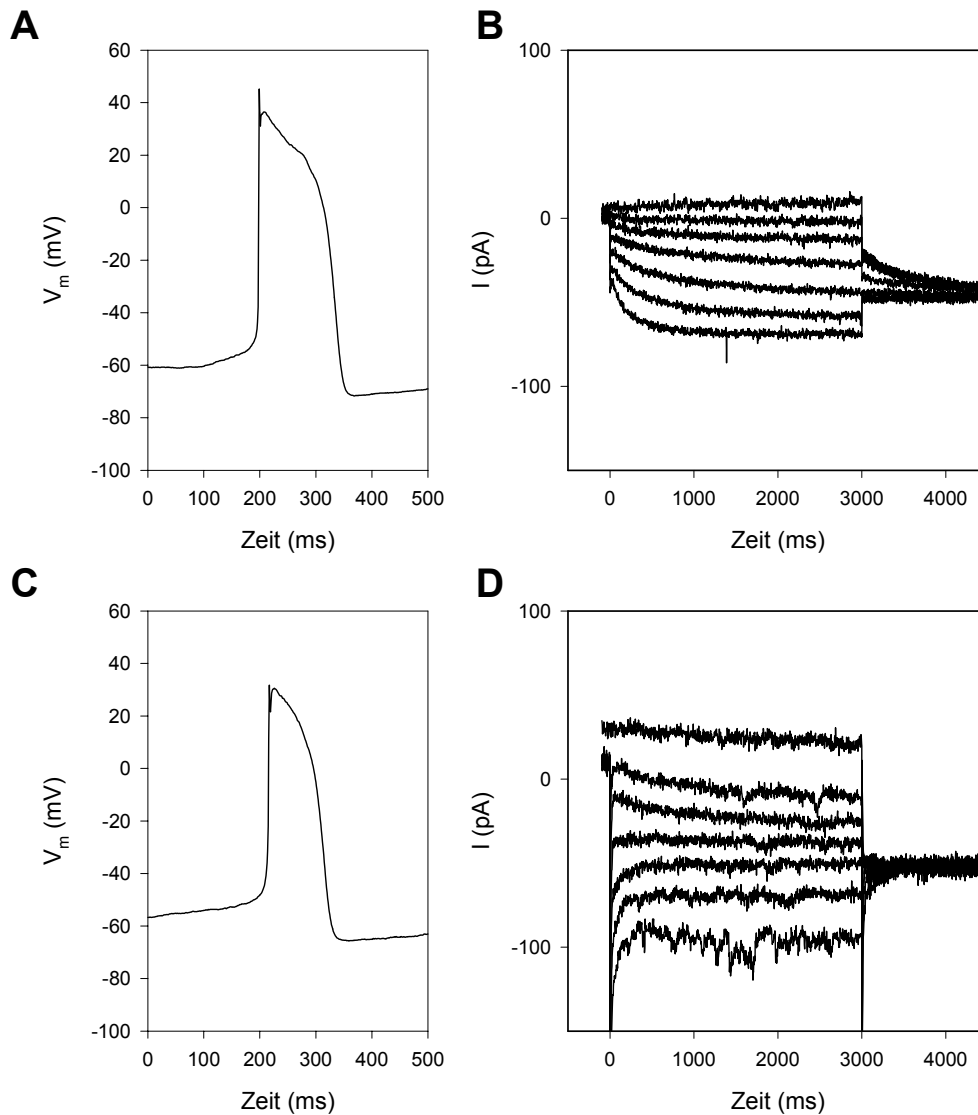


Abb. 3.23: Aktionspotenziale und Stromantworten zweier embryonaler Kardiomyozyten. Die Zellen wurden in der *whole cell*-Konfiguration der *patch clamp*-Technik untersucht. **(A)** Aktionspotenzial. **(B)** Aktivierung nativer HCN-Kanäle im *voltage clamp*. Ausgehend von einer Haltespannung von -40 mV wurden hyperpolarisierende Spannungspulse von -40 mV bis -100 mV an die Zelle angelegt. Anschließend wurde ein Spannung von -80 mV appliziert. **(C)** Aktionspotenzial. **(D)** Spannungsprotokoll wie in (B), jedoch sind hier keine HCN-Ströme nachweisbar.

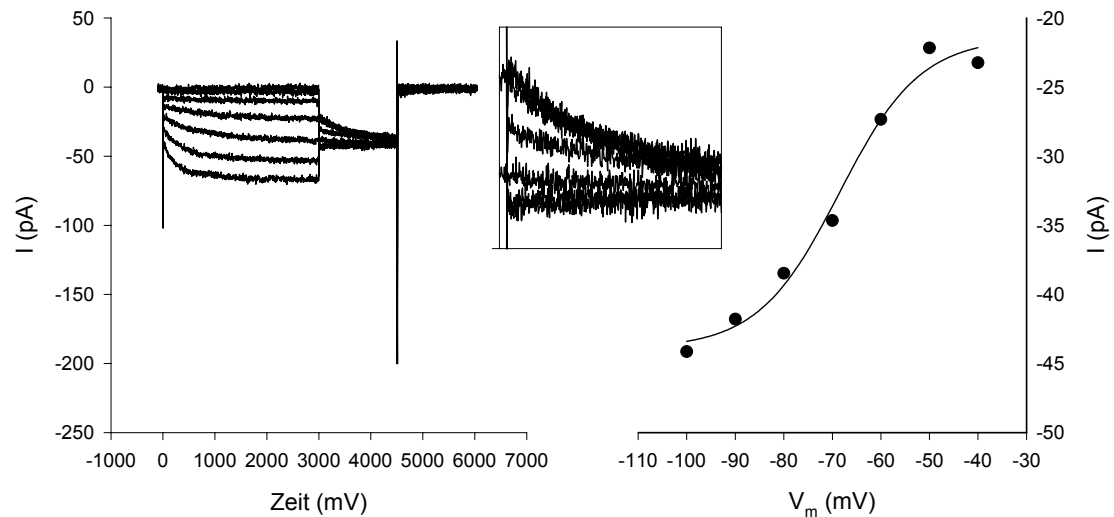


Abb. 3.24: Aktivierungseigenschaften der HCN-Ströme einer embryonalen Kardiomyozyte. (Links) Stromantwort auf das Spannungsprotokoll von Abb. 3.23. **(Mitte)** Ströme nach dem Spannungssprung auf -80 mV. **(Rechts)** Aktivierungskurve. Die *tail currents* unmittelbar nach dem Spannungssprung nach -80 mV wurden gegen die Spannung V_m aufgetragen. Die durchgezogene Linie wurde mit der Boltzmann-Gleichung ($\rightarrow$ 2.21) mit folgenden Parametern berechnet: $V_{1/2} = -68,6$ mV; $s = 8,35$; $I_{\min} = -21,4$ pA; $I_{\max} = -43,9$ pA.

Abbildung 3.24 links zeigt die Stromantwort einer typischen HCN-positiven Kardiomyozyte. Neben dem HCN-Strom während der ersten beiden Phasen des Spannungsprotokolls beobachtet man einen großen transienten Einwärtsstrom, wenn nach der Hyperpolarisation die Haltespannung wieder appliziert wird. Dieser Strom, der in der Darstellung nur als nach unten gerichtete Spitze zu erkennen ist, wird von schnellen spannungsabhängigen Natriumkanälen getragen. Die Stromantworten bei -80 mV, die die Aktivierungseigenschaften der HCN-Kanäle beschreiben, sind in der mittleren Teilabbildung nochmals vergrößert dargestellt. Die rechte Teilabbildung zeigt die Aktivierungskurve der HCN-Kanäle. Die nativen HCN-Kanäle dieser Zelle sind bei -69 mV halbmaximal aktiviert, dies ist ein verhältnismäßig positiver Wert. Unter diesen Bedingungen waren heterolog exprimierte HCN4-Kanäle erst bei $-79,3$ mV halbmaximal offen. Auch die anderen Kardiomyozyten lieferten ähnliche Ergebnisse: Die $V_{1/2}$ -Werte variierten von $-62,9$ bis $-74,8$ mV. Abbildung 3.25 zeigt die mittlere Aktivierungskurve der nativen HCN-Kanäle.

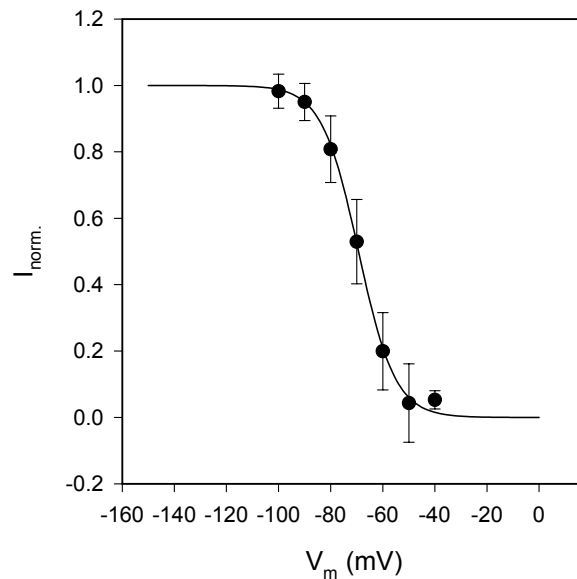


Abb. 3.25: Aktivierungskurve der HCN-Ströme aus embryonalen Kardiomyozyten. Dargestellt sind mittlere, normierte *tail-currents* ($\pm$ SD) bei -80 mV für native HCN-Kanäle embryonaler Kardiomyozyten. Die durchgezogene Linie wurden mit der Boltzmann-Gleichung $I_{\text{norm.}} = (1 + \exp((V_m - V_{1/2})/s))^{-1}$ berechnet. ($V_{1/2} = -69,3 \pm 3,9$; $s = 7,1 \pm 2,6$; $n = 9$).

Der mittlere $V_{1/2}$ -Wert für native HCN-Kanäle beträgt $-69,3 \pm 3,9$ mV. Dieser Wert ist etwa 10 mV positiver als der entsprechende Wert für die heterolog exprimierten HCN4-Kanäle. Die Gründe für diese Unterschiede sind unklar. Mögliche Erklärungen werden in der Diskussion thematisiert.

3.6 Untersuchungen der Herzfunktion adulter Mäuse

3.6.1 Telemetrisches Elektrokardiogramm (EKG)

Die Untersuchung der Herzfunktion bei Mäusen mit einem telemetrischen EKG hat gegenüber dem Oberflächen-EKG den Vorteil, dass die Messungen am nichtsedierten, sich frei bewegenden Tier durchgeführt werden können. Die Herzfunktion kann unter unterschiedlichen Bedingungen, z.B. während der Ruhephasen oder unter Belastung, analysiert werden. Die Herzfunktion der in dieser Arbeit untersuchten Mäuse wurde in Ruhe, unter Belastung und unter Stressbedingungen untersucht. Um die Ergebnisse besser einordnen zu können, werden im nächsten Abschnitt kurz die Eigenschaften des EKG beschrieben.

3.6.1.1 Eigenschaften des Elektrokardiogramms

Das Elektrokardiogramm zeichnet die elektrischen Aktivitäten, d.h. die Erregungsbildung des Herzens auf. Dieser charakteristische Verlauf kann in einzelne Abschnitte (Wellen) unterteilt werden. In Abbildung 3.26 ist der typische Verlauf eines EKGs dargestellt:

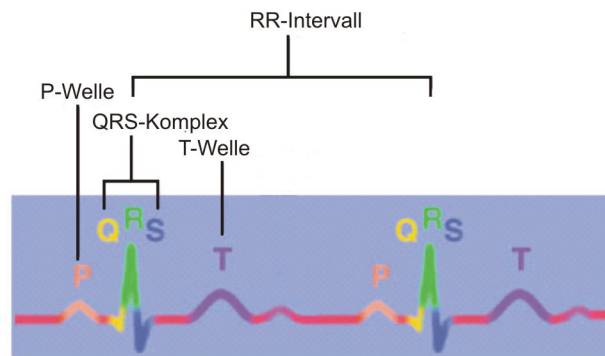


Abb. 3.26: Das Elektrokardiogramm (EKG). Der Verlauf der Erregungsbildung ist farblich dargestellt (Erklärung siehe Text).

Die Erregung des Herzens beginnt im Sinusknoten. Da nur wenige Zellen zu dieser Erregung beitragen, ist sie im EKG nicht sichtbar. Die erste sichtbare Erregung ist die P-Welle. Sie repräsentiert die Erregung des rechten Atriums. Auf die P-Welle folgt die Q-Welle, der Beginn der Erregungsausbreitung über die Ventrikel. Die Strecke zwischen diesen beiden Wellen bezeichnet man als PQ-Strecke. Sie zeigt die anhaltende Erregung der Vorhöfe. Mit der Q-Welle wird der QRS-Komplex eingeleitet, die Erregungsausbreitung über die Ventrikel. Nach diesem Komplex folgt die ST-Strecke, die, analog zur PQ-Strecke, Ausdruck der vollständigen Erregung der Ventrikel ist. Die Erregungsrückbildung im Ventrikel wird durch die T-Welle angezeigt. Danach kann ein neuer Erregungszyklus beginnen. Die Zykluslänge wird über den Abstand zwei aufeinander folgender R-Wellen bestimmt und als RR-Intervall bezeichnet.

3.6.1.2 24 h EKG

Da die homozygoten Embryonen vor der Geburt sterben, wurden im Folgenden nur Wildtyptiere und heterozygote Tiere untersucht.

Das EKG der Tiere wurde über einen Zeitraum von insgesamt 24 h bestimmt. In stündlichen Abständen wurde das EKG für 5 min kontinuierlich aufgezeichnet. Aus diesen Messungen

wurde für jedes Tier die minimale, die maximale sowie die durchschnittliche Herzschlagfrequenz anhand des RR-Intervalls bestimmt.

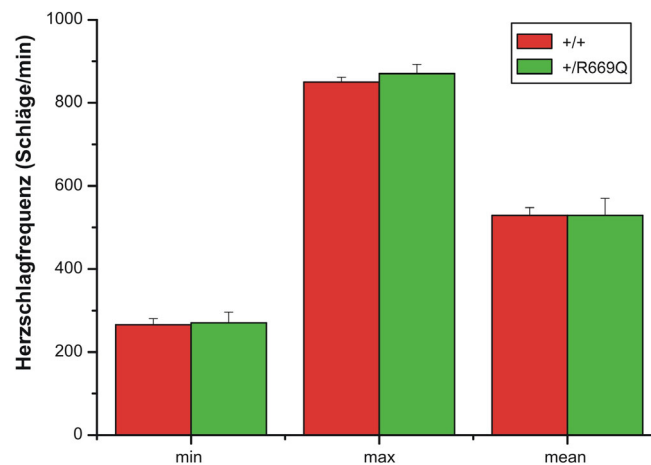


Abb. 3.27: Vergleich der Herzschlagfrequenz von $HCN4^{+/+}$ und $HCN4^{+/R669Q}$ Mäusen über 24 h. Aufgetragen ist die minimale (min), maximale (max) und mittlere (mean) Herzfrequenz über 24 h. +/+ : $HCN4^{+/+}$, +/-R669Q: $HCN4^{+/R669Q}$. Pro Genotyp wurden jeweils 6 Tiere untersucht. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler (SEM).

Zwischen den beiden Genotypen ist kein Unterschied der Herzschlagfrequenz zu beobachten. Die minimale Herzschlagfrequenz beträgt bei Wildtyptieren $265,7 \pm 14,4$, bei heterozygoten Tieren $270,3 \pm 25,9$ Schläge/min. Die maximale Herzschlagfrequenz beträgt für Wildtypiere $850 \pm 11,8$, für heterozygote Tiere $870,5 \pm 22,3$ Schläge/min. Die mittlere Herzfrequenz liegt für Wildtypen bei $528,8 \pm 28,9$ und für Heterozygote bei $529,0 \pm 42,6$ Schlägen/min. Die Herzschlagfrequenz im adulten heterozygoten Tier scheint also von der Mutation nicht beeinflusst zu werden.

In der Ruhephase der Tiere wurde zusätzlich über einen Zeitraum von 2 h kontinuierlich das EKG aufgezeichnet. Diese Messungen dienten zur Bestimmung der Dauer der P-Welle, des PQ-Intervalls, des RR-Intervalls sowie der Strecke vom Ende der P-Welle bis zum Beginn der Q-Welle.

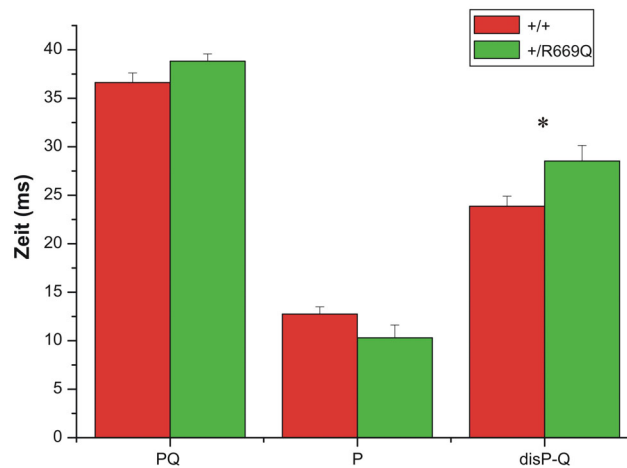


Abb. 3.28: Dauer des PQ-Intervalls, der P-Welle sowie der PQ-Strecke. Aufgetragen ist die Dauer (ms) der einzelnen Intervalle. PQ: PQ-Intervall, P: P-Welle, disP-Q: Strecke Ende P-Welle bis Anfang Q-Welle. +/+ : $HCN4^{+/+}$, +/R669Q: $HCN4^{+/R669Q}$. Anzahl der Tiere (n): n=6 ($HCN4^{+/+}$), n=7 ($HCN4^{+/R669Q}$). Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler (SEM). * $p < 0,05$.

Sowohl die Dauer des PQ-Intervalls als auch der P-Welle ist zwischen den Wildtypen (P: $12,75 \pm 0,69$ ms; PQ: $36,62 \pm 0,92$ ms) und den Heterozygoten (P: $10,3 \pm 1,31$ ms; PQ: $38,83 \pm 0,75$ ms) nicht signifikant verschieden. Im Gegensatz dazu ist der Abstand vom Ende der P-Welle bis zum Anfang der Q-Welle (disP-Q) bei den heterozygoten Tieren größer als bei den Wildtyptieren. Das heißt, es dauert bei den heterozygoten Tieren länger, bis die Erregung von den Vorhöfen über den Atrioventrikularknoten (AV-Knoten) auf die Ventrikel übertragen wird.

Des Weiteren wurden die Standardabweichungen für die mittleren RR-Intervalle der einzelnen Tiere bestimmt. Dies erlaubt eine Aussage über die Herzfrequenzvariabilität, die Fähigkeit des Herzens, den zeitlichen Abstand von einem Herzschlag zum Nächsten belastungsabhängig zu verändern und sich so flexibel wechselnden Herausforderungen anzupassen. Die Herzfrequenzvariabilität ist ein Maß für die Balance zwischen sympathischem und parasympathischem Tonus. In Abbildung 3.29 ist die Standardabweichung des RR-Intervalls für Wildtyptiere und für heterozygote Tiere dargestellt. Es besteht kein signifikanter Unterschied ($HCN4^{+/+}$: $20,25 \pm 2,9$ ms, $HCN4^{+/R669Q}$: $21,3 \pm 3,6$ ms).

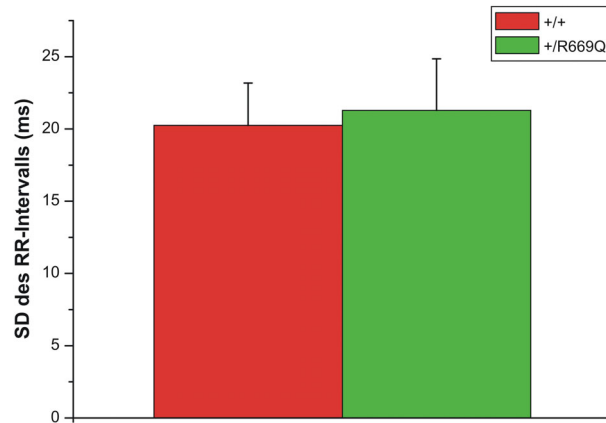


Abb. 3.29: Variabilität der Herzschlagfrequenz. Aufgetragen ist die Standardabweichung des RR-Intervalls (ms) für $HCN4^{+/+}$ (+/+) und $HCN4^{+/R669Q}$ (+/R669Q). Anzahl der Tiere (n): n= 4 ($HCN4^{+/+}$), n=7 ($HCN4^{+/R669Q}$). Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler (SEM).

3.6.1.3 Schwimmen

Um zu überprüfen, ob sich die Herzschlagfrequenz zwischen den Wildtypen und den Heterozygoten unter Belastung unterscheidet, wurden die Tiere für 5 min in einen wassergefüllten Tank gesetzt. Das EKG wurde vor, während und nach dem Schwimmen aufgezeichnet. Der Versuchsaufbau ist so gewählt, dass die Tiere submaximale belastet werden.

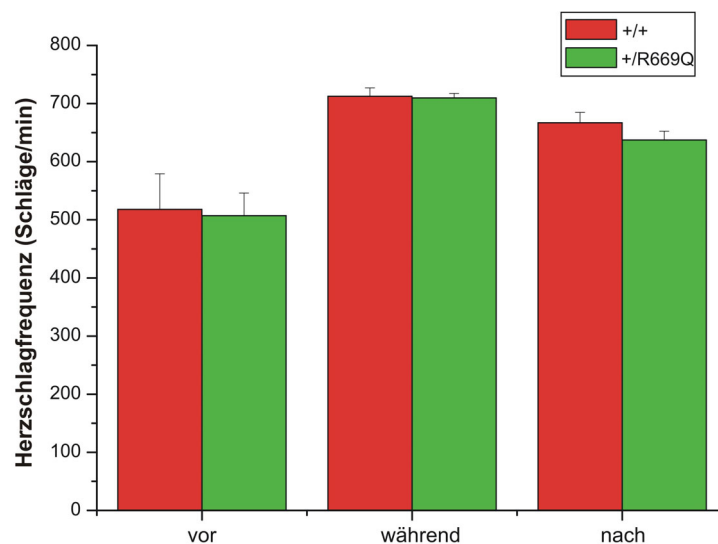


Abb.3.30: Vergleich der Herzschlagfrequenzen vor, während und nach dem Schwimmen. Aufgetragen ist die mittlere Herzfrequenz für $HCN4^{+/+}$ (+/+) und $HCN4^{+/R669Q}$ (+/R669Q) vor, während und nach dem Schwimmen. Pro Genotyp wurden 6 Tiere untersucht. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler (SEM).

Weder vor, während oder nach der Belastung ist ein signifikanter Unterschied der mittleren Herzschlagfrequenz zwischen den beiden Genotypen zu erkennen. Sie beträgt bei

Wildtyptieren vor der Belastung $517,8 \pm 61,3$, während der Belastung $712,4 \pm 14,4$ und danach 667 ± 178 Schläge/min. Die mittlere Herzschlagfrequenz der heterozygoten Tiere ist vergleichbar: $507,1 \pm 40$ Schläge/min vor dem Schwimmen, $709,7 \pm 7,5$ während und $627,3 \pm 15,2$ nach dem Schwimmen. Neben der mittleren wurden auch die minimale und die maximale Herzfrequenz bestimmt. Auch hier sind keine Unterschiede zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Die Mutation scheint also keinen Einfluss auf die Herzschlagfrequenz unter Belastungsbedingungen zu haben.

3.6.1.4 Heißer Luftstrom

Um zu überprüfen, ob die Herzschlagfrequenz der beiden Genotypen auch bei einer anderen Belastungsform ähnlich sind, wurde eine Methode benutzt, bei der den Tieren durch einen heißen Luftstrom die Nähe eines Feindes vorgetäuscht wird. Die Tiere werden in Fluchtbereitschaft versetzt und stehen somit unter Stress.

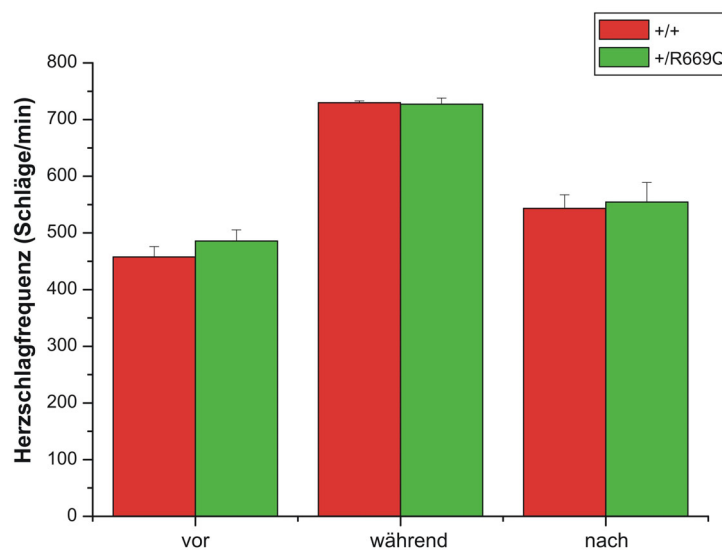


Abb. 3.31: Vergleich der Herzschlagfrequenzen vor, während und nach dem heißen Luftstrom. Aufgetragen ist die mittlere Herzfrequenz für HCN4^{+/+} (+/+) und HCN4^{+/R669Q} (+/R669Q) vor, während und nach dem Luftstrom. Pro Genotyp wurden 6 Tiere untersucht. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler (SEM).

Die mittlere Herzschlagfrequenz der Wildtyptiere liegt vor der Belastung bei $457,7 \pm 18,3$, während des heißen Luftstroms bei $729,7 \pm 3,7$ und nach der Belastung bei $543,5 \pm 23,9$ Schlägen/min. Die Herzschlagfrequenz der heterozygoten Tiere beträgt vor der Belastung $485 \pm 19,9$, während der Belastung $727,2 \pm 10,9$ und nach der Belastung

554,5 ± 34,7 Schläge/min. Auch in dieser Versuchsanordnung ist bei heterozygoten Tieren kein Einfluss der Mutation auf die Herzschlagfrequenz nachzuweisen.

3.6.2 Untersuchungen am isolierten Herzen

Um die Herzfunktion im adulten Tier denerviert, d.h. ohne Einfluss der autonomen Kontrolle durch das vegetative Nervensystem analysieren zu können, wurden die Herzen der Wildtypen und der Heterozygoten nach den EKG-Messungen isoliert und in einer Langendorff-Apparatur untersucht.

3.6.2.1 Spontaner Herzrhythmus

In der Langendorff-Apparatur ist es möglich, sowohl die Schlagfrequenz der Atria als auch der Ventrikel zu bestimmen. Dabei kann einerseits der spontane Rhythmus gemessen werden, andererseits können die Vorhöfe auf einen bestimmten Rhythmus stimuliert werden (→ 2.24.2).

Weder unter Basalbedingungen noch während der Stimulation mit Orciprenalin (Agonist für β -adrenerge Rezeptoren) ist eine Änderung des spontanen Rhythmus zwischen den Herzen der Wildtypen und der heterozygoten Tiere zu erkennen (Abb. 3.32). Die durchschnittliche Zykluslänge bei Wildtyph Herzen beträgt für das Atrium $137,2 \pm 9,7$ ms, für den Ventrikel $137,3 \pm 9,7$ ms. Für die heterozygoten Tiere beträgt die mittlere Zykluslänge des Atriums $153,1 \pm 24,9$ ms und die des Ventrikels $153,1 \pm 24,8$ ms. Die mittlere Zykluslänge bei Stimulation mit Orciprenalin beträgt bei Wildtypen für das Atrium $95,1 \pm 2,7$ ms, für den Ventrikel $100 \pm 5,8$ ms, bei den heterozygoten Tieren $98 \pm 3,7$ ms für das Atrium und $108,3 \pm 7,1$ ms für den Ventrikel. Die prozentuale Abnahme der mittleren Zykluslänge beträgt bei den Wildtypen ca. 31%, bei den heterozygoten Tieren ca. 36%.

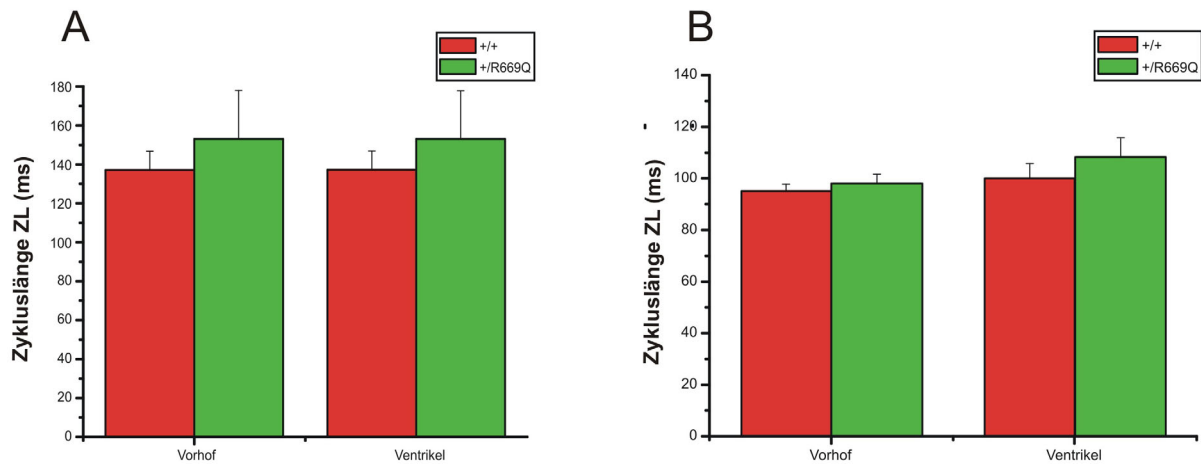


Abb. 3.32: Vergleich der spontanen Herzschlagfrequenzen. Aufgetragen ist jeweils die mittlere Zykluslänge (ms) für das Atrium und das Ventrikel unter Basalbedingungen (A) und während der Perfusion mit 0,74 µM Orciprenalin (B). +/+ : HCN4^{+/+}, +/R669Q: HCN4^{+/R669Q}. Anzahl der Tiere (n): n=6 (HCN4^{+/+}), n=5 (HCN4^{+/R669Q}). Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler (SEM).

Interessanterweise treten jedoch bei Herzen heterozygoter Tiere nach dem Wechsel von der Orciprenalinlösung auf normale Krebs-Henseleit Lösung (→ 2.24.2) spontane Sinuspausen bzw. ein spontaner Sinusknotenblock auf (8/10 Tieren, Fisher-Test $p < 0,05$), der bei Wildtyptieren nicht beobachtet wurde (0/9 Tieren). In Abbildung 3.33 ist exemplarisch ein solches Ereignis für ein heterozygoten Tier gezeigt.

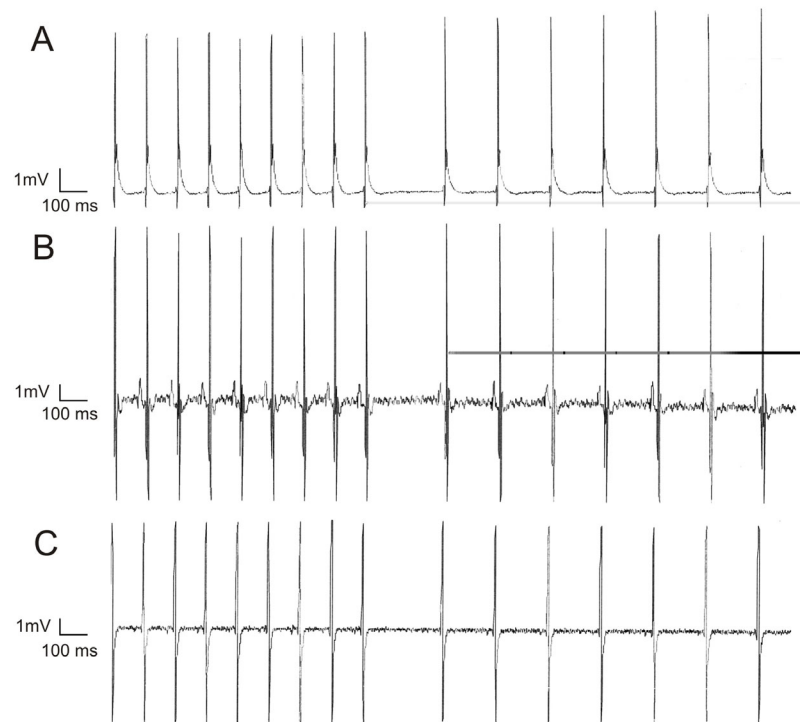


Abb. 3.33: Spontane rhythmische Aktivität isolierter HCN4^{+/R69Q}-Hezen. A. Ventrikuläres Aktionspotenzial (monophasisches Aktionspotenzial). B. Atriales EKG (bipolar von 2 Polen des oktopolaren Katheters im rechten Atrium). C.. Gewebabad-EKG. Die waagerechte Linie demonstriert die Phase des Sinusknotenblocks. Die Größenstandards sind links angegeben.

In der ersten Hälfte der Aufzeichnung schlägt das Herz regelmäßig. Dann tritt spontan sowohl im Atrium (Abb. 3.33B) als auch im Ventrikel (Abb. 3.33A) eine Pause der rhythmischen Aktivität ein. Danach setzt jeder zweite Herzschlag aus, was sowohl im EKG (Abb. 3.33C) als auch im Atrium und im Ventrikel (Abb. 3.33A, B) deutlich zu sehen ist. Diesen charakteristischen Verlauf der Erregungsbildung bezeichnet man als Sinusknotenblock 2. Grades. Vor und während der Stimulation mit Orciprenalin unterscheidet sich die Anzahl des Auftretens von Sinuspausen bzw. Blockaden des Sinusknotens zwischen Wildtypen und Heterozygoten kaum (vor: 1/9 Wildtypen, 3/10 Heterozygoten; während: 1/9 Wildtypen, 4/10 Heterozygoten). Die Erregungsüberleitung scheint also nur im Anschluss an β -adrenerge Stimulation in den Herzen der heterozygoten Tiere gestört zu sein.

3.6.2.2 Stimulation des Herzens

Mit Hilfe des oktopolaren Katheters wurde der Herzschlag auf eine konstante Frequenz (Zykluslänge: 80 – 140 ms, entspricht einer Schlagfrequenz von 430 – 750 Schläge/min) eingestellt. Durch Ableitung der monophasischen Aktionspotenziale des linken und rechten Ventrikels kann die Aktionspotenzialdauer (APD) bei 50% Repolarisation (APD_{50}), bei 70% Repolarisation (APD_{70}) und 90% Repolarisation (APD_{90}) bestimmt werden. Es wurde zunächst die totale Amplitude vom Ruhepotenzial bis zum Scheitelpunkt der Plateauphase des Aktionspotenzials bestimmt. Anhand dieser Größe wurden die APD_{50} , APD_{70} und APD_{90} ermittelt. Die folgende Abbildung verdeutlicht die Vorgehensweise zur Bestimmung der einzelnen Parameter der Aktionspotenzialdauer:

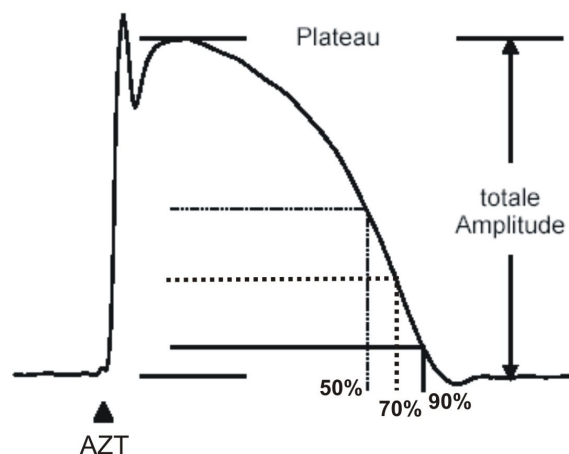


Abb. 3.34: Verlauf eines monophasischen Aktionspotenzials. Eingezeichnet ist die totale Amplitude, anhand derer die unterschiedlichen Phasen der Repolarisation (50, 70, 90%) bestimmt werden. AZT: Aktivierungszeitpunkt (Stimulation).

Die Aktionspotenzialdauer bei 70% Repolarisation wurde für Wildtyptiere und heterozygote Tiere bei drei konstanten Schlagfrequenzen (100, 120, 140 ms) bestimmt und verglichen. Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen:

Tab. 3.2: Vergleich der APD_{70} bei $HCN4^{+/+}$ und $HCN4^{+/R669Q}$ Tieren. Angegeben ist die Aktionspotenzialdauer bei 70% Repolarisation für verschiedene Schlagfrequenzen. Anzahl der Tiere (n)/Genotyp: n=9 ($HCN4^{+/+}$), n=10 ($HCN4^{+/R669Q}$). Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler (SEM).

Zykluslänge (ms)	APD_{70} $HCN4^{+/+}$ (ms)	APD_{70} $HCN4^{+/R669Q}$ (ms)
100	14 ± 2	19 ± 3
120	17 ± 3	20 ± 3
140	17 ± 3	17 ± 2

Zwischen den beiden Genotypen ist kein signifikanter Unterschied für die Aktionspotenzialdauer (APD_{70}) bei einer Zykluslänge von 100, 120 oder 140 ms festzustellen. Die Mutation scheint also die Erregungsbildung und –weiterleitung bei vorgegebener Schlagfrequenz nicht zu beeinflussen.

4. Diskussion

HCN-Kanäle sind spannungsabhängige Ionenkanäle, die durch Hyperpolarisation des Membranpotenzials öffnen und deren Aktivität durch die direkte Bindung von zyklischen Nukleotiden moduliert wird. Die Kanäle sind an der Entstehung und Regulation rhythmischer Aktivität im Herzen und im Gehirn beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie wichtig die Regulation der HCN4-Kanalaktivität durch cAMP für die Entstehung und Modulation rhythmischer Aktivität *in vivo* ist. Ich habe eine Mauslinie hergestellt, bei der die Bindung von cAMP an den Kanal durch einen einzigen Aminosäureaustausch (R669Q) verhindert wird. Ich konnte zeigen, dass die homozygoten Träger der Mutation in einem frühen Embryonalstadium sterben. Die Ergebnisse der Untersuchung des kardialen Phänotyps in der Embryonalentwicklung ermöglichen neue, tief greifende Einblicke in die Bedeutung der Modulation der HCN-Kanalaktivität durch cAMP *in vivo*.

4.1 Warum sterben die homozygoten Embryonen *in utero*?

Die basale Schlagfrequenz isolierter Herzen unterscheidet sich deutlich zwischen Wildtypembryonen, heterozygoten und homozygoten Embryonen (→ 3.4.1). Herzen heterozygoter und homozygoter Embryonen schlagen deutlich langsamer als die von Wildtypembryonen. Homozygote Embryonen besitzen fast denselben Phänotyp wie die HCN4 *Knock-out* Embryonen (Stieber et al., 2004), die ebenfalls in einem frühen Embryonalstadium sterben. Die Ursache für den Tod der HCN4 *Knock-out* Embryonen ist laut Stieber und Kollegen (2004) das Fehlen des HCN4-Kanals als Schrittmacher im Herzen. Möglicherweise sterben die homozygoten Embryonen meiner Mauslinie, weil der mutierte Kanal nicht als Schrittmacher im Herzen fungieren kann. Wie kann man dieses unerwartete Ergebnis erklären?

Eine mögliche Erklärung, dass versehentlich ein *Knock-out* hergestellt und der mutierte Kanal nicht in den Zellen vorhanden ist, kann ich ausschließen. Anhand der homozygoten Embryonen konnte ich zeigen, dass die Mutation im HCN4-Kanalgen vorhanden ist, dass die RNA gebildet wird und der mutierte Kanal exprimiert wird (→ 3.3.2, 3.3.3). Andererseits könnte die Mutation dazu führen, dass der Kanal nicht mehr zur Plasmamembran transportiert werden kann. Mutationen, die zu solchen „Trafficking“-Defekten führen, sind in der Literatur

beschrieben. Das wohl bekannteste Beispiel ist die ΔF^{508} -Mutante des CFTR-Proteins (Collins, 1992). Oft lässt sich ein „Trafficking“-Defekt im heterologen Expressionssystem nachstellen und bestätigen (z.B.: Proenza et al., 2002). Für meine Mutante gilt dies jedoch nicht: Der mutierte Kanal zeigt weder in der elektrophysiologischen noch in der immunzytochemischen Untersuchung ein Transportdefizit ($\rightarrow$ 3.1.1, 3.2.1). Es ist daher unwahrscheinlich, dass der Kanal *in vivo* nicht in die Plasmamembran transportiert wird. Die elektrophysiologische Untersuchung an Kardiomyozyten aus heterozygoten und homozygoten Embryonen steht noch aus; sie wird zeigen, ob der Kanal in der Plasmamembran vorhanden ist.

Eine nahe liegende Erklärung für den Tod der homozygoten Embryonen der Mauslinie ist, dass cAMP einen größeren Einfluss auf die HCN4-Kanalaktivität hat als bisher angenommen. Der heterolog exprimierte Wildtyp-HCN4-Kanal wird bei $-79.3 (\pm 3,7)$ mV, der mutierte HCN4^{R669Q}-Kanal bei $-84,5 (\pm 3,4)$ mV halb-maximal aktiviert ($\rightarrow$ 3.1.2). Wie kommt dieser Unterschied zustande? Dafür gibt es zwei mögliche Erklärungen: Zum einen könnte die Mutation die spannungsabhängige Aktivierung der Kanäle beeinflussen. Zum anderen könnte aber der Wildtypkanal schon unter basalen Bedingungen cAMP gebunden haben, was zu einer Verschiebung der Aktivierungskurve führt. Dafür spricht, dass heterolog exprimierte HCN2-Kanäle eine aktivitätsabhängige Regulation ihrer Kanalaktivität durch basale cAMP-Konzentrationen zeigen (Wang et al., 2002). Die Autoren postulierten eine sehr hohe Affinität der Kanäle für cAMP. Demnach wären HCN2- und möglicherweise auch HCN4-Kanäle immer mit cAMP teilweise besetzt. Will man abschätzen, welchen Einfluss cAMP auf die Funktion der HCN4-Kanäle hat, vergleicht man die Aktivierungseigenschaften des Wildtyp-HCN4-Kanals in Gegenwart von cAMP ($V_{1/2} = -55,6$ mV) mit denen des mutierten Kanals ohne cAMP ($V_{1/2} = -84,5$ mV) ($\rightarrow$ 3.2.1). Die Aktivierungskurve des Wildtypkanals wird durch cAMP um fast 30 mV zu positiveren Werten verschoben. Der Einfluss von cAMP auf die Kanalaktivität der heterolog exprimierten Kanäle ist also sehr groß. Wenn der Einfluss *in vivo* nur annähernd so groß ist, könnte dies erhebliche Auswirkungen auf die physiologische Funktion der mutierten HCN4^{R669Q}-Kanäle haben. Betrachtet man die Aktivierungseigenschaften der nativen I_f -Ströme in Kardiomyozyten aus Wildtypembryonen, so findet man ein $V_{1/2}$ von $-69,3$ mV ($\rightarrow$ 3.5.1). Die Spannungsabhängigkeit des Kanals ist also, im Vergleich zum heterolog exprimierten Wildtyp-HCN4-Kanal, nochmals um ca. 10 mV nach rechts verschoben. Hierfür gibt es eine Reihe von Erklärungen, angefangen von möglichen Interaktionspartnern oder akzessorischen Untereinheiten bis hin zu verschiedenen Phosphorylierungszuständen der HCN-Kanäle in diesen Zellen (Übersicht:

Kaupp & Seifert, 2001). Die einfachste mögliche Erklärung ist jedoch, dass in den Kardiomyozyten eine höhere basale cAMP-Konzentration vorliegt als in den Kulturzellen. In Kardiomyozyten der Ratte wurden Bereiche gefunden, so genannte Mikrodomänen, in denen die intrazelluläre cAMP-Konzentration relativ hoch zu sein scheint (Zaccolo & Pozzan, 2002). Wenn das auch in der Maus so ist, und die HCN-Kanäle sich in diesen Bereichen aufhalten, dann könnte man die vergleichsweise positive Aktivierungsspannung erklären. Das würde bedeuten, dass der Eingriff, den ich durch die Mutation der Bindestelle vorgenommen habe, stärker ist als erwartet. Vermutlich ist die Aktivierungskurve der Mutante so weit nach links verschoben, dass kein wesentlicher Beitrag zur diastolischen Depolarisation geleistet werden kann, die Schrittmacherfunktion fehlt und die homozygoten Embryonen sterben. Eine abschließende Aussage zum Einfluss von cAMP auf die HCN4-Kanalfunktion *in vivo* sollten die elektrophysiologischen Messungen der Kardiomyozyten aus heterozygoten und homozygoten Embryonen mit und ohne cAMP ermöglichen.

4.2 Warum unterscheidet sich der kardiale Phänotyp embryonal und adult?

Im adulten Tier kann der Einfluss des R669Q-Austausches im HCN4-Kanal nur bei heterozygoten Tieren untersucht werden. Vergleicht man diesen Genotyp embryonal und adult, stellt man fest, dass der kardiale Phänotyp verschieden ist. Während die basale Herzschlagfrequenz der heterozygoten Embryonen signifikant gegenüber den Wildtypembryonen reduziert ist, ist die Frequenz der adulten Tiere vergleichbar. Die Erhöhung der Herzschlagfrequenz bei β -adrenerger Stimulation ist im adulten Tier ebenfalls nicht beeinträchtigt, wohingegen die Zunahme der Herzschlagfrequenz in den heterozygoten Embryonen deutlich geringer ist als in den Wildtypembryonen. Der Unterschied zwischen heterozygoten Embryonen und heterozygoten adulten Tieren könnte verschiedene Ursachen haben: 1. Der Einfluss der Mutation auf die Funktion des HCN4-Kanals wird in der Entwicklung kompensiert. 2. Die Funktion von HCN4 im Herzen ändert sich in der Entwicklung.

MacLean und Kollegen (2005) konnten zeigen, dass der I_h -Strom in Crustaceen kompensatorisch wirken kann. In rhythmisch aktiven Neuronen des stomatogastrischen Ganglions von Langusten wird die Frequenz der Oszillationen wesentlich durch einen transienten K^+ -Ausstrom (I_A) bestimmt. Dem I_A -Strom und der von ihm ausgehenden Hyperpolarisation wirkt u.a. der I_h mit einer Depolarisation entgegen. Der I_A -Strom im

stomatogastrischen Ganglion wird durch K^+ -Kanäle getragen, die durch das Shal-Gen kodiert werden. Reguliert man den I_A durch Injektion der Shal-RNA in den Neuronen hoch, ändert sich die rhythmische Aktivität überraschenderweise nicht. Die Zunahme des I_A korreliert mit einer Zunahme des I_h (MacLean et al., 2005). Der I_h kompensiert den I_A , so dass sich die rhythmische Aktivität der Neurone nicht ändert. Demnach wäre auch denkbar, dass der I_h durch einen anderen Ionenstrom kompensiert wird.

Von Ca^{2+} -Kanälen ist bekannt, dass der Ausfall einer Isoform durch eine andere Isoform ausgeglichen werden kann (Xu et al., 2003). Die Mutation im HCN4-Kanal könnte somit durch eine andere HCN-Kanalisoform ausgeglichen werden. Was ist über die Expression und Funktion der anderen HCN-Isoformen im Herzen bekannt? HCN4 ist das dominante HCN-Transkript im Sinusknoten. HCN1 und HCN2 kommen dort nur in geringen Mengen vor. In den Purkinje-Fasern des Reizleitungssystems lässt sich neben HCN4 auch HCN1 nachweisen, im Ventrikel findet man v.a. HCN2. (Shi et al., 1999; Moosmang et al., 2001). Die Proteinverteilung der HCN-Kanalisoformen im Herzen wurde nur für HCN4 untersucht. Der Kanal konnte im Sinusknoten, im AV-Knoten und in der Herzwand nachgewiesen werden (Herrmann, 2004). Um die physiologische Bedeutung der einzelnen Isoformen zu untersuchen, wurden Isoform-spezifischen *Knock-out* Mauslinien erzeugt. Während HCN1 und HCN3 *Knock-out* Mäuse keine veränderte Herzfunktion zeigen (Nolan et al., 2003; persönliche Mitteilung Martin Biel), weisen HCN2 *Knock-out* Mäuse einen ausgeprägten kardialen Phänotyp auf (Ludwig et al., 2003). Sie zeigen sowohl im telemetrischen EKG als auch am isolierten Herzen eine Sinusknotenarrhythmie. Unter Belastung bzw. während der Perfusion mit Isoproterenol schlagen die Herzen jedoch wieder regelmäßig. HCN2 scheint demnach an der basalen Rhythmusbildung bei geringem Sympathikustonus beteiligt zu sein. Ob eine HCN-Isoform, die bereits eine Funktion im Herzen ausübt oder eine Isoform, die *in vivo* keine Funktion im Herzen zu haben scheint, den Einfluss der Mutation im HCN4-Kanal kompensieren könnte, ist schwierig zu beantworten. Die elektrophysiologische Analyse von Sinusknotenzellen adulter, heterozygoter ($HCN4^{+/R669Q}$) Tiere könnte klären, welche Eigenschaften des I_f geändert sind und/oder auch andere Ionenströme in den $HCN4^{+/R669Q}$ -Tieren betroffen sind.

Eine andere Erklärung für den unterschiedlichen kardialen Phänotyp bei heterozygoten Embryonen und adulten Tieren könnte sein, dass sich die HCN4-Funktion entwicklungsabhängig ändert. Der Verlust der cAMP-Bindefähigkeit des HCN4-Kanals könnte sich im adulten Tier anders auswirken als in Embryonen. Gibt es Hinweise für diese These? Während der Embryonalentwicklung ändert sich die Expressionsverteilung des

HCN4-Kanals in der Maus (Garcia-Frigola, 2003). In der frühen Entwicklung (E7,5-8,5) ist HCN4 gleichmäßig im Herzen verteilt, während im weiteren Verlauf der Expressionsbereich immer weiter eingeschränkt wird. Schließlich ist HCN4 nur noch im Sinus venosus nachzuweisen (Garcia-Frigola et al., 2003). Im adulten Tier ist HCN4 vor allem im Sinusknoten exprimiert, jedoch ist die Expressionsstärke niedriger als in den Embryonen. Im Verlauf der Entwicklung ändert sich also sowohl die Lokalisation als auch die Expressionsstärke des HCN4-Kanals im Herzen. Parallel dazu ändert sich auch der I_f -Strom in Kardiomyozyten. Während in der frühen Entwicklung (E10,5) die Amplitude des I_f -Stroms in Kardiomyozyten groß ist, nimmt sie ab Tag E12,5 stetig ab (Song et al., 2002). Nach der Geburt ist die Amplitude des I_f sogar um mehr als 80% reduziert (Yasui et al., 2001). Diese Beobachtungen korrelieren mit den Ergebnissen der Expressionsanalyse: Ist HCN4 stark exprimiert, ist die Amplitude des I_f groß. Nimmt die Expression des HCN4-Kanals ab, verringert sich die Amplitude des I_f . In der frühen Embryonalentwicklung scheint HCN4 also eine besonders wichtige Funktion zu haben. Der Tod der homozygoten ($HCN4^{R669Q/R669Q}$) Embryonen tritt unmittelbar nach dem Zeitpunkt ein, an dem die HCN4-Expression und die Amplitude des I_f am größten sind. Die Abnahme der HCN4-Expression und der Stromamplitude könnte darauf hindeuten, dass HCN4 bei adulten Tieren für die Funktion des Herzen weniger wichtig ist.

Wie könnte aber die HCN4-Funktion im adulten Tier aussehen? Die Ergebnisse meiner Arbeit deuten darauf hin, dass HCN4 nicht an der Rhythmusbildung und ihrer Regulation, sondern eher an der Erregungsleitung beteiligt ist. Eine Verlängerung der PQ-Strecke im EKG weist auf einen AV-Block 1. Grades hin. Die Überleitung vom AV-Knoten zu den Ventrikeln ist gestört aber nicht unterbrochen. Am isolierten Herzen treten spontane Pausen bzw. Blockaden der Erregungsüberleitung vom Sinusknoten zum AV-Knoten (Sinusknotenblock) auf. Auch andere Arbeiten deuten darauf hin, dass HCN4 in der adulten Maus für die Rhythmusbildung möglicherweise nicht entscheidend ist (Hermanns 2004). Induzierbare *Knock-out* Mauslinien ermöglichen, im adulten Tier den Zeitpunkt zu bestimmen, an dem das Gen ausgeschaltet werden soll. In Mäusen, in denen das HCN4-Gen durch Injektion von Tamoxifen deletiert werden kann, ist die HCN4-Expression nach Injektion im adulten Tier im Herzen um 90% reduziert. Die Tiere weisen im telemetrischen EKG jedoch keinen Unterschied zu Wildtyptieren auf. Die Reduktion der HCN4-Expression hat keinen Einfluss auf die Herzrhythmusbildung. Genauere Analysen zur Erregungsleitung liegen bis jetzt nicht vor.

Bei Menschen scheint HCN4 hingegen entscheidend für die Schrittmacherfunktion zu sein. Milanesi und Kollegen (2006) identifizierten eine Mutation im HCN4-Kanal, die in Trägern

der Mutation eine Sinusbradykardie, d.h. einen verringerten Sinusrhythmus hervorruft. Die Mutation befindet sich in der cAMP-Bindestelle (S672R) und wird autosomal dominant vererbt. Sie beeinflusst nicht die Bindung von cAMP an den Kanal, sondern die spannungsabhängige Aktivierung. Der mutierte HCN4^{S672R}-Kanal öffnet erst bei negativeren Membranspannungen als der Wildtypkanal. Schulze-Bahr und Kollegen (2003) stellten bei einer Patientin fest, dass im HCN4-Gen eine Base fehlt, was zu einer Leserasterverschiebung führt. Dadurch wird das HCN4-Kanalprotein ab Aminosäure 573 deletiert. Der trunkierte HCN4-Kanal besteht damit nur aus den Transmembrandomänen S1-S6. Die cAMP-Bindestelle sowie der C-Terminus fehlen. Die Patientin wies, ähnlich zu dem oben genannten Krankheitsbild, eine deutliche Bradykardie von < 60 Schläge/min auf. Der heterolog exprimierte, trunkierte Kanal öffnet spannungsabhängig, reagiert jedoch auf eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration nicht mit einer Zunahme des I_f bzw. mit einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit. Des Weiteren fanden Ueda und Kollegen (2004) in Patienten mit einer Sinusknotendysfunktion eine weitere Mutation im HCN4-Kanal. In diesem Fall ist in der „Linker-Region“ zwischen S6 und der cAMP-Bindestelle eine Aminosäure ausgetauscht (D553N). Die heterologe Expression der Kanalmutante zeigte, dass sie einen dominant negativen Einfluss auf den Transport des Kanals in die Plasmamembran hat. Heterooligomere Kanäle aus mutierten Untereinheiten und Wildtypuntereinheiten gelangen zwar teilweise in die Plasmamembran, jedoch ist die Stromamplitude gegenüber den Wildtypkanälen stark verringert.

Alle hier vorgestellten Mutationen im HCN4-Kanal führen also zu einer Beeinträchtigung des Herzrhythmus im Menschen. Wie ist der physiologische Unterschied zwischen Mensch und Maus zu erklären? Die Herzschlagfrequenz der Maus liegt deutlich über der des Menschen. Die durchschnittliche Herzschlagfrequenz der Maus beträgt 450-550 Schläge/min, die des Menschen 60-90 Schläge/min. Es ist nicht bekannt, welche Ionenströme dazu beitragen, dass Herzen von Mäusen so viel schneller schlagen. Denkbar wäre, dass HCN4 als Schrittmacher bei niedrigen Herzschlagfrequenzen fungiert, wie sie beim Menschen oder auch in der Embryonalentwicklung der Maus auftreten. Bei höheren Herzschlagfrequenzen (adulte Mäuse) reicht die Schrittmacherfunktion von HCN4 möglicherweise nicht mehr aus. Andere Komponenten müssten dann diese Aufgabe übernehmen. Hier könnten die Ryanodinrezeptoren eine Rolle spielen. Ich konnte in meiner Arbeit zeigen, dass embryonal HCN4 das Zielprotein ist, das die Erhöhung der Herzschlagfrequenz bei β -adrenerger Stimulation vermittelt. Spontane Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, Ca^{2+} -Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum über Ryanodinrezeptoren und die daran

anschließende Aktivierung des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers scheinen an der Erhöhung der embryonalen Herzschlagfrequenz nicht beteiligt zu sein. Im adulten Tier könnten dieser Signalweg jedoch die Herzschlagfrequenz bestimmen und für den Frequenzunterschied zwischen Mensch und Maus verantwortlich sein.

4.3 Möglichkeiten zur Analyse der cAMP-Modulation von HCN4 im adulten Tier

In der vorliegenden Arbeit habe ich mich ausschließlich auf die Analyse der Herzfunktion, vor allem in der Embryonalentwicklung, konzentriert. Es wäre jedoch sehr interessant, die Herz- und Hirnfunktion der verschiedenen Genotypen auch im adulten Tier untersuchen zu können. Dazu müsste man die homozygoten Embryonen während der Embryonalentwicklung „retten“. Welche Möglichkeiten gibt es, den Tod der homozygoten Embryonen zu verhindern? Die Embryonen sterben vermutlich, weil in einer entscheidenden Phase der Embryonalentwicklung die Herzschlagfrequenz für die Versorgung des Embryos nicht mehr ausreicht. Einen ähnlichen Phänotyp beobachtete man bei einem anderem Mausmodell, der Tyrosin-Hydroxylase *Knock-out* Maus (Portbury et al., 2003): Wird die Synthese von Catecholaminen durch die Deletion des Tyrosin-Hydroxylasegens (TH-Gens) in der Maus ausgeschaltet, sterben 95% der *Knock-out* Embryonen bereits vor der Geburt. Für die überlebenden Embryonen reicht vermutlich die Catecholaminkonzentration im Blut der Mutter aus, um sie ausreichend zu versorgen. Die basale Herzschlagfrequenz der Wildtypembryonen und der *Knock-out*-Embryonen ist nicht signifikant verschieden. Reduziert man aber die Sauerstoffversorgung (Hypoxie), sinkt die Herzschlagfrequenz der *Knock-out* Embryonen stärker als die der Wildtypembryonen. Stimuliert man die Herzen beider Genotypen unter Hypoxie mit Isoproterenol, ist die Herzschlagfrequenz der *Knock-out* Embryonen vergleichbar mit der der Wildtypembryonen. Die Embryonen leiden während ihrer Entwicklung im Mutterleib immer wieder kurzzeitig unter Hypoxie, ausgelöst durch rhythmische Kontraktionen des Uterus (Van der Weyden et al., 1989). Vermutlich wird während dieser Phasen Adrenalin bzw. Noradrenalin ausgeschüttet und dadurch die Herzschlagfrequenz erhöht. Fehlt diese Regulation, sterben die Embryonen im Mutterleib. Interessanterweise ließen sich die homozygoten Embryonen *in utero* retten, indem man der Mutter während der Schwangerschaft Isoproterenol ins Trinkwasser gab. Isoproterenol gelangt mit dem Blut der Mutter über die Plazentaschranke in den Blutkreislauf der Embryonen. Die daraus resultierende dauerhafte Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren

führt vermutlich zu einer erhöhten basalen Herzschlagfrequenz der Embryonen und sichert dadurch das Überleben der homozygoten Embryonen. Das Konzept, die basale Herzschlagfrequenz dauerhaft zu erhöhen, könnte vielleicht auch bei der von mir vorgestellten Mauslinie ermöglichen, die homozygoten Embryonen zu retten. Die Erhöhung müsste jedoch über einen, von der β -adrenergen Signalkaskade unabhängigen, Signalweg gesteuert werden, da HCN4 das Zielprotein in der β -adrenergen Signalkaskade im embryonalen Herzen ist. Gibt es einen solchen alternativen Signalweg? Eine Schilddrüsenüberfunktion (Hyperthyreose) führt in fast allen Fällen zu einer deutlichen Erhöhung der Herzschlagfrequenz. Verantwortlich dafür ist die erhöhte Konzentration der Schilddrüsenhormone Triiodthyronin (T3) und Thyroxin (T4) im Blut. T3 ist das wirksame Hormon und wird aus T4 gebildet. Es beeinflusst physiologische Prozesse in dem es die Gentranskription reguliert (Yen, 2001). Verschiedene Proteine, wie Ionenkanäle und Rezeptoren, die an der Rhythmusbildung im Herzen beteiligt sind, können durch T3 positiv oder negativ reguliert werden. Man fand heraus, dass in Mäusen regelmäßige Injektionen von T3 bereits nach 2 Tagen zu einer Erhöhung der Herzschlagfrequenz führen (Johansson & Thoren, 1997). Die Erhöhung verläuft unabhängig von der β -adrenergen Signalkaskade (Bachman et al., 2004): Schaltet man in der Maus alle drei β -adrenergen Rezeptorisoformen aus, so ist die Erhöhung der Herzschlagfrequenz nach Injektion von T3 vergleichbar mit der der Wildtyptiere. Diesen Signalweg könnte man nutzen, um die homozygoten (HCN4^{R669Q/R669Q}) Embryonen zu retten. Injiziert man den trächtigen Weibchen während der Schwangerschaft T3, sollte dies über den Blutkreislauf in die Embryonen transportiert werden. Die Herzschlagfrequenz der Mutter und der Embryonen sollte sich dadurch erhöhen und die homozygoten Embryonen überleben. Dadurch könnte geklärt werden, welche Rolle HCN4 im adulten Tier in der Rhythmusbildung im Herzen und im Gehirn spielt.

5. Literaturverzeichnis

- Accili, E.A., Robinson, R.B., DiFrancesco, D. (1997): Differential control of the hyperpolarization-activated current (i_f) by cAMP gating and phosphatase inhibition in rabbit sino-atrial node myocytes. *J. Physiol.* **500**, 643-51.
- Bachman, E.S., Hampton, T.G., Dhillon, H., Amende, I., Wang, J., Morgan, J.P., Hollenberg, A.N. (2004): The metabolic and cardiovascular effects of hyperthyroidism are largely independent of beta-adrenergic stimulation. *Endocrinology* **145**, 2767-74.
- Bairoch, A. (1991): PCGENE, nucleic acid protein analysis software system, Release 6.7.
- Bal, T. & McCormick, D.A. (1996): What stops synchronized thalamocortical oscillations? *Neuron* **17**, 297-308.
- Bogdanov, K.Y., Vinogradova, T.M., Lakatta, E.G. (2001): Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and Na(+)-Ca(2+) exchanger: molecular partners in pacemaker regulation. *Circ. Res.* **88**, 1254-8.
- Biel, M., Schneider, A., Wahl, C. (2002): Cardiac HCN channels: Structure, function and modulation. *Trends Cardiovasc. Med.* **12**, 206-13.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-23.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H., Robertson, E. (1984): Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* **309**, 255-6.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., Short, J.M. (1987): XL1-blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 536-78.
- Chen, C. & Okayama, H. (1987): High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molecular and Cellular Biology* **7**, 2745-52.
- Chen, J., Mitcheson, J.S., Tristani-Firouzi, M., Lin, M., Sanguinetti, M.C. (2001): The S4-S5 linker couples voltage sensing and activation of pacemaker channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 11277-82.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-9.
- Clapham, D.E. (1998): Not so funny anymore: pacing channels are cloned. *Neuron* **21**, 5-7.
- Collins, F.S. (1992): Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* **256**, 774-9.
- DiFrancesco D. (1985): The cardiac hyperpolarizing-activated current, i_f . Origins and developments. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **46**, 163-183.

- DiFrancesco, D., Tortora, P. (1991): Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* **351**, 145-47.
- DiFrancesco, D. (1993): Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu. Rev. Physiol.* **55**, 455-72.
- DiFrancesco D. (1995a): The pacemaker current (I_f) plays an important role in regulating SA node pacemaker activity. *Cardiovasc. Res.* **30**, 307-8.
- DiFrancesco D. (1995b): The onset and autonomic regulation of cardiac pacemaker activity: relevance of the f current. *Cardiovasc. Res.* **29**, 449-56.
- Eckert, R., Randall, D., Burggren, W., French, K. (2000): Tierphysiologie. *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart.
- Edman, A., Gestrelus, S., Grampp, W. (1987): Current activation by membrane hyperpolarization in the slowly adapting lobster stretch receptor neurone. *J. Physiol.* **384**, 671-90.
- Evans, M.J. and Kaufmann, M.H. (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-156.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analyt. Biochem.* **132**, 6-13.
- Garcia-Frigola, C., Shi, Y., Evans, SM. (2003): Expression of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel HCN4 during mouse heart development. *Gene Expr. Patterns* **3**, 777-83.
- Gossler, A., Doetschman, T., Korn, R., Serfling, E., Kemler, R. (1986): Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **83**, 9065-9.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J. (1981): Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* **391**, 85-100.
- Herrmann, S. (2004): Analyse und Funktion des Hyperpolarisations-aktivierten Schrittmacherkanals HCN4. Dissertation, Fakultät Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Herry, D.M. & Conti, F. (1990): A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices. *Trends Gen.* **6**, 173.
- Hille, B. (2001): Ionic channels of excitable membranes. 3rd edition, *Sinauer Associates, Inc. Sunderland*, MA.
- Hogan, B., Costantini, F., Lacy, E. (1986): Manipulating the mouse embryo. *CSH Laboratory*.

- Ishii, T.M., Takano, M., Xie, L.H., Noma, A., Ohmori, H. (1999): Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J. Biol. Chem.* **274**, 12835-9.
- Johansson, C., Thoren, P. (1997): The effects of triiodothyronine (T3) on heart rate, temperature and ECG measured with telemetry in freely moving mice. *Acta Physiol. Scand.* **160**, 133-8.
- Joyner, A. (1993): Gene targeting - a practical approach. *IRL Press*, Oxford.
- Kaupp, U.B. & Seifert, R. (2001): Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 235-57.
- Kim, U., Bal, T., McCormick, D.A. (1995): Spindle waves are propagating synchronized oscillations in the ferret LGNd in vitro. *J. Neurophysiol.* **74**, 1301-23.
- Königter, A. (2002): Genetische Inaktivierung des hyperpolarisations-aktivierten Ionenkanals HCN4. Dissertation, Forschungszentrum Jülich, Institut für Biologische Informationsverarbeitung 1.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-85.
- Ludwig, A., Zong, X., Jeglitsch, M., Hofmann, F., Biel, M. (1998): A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* **393**, 587-91.
- Ludwig, A., Zong, X., Stieber, J., Hullin, R., Hofmann, F. et al. (1999): Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J.* **18**, 2323-29.
- Ludwig, A., Budde, T., Stieber, J., Moosmang, S., Wahl, C. et al. (2003): Absence epilepsy sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *EMBO J.* **22**, 216-224.
- Lüthi, A. & McCormick, D.A. (1998): H-current: properties of a neuronal and network pacemaker. *Neuron* **21**, 9-12.
- Lüthi, A., McCormick, D.A. (1999): Modulation of a pacemaker current through Ca(2+)-induced stimulation of cAMP production. *Nat. Neurosci.* **2**, 634-41.
- MacLean, J.N., Zhang, Y., Goeritz, M.L., Casey, R., Oliva, R., Guckenheimer, J., Harris-Warrick, R.M. (2005): Activity-independent coregulation of IA and Ih in rhythmically active neurons. *J. Neurophysiol.* **94**, 3601-17.
- Mandel, M. & Higa, A. (1970): Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159-162.
- Martin, G.R. (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7634-7638.

- McCormick, D.A. & Pape, H.C. (1990): Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurons. *J. Physiol.* **431**, 291-318.
- Meinkoth, J. & Wahl, G. (1984): Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Analyt. Biochem.* **138**, 267-284.
- Milanesi, R., Baruscotti, M., Gneccchi-Ruscone, T., DiFrancesco, D. (2006): Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. *N. Engl. J. Med.* **354**, 151-7.
- Moosmang, S., Biel, M., Hofmann, F., Ludwig, A. (1999): Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol. Chem.* **380**, 975-80.
- Moosmang, S., Stieber, J., Zong, X., Biel, M., Hofmann, F., Ludwig, A. (2001): Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur. J. Biochem.* **268**, 1646-52.
- Müller, W., Kuhn, R., Rajewsky, K. (1991): Major histocompatibility complex class II hyperexpression on B cells in interleukin 4-transgenic mice does not lead to B cell proliferation and hypergammaglobulinemia. *Eur. J. Immunol.* **21**, 921-5.
- Mullis, K.B., Faraona, F.A., Schar, S., Saiki, R., Horn, G., Ehrlich, H. (1986): Specific amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-73.
- Nolan, M.F., Malleret, G., Lee, K.H., Gibbs, E., Dudman, J.T., Santoro, B., Yin, D., Thompson, R.F., Siegelbaum, S.A., Kandel, E.R., Morozov, A. (2003): The hyperpolarization-activated HCN1 channel is important for motor learning and neuronal integration by cerebellar Purkinje cells. *Cell* **115**, 551-64.
- Pfeiffer, H.K. (2006): Der Einfluss von cAMP auf die Aktivität der Hyperpolarisationsaktivierten und zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen. Diplomarbeit, FZ Jülich, Institut für Biologische Informationsverarbeitung 1.
- Plasek, J., Sigler, K. (1996): Slow fluorescent indicators of membrane potential: a survey of different approaches to probe response analysis. *J. Photochem. Photobiol B.* **33**, 101-24.
- Portbury, A.L., Chandra, R., Groelle, M., McMillian, M.K., Elias, A., Herlong, J.R., Rios, M., Roffler-Tarlov, S., Chikaraishi, D.M. (2003): Catecholamines act via a beta-adrenergic receptor to maintain fetal heart rate and survival. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **284**, H2069-77.
- Proenza, C., Tran, N., Angoli, D., Zahynacz, K., Balcar, P., Accili, E. (2002): 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.* **277**, 29634-42.
- Rigg, L., Bronagh, M.H., Yi, C., Terrar, D.A. (2000): Localisation and functional significance of ryanodine receptors during β -adrenoceptor stimulation in the guinea-pig sino-atrial node. *Cardiovasc Res.* **57**, 497-504.

- Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M., Evans, M. (1986): Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* **323**, 445-8.
- Robinson, R.B. & Siegelbaum, S.A. (2003): Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 453-80.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (2001): Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Santoro, B., Grant, S.G., Bartsch, D., Kandel, E.R. (1997): 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. USA* **94**, 14815-20.
- Santoro, B., Liu, D.T., Yao, H., Bartsch, D., Kandel, E.R. et al. (1998): Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* **93**, 717-29.
- Santoro, B., Chen, S., Lüthi, A., Pavlidis, P., Shumyatsky, G.P., Tibbs, G.R., Siegelbaum, S.A. (2000): Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J. Neurosci.* **20**, 5264-75.
- Sanger, F., Grant, S.G.N., Bartsch, D., Kandel, E.R. (1997): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-67.
- Schmidt, R.F., Lang, G., Thews, F. (2004): Physiologie des Menschen. *Springer-Verlag*, Berlin.
- Scholten, A. (2001): Charakterisierung von hyperpolarisations-aktivierten und zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen (HCN-Kanäle) in der Retina und im Gehirn der Ratte . *Berichte des Forschungszentrums Jülich* **3936**.
- Schulze-Bahr, E., Neu, A., Friederich, P., Kaupp, U.B., Breithardt, G., Pongs, O., Isbrandt, D. (2003): Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J. Clin. Invest.* **111**, 1537-45.
- Seifert, R., Scholten, A., Gauss, R., Mincheva, A., Lichter, P., Kaupp, U.B. (1999): Molecular characterisation of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9391-96.
- Short, J.M., Fernandez, J.M., Sorge, J.A., Huse, W.D. (1988): λ ZAP: a bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucl. Acids Res.* **16**, 7583-600
- Shi, W., Wymore, R., Yu, H. Wu, J., Wymore, R.T. et al. (1999): Distribution an prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Cir. Res. (Online)* **85**, e1-e6.
- Shin, K.S., Rothberg, B.S., Yellen, G. (2001): Blocker state dependence and trapping in hyperpolarization-activated cation channels: evidence for an intracellular activation gate. *J. Gen. Physiol.* **117**, 91-101.
- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., Rogers, D. (1988): Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**, 688-90.

- Song, G.L., Tang, M., Liu, C.J., Luo, H.Y., Liang, H.M., Hu, X.W., Xi, J.Y., Gao, L.L., Fleischmann, B., Hescheler, J. (2002): Developmental changes in functional expression and beta-adrenergic regulation of I(f) in the heart of mouse embryo. *Cell Res.* **12**, 385-94.
- Steriade, M., McCormick, D.A., Sejnowski, T.J. (1993): Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* **262**, 679-85.
- Stieber, J., Herrmann, S., Feil, S., Loster, J., Feil, R., Biel, M., Hofmann, F., Ludwig, A.. (2004): The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**, 15235-40.
- Strünker, T. (2005): Suche nach neuen Wirkstoffen für Hyperpolarisationsaktivierte und zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle. *Berichte des Forschungszentrum Jülich* **4192**.
- Thomas, K.R. & Capecchi, M.R. (1987): Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell.* **51**, 503-12.
- Tibbs, G.R., Liu, D.T., Leybold, B.G., Siegelbaum, S.A. (1998): A state-independent interaction between ligand and a conserved arginine residue in cyclic nucleotide-gated channels reveals a functional polarity of the cyclic nucleotide binding site. *J. Biol. Chem.* **273**, 4497-505.
- Torres, R.M., Kühn, R. (1997): Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting. *Oxford University Press*, Oxford.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-54.
- Ueda, K., Nakamura, K., Hayashi, T., Inagaki, N., Takahashi, M., Arimura, T., Morita, H., Higashiuesato, Y., Hirano, Y., Yasunami, M., Takishita, S., Yamashina, A., Ohe, T., Sunamori, M., Hiraoka, M., Kimura, A. (2004): Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia. *J. Biol. Chem.* **279**, 27194-8.
- van der Weyden, G.C., Taverne, M.A., Dieleman, S.J., Wurth, Y., Bevers, M.M., van Oord, H.A. (1989): Physiological aspects of pregnancy and parturition in dogs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **39**, 211-24.
- Vinogradova, T.M., Bogdanov, K.Y., Lakatta, E.G. (2002): beta-Adrenergic stimulation modulates ryanodine receptor Ca(2+) release during diastolic depolarization to accelerate pacemaker activity in rabbit sinoatrial nodal cells. *Circ. Res.* **90**, 73-9.
- Wang, J., Chen, S., Nolan, M.F., Siegelbaum, S.A. (2002): Activity-dependent regulation of HCN pacemaker channels by cyclic AMP: signaling through dynamic allosteric coupling. *Neuron* **36**, 451-61.
- Weber, I.T., Steitz, T.A., Bubis, J., Taylor, S.S. (1987): Predicted structures of cAMP binding domains of type I and II regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* **26**, 343-51.

Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., Gough, N.M. (1988): Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **336**, 684-7.

Xu, M., Welling, A., Paparisto, S., Hofmann, F., Klugbauer, N. (2003): Enhanced expression of L-type Cav1.3 calcium channels in murine embryonic hearts from Cav1.2-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **278**, 40837-41.

Yasui, K., Liu, W., Opthof, T., Kada, K., Lee, J.K., Kamiya, K., Kodama, I. (2001): I(f) current and spontaneous activity in mouse embryonic ventricular myocytes. *Circ. Res.* **88**, 536-42.

Yen, P.M. (2001): Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol. Rev.* **81**, 1097-142.

Zaccolo, M. & Pozzan, T. (2002): Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science* **295**, 1711-15.

6. Anhang

6.1 DNA- und Proteinsequenz des HCN4-Kanals aus der Maus

In der oberen Reihe sind die Positionen der einzelnen Basen angegeben. In der mittleren Reihe befindet sich die DNA-Sequenz des mHCN4-Gens, beginnend mit dem Startkodon ATG. In der unteren Reihe ist die mHCN4 Proteinsequenz angegeben. In rot ist der Aminosäureaustausch gekennzeichnet. Die cAMP-Bindestelle ist grau unterlegt.

10	20	30	40	50	60	70
ATGGACAAGCTGCCGCCGTCCATGCGCAAGCGGCTCTACAGCCTTCCGCAGCAGGTGGGGGCCAAGGCGTGGATC						
M	D	K	L	P	P	S
80	90	100	110	120	130	140
ATGGACGAGGAAGAGGATGGTGAGGAAGAAGGGGCCGGGGGCCAGGACCCCAGCCGAAGGAGCATCCGGCTG						
M	D	E	E	E	D	G
160	170	180	190	200	210	220
CGGCCGCTGCCCTCGCCCTCTCCCTCGGTGGCTGCGGGCTGCTCGGAGTCCCGGGGTGCGGCCCTCGGGGCGACA						
R	P	L	P	S	P	S
230	240	250	260	270	280	290
GAGAGCGAGGGGCCGGGCCGAGCGCCGGCAAGTCCAGCACCAACGGTGACTGCAGGCGCTTCCGCGGGAGTCTG						
E	S	E	G	P	G	R
310	320	330	340	350	360	370
GCCTCGCTGGGCAGCCGGGGCGGCGGCAGTGGTGAGCAGGGGGCGGCAGCAGTCTCGGGCACCTGCATGACTCC						
A	S	L	G	S	R	G
380	390	400	410	420	430	440
GCGGAGGAACGGCGGCTCATCGCCGCTGAGGGCGATGCGTCCCCCGGCGAGGACAGGACGCCCCGGGCCTGGCG						
A	E	E	R	R	L	I
460	470	480	490	500	510	520
ACCGAACCCGAGCGCCCGGCCACCGCGGCACAACCCGCAGCCTCGCCGCCCGCCAGCAGCCGCGCAGCCGGCC						
T	E	P	E	R	P	A
530	540	550	560	570	580	590
TCTGCCTCCTGCGAGCAGCCCTCGGCGGACACCGCTATCAAAGTGGAGGGAGGCGCGGCCGCCAGCGACCAGATC						
S	A	S	C	E	Q	P
610	620	630	640	650	660	670
CTCCCCGAGGCCGAGGTGCGCCTGGGCCAGAGCGGCTTCATGCAGCGCCAGTTCGGTGCCATGCTGCAACCTGGG						
L	P	E	A	E	V	R

680	690	700	710	720	730	740	750
GTCAACAAATTCTCCCTAAGGATGTTTCGGCAGCCAGAAAAGCGGTGGAGCGCGAGCAGGAGAGGGTTAAGTCAGCA							
V N K F S L R M F G S Q K A V E R E Q E R V K S A							
760	770	780	790	800	810	820	
GGGTTTTGGATTATCCACCCCTACAGTGACTTCAGATTTTACTGGGACCTGACGATGCTGTTGCTGATGGTGGGG							
G F W I I H P Y S D F R F Y W D L T M L L L M V G							
830	840	850	860	870	880	890	900
AATCTGATCATCATACCCGTGGGCATCACCTTCTTCAAGGATGAGAACACCACACCCTGGATCGTCTTCAATGTG							
N L I I I P V G I T F F K D E N T T P W I V F N V							
910	920	930	940	950	960	970	
GTGTCAGACACATTCTTCCTCATTGACTTGGTCCTCAACTTCCGCACGGGGATCGTGGTGGAGGACAACACAGAA							
V S D T F F L I D L V L N F R T G I V V E D N T E							
980	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050
ATCATCCTTGACCCGCAGAGGATCAAGATGAAGTACCTGAAAAGCTGGTTTGTGGTAGATTTTCATCTCCTCCATC							
I I L D P Q R I K M K Y L K S W F V V D F I S S I							
1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	
CCTGTGCACTACATCTTCCTTATAGTGGAGACTCGCATTGACTCGGAGGTCTACAAAACCGCTAGGGCTCTGCGC							
P V D Y I F L I V E T R I D S E V Y K T A R A L R							
1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
ATTGTCCGTTTCACTAAGATCCTCAGCCTCCTGCGCCTCTTGAGGCTTTCCCGCCTCATTCGATACATTCATCAG							
I V R F T K I L S L L R L L R L S R L I R Y I H Q							
1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	
TGGGAAGAGATCTTCCACATGACCTATGACCTGGCCAGCGCCGTGGTACGCATCGTGAACCTCATTGGCATGATG							
W E E I F H M T Y D L A S A V V R I V N L I G M M							
1280	1290	1300	1310	1320	1330	1340	1350
CTTCTGCTGTGTCACTGGGATGGCTGCCTGCAGTTCCTAGTGCCCATGCTGCAGGACTTCCCCATGACTGCTGG							
L L L C H W D G C L Q F L V P M L Q D F P H D C W							
1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	
GTGTCCATCAATGGCATGGTGAATAACTCCTGGGGGAAGCAGTATTCTACGCCCTCTTCAAGGCCATGAGCCAC							
V S I N G M V N N S W G K Q Y S Y A L F K A M S H							
1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500
ATGCTGTGCATTGGGTATGGACGGCAGGCACCCGTAGGCATGTCTGACGTCTGGCTCACCATGCTCAGCATGATC							
M L C I G Y G R Q A P V G M S D V W L T M L S M I							
1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	
GTGGGGGCCACCTGCTATGCCATGTTTCATCGGCCACGCCACTGCCCTCATCCAGTCGCTAGACTCCTCCCGGCGC							
V G A T C Y A M F I G H A T A L I Q S L D S S R R							

1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650
| | | | | | | |
CAGTACCAGGAGAAGTATAAACAGGTGGAGCAGTACATGTCTTCCACAAGCTCCCGCCTGACACCCGACAGCGC
Q Y Q E K Y K Q V E Q Y M S F H K L P P D T R Q R

1660 1670 1680 1690 1700 1710 1720
| | | | | | | |
ATCCATGACTACTATGAACACCGCTACCAAGGCAAGATGTTTGATGAGGAAAGCATCCTGGGTGAGCTGAGTGAG
I H D Y Y E H R Y Q G K M F D E E S I L G E L S E

1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
| | | | | | | |
CCACTTCGAGAGGAGATCATCAACTTTAACTGCCGAAAGCTGGTGGCATCCATGCCACTGTTTGCCAAACGCAGAT
P L R E E I I N F N C R K L V A S M P L F A N A D

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870
| | | | | | | |
CCCAACTTTGTGACATCCATGCTGACCAAGTTGCGTTTCGAGGTCTTCCAGCCTGGGGATTACATCATCCGCGAA
P N F V T S M L T K L R F E V F Q P G D Y I I R E

1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940 1950
| | | | | | | |
GGCACCATCGGCAAGAAGATGTACTTTATCCAGCACGGCGTGGTCAGCGTGCTCACTAAGGGCAACAAAGAGACC
G T I G K K M Y F I Q H G V V S V L T K G N K E T

1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020
| | | | | | | |
AAGCTGGCTGATGGCTCCTATTTTGGAGAGATCTGCTTGCTGACCCGGGGTCGGCGCACAGCCAGCGTCAGAGCG
K L A D G S Y F G E I C L L T R G R R T A S V R A

2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
| | | | | | | |
GATACTTATTGCCGCCTCTACTCACTGAGCGTGGACAACCTTCAATGAGGTGCTGGAGGAGTATCCCATGATGCGG
D T Y C R L Y S L S V D N F N E V L E E Y P M M R

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170
| | | | | | | |
AGGGCCTTCGAGACGGTTGCGCTGGACCGCCTGGACCGCATAGGCAAGAAGAACTCCATCCTCCTCCACAAGGTG
R A F E T V A L D R L D R I G K K N S I L L H K V

2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240 2250
| | | | | | | |
CAGCAGACCTCAACTCAGGCGTCTTCAACTACCAAGAGAACGAGATCATCCAGCAGATCGTGCGGCATGACCGT
Q H D L N S G V F N Y Q E N E I I Q Q I V R H D R

2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320
| | | | | | | |
GAGATGGCCCACTGTGCTCACCGCGTCCAGGCTGCCGCCTCAGCCACCCCAACCCCCACGCCTGTTATATGGACC
E M A H C A H R V Q A A A S A T P T P T P V I W T

2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
| | | | | | | |
CCGCTGATCCAGGCGCCACTGCAGGCTGCTGCTGCTACTACTTCGGTGGCCATAGCCCTCACACACCACCCCGC
P L I Q A P L Q A A A A T T S V A I A L T H H P R

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470
| | | | | | | |
CTGCCCCGCCATCTTCCGGCCCCCTCCCGGACCTGGGCTGGGCAACCTTGGGGCTGGACAGACACCGAGGCAC
L P A A I F R P P P G P G L G N L G A G Q T P R H

2480	2490	2500	2510	2520	2530	2540	2550
CCAAGGAGGCTGCAGTCCTTGATCCCTTCAGCTCTGGGCTCTGCTTCACCCGCCAGCAGCCCCCTCACAGGTGGAC							
P R R L Q S L I P S A L G S A S P A S S P S Q V D							
2560	2570	2580	2590	2600	2610	2620	
ACACCGTCTTCATCCTCCTTCCACATCCAACAGCTGGCTGGATTCTCTGCACCTCCTGGATTGAGCCCTCTCCTG							
T P S S S S F H I Q Q L A G F S A P P G L S P L L							
2630	2640	2650	2660	2670	2680	2690	2700
CCCTCCTCTAGCTCTTCCCCACCTCCAGGAGCCTGCGGTTCCCCACAGCCCCCACACCTCCACCTCCACTGCC							
P S S S S S P P P G A C G S P P A P T P S T S T A							
2710	2720	2730	2740	2750	2760	2770	
GCCGCCGCCTCCACCACTGGGTTTCGGCCACTTTTACAAGGCGCTGGGTGGCTCCCTGTTCATCCTCTGACTCCCCG							
A A A S T T G F G H F H K A L G G S L S S S D S P							
2780	2790	2800	2810	2820	2830	2840	2850
CTGCTCACCCCACTGCAACCAGGCGCTCGCTCTCCACAGGCTGCCCAGCCACCACCCCACTGCCTGGGGCCCGA							
L L T P L Q P G A R S P Q A A Q P P P P L P G A R							
2860	2870	2880	2890	2900	2910	2920	
GGAGGTCTGGGACTCCTGGAGCACTTCTTGCCGCCCCCACCTCCTCCAGGTCACCATCATCCAGCCCTGGGCAG							
G G L G L L E H F L P P P P S S R S P S S S S P G Q							
2930	2940	2950	2960	2970	2980	2990	3000
CTGGGCCAGCCTCCTGGAGAGTTGTCCCTAGGTCTGGCAGCTGGTCCATCAAGTACACCAGAGACACCCCCACGG							
L G Q P P G E L S L G L A A G P S S T P E T P P R							
3010	3020	3030	3040	3050	3060	3070	
CCTGAGCGACCATCCTTCATGGCAGGGGCCTCTGGAGGGGCTTCTCCTGTAGCCTTTACCCCCGAGGAGGCCTC							
P E R P S F M A G A S G G A S P V A F T P R G G L							
3080	3090	3100	3110	3120	3130	3140	3150
AGTCCTCCGGGCCACAGCCCGGGGCCCCAAGAACTTTCCCGAGTGCCCCACCCCGGGCCTCTGGCTCCCATGGT							
S P P G H S P G P P R T F P S A P P R A S G S H G							
3160	3170	3180	3190	3200	3210	3220	
TCCCTGCTCCTGCCACCTGCATCCAGCCCTCCACCTCCCCAGGTCCACAGCGCAGGGGCACACCACCCCTCACC							
S L L L P P A S S P P P P Q V P Q R R G T P P L T							
3230	3240	3250	3260	3270	3280	3290	3300
CCTGGCCGCTCACACAGGACCTGAAGCTCATCTCAGCCTCTCAGCCAGCCCTCCCCAGGATGGGGCACAGACT							
P G R L T Q D L K L I S A S Q P A L P Q D G A Q T							
3310	3320	3330	3340	3350	3360	3370	
CTCCGCAGGGCCTCGCCTCACTCCTCAGGGGAGTCGGTGGCTGCCTTCTCACTCTACCCCAGAGCTGGGGGTGGC							
L R R A S P H S S G E S V A A F S L Y P R A G G G							

```

3380      3390      3400      3410      3420      3430      3440      3450
|         |         |         |         |         |         |         |
AGTGGGAGTAGTGGGGGCCTTGGGCCTCCTGGAAGGCCATATGGTGCCATCCCAGGCCAACATGTCACTTTGCCT
S  G  S  S  G  G  L  G  P  P  G  R  P  Y  G  A  I  P  G  Q  H  V  T  L  P

      3460      3470      3480      3490      3500      3510      3520
|         |         |         |         |         |         |
CGGAAGACATCCTCAGGTTCTTTGCCACCCCCACTTTCTTTGTTTGGGGCAAGAGCCGCTCTTCTGGAGGGCCC
R  K  T  S  S  G  S  L  P  P  P  L  S  L  F  G  A  R  A  A  S  S  G  G  P

3530      3540      3550      3560      3570      3580      3590      3600
|         |         |         |         |         |         |         |
CCTCTGACTACTGCTGCACCCCAGAGGGAACCTGGCGCTAGGTCTGAGCCAGTACGCTCCAAACTGCCGTCTAAT
P  L  T  T  A  A  P  Q  R  E  P  G  A  R  S  E  P  V  R  S  K  L  P  S  N

3603
|
TTA
L

```

6.2 Sequenz des Targeting-Vektor neofloxmHCN4^{R669Q}DT.

Die Nummern am Ende der Zeilen bezeichnen die jeweils letzte Basenpaarposition. Wichtige Bereiche des Targeting-Vektors sind farblich unterlegt (gelb: kurzer HCN4-Homologiebereich, türkis: loxP-Elemente, grau: langer HCN4-Homologiebereich)

```

CTTCAAGATTTTCCCTTATTTTATTCTTGGGTAAGTCTTGTGGATTTACCTAAAAATCTT - 60
GAAGTTCTAAAAGGGAATAAAATAAGAACCCATTTCAGAACACCTAAATGGATTTTGTAGAA

TCTGAAACGTCTTACCTCTCTACCCACCCCCACCCCATCTCTTCCCTAGGCGACTCCAG - 120
AGACTTTGCAGAATGGAGAGATGGGGTGGGGGTGGGGTAGAGAAGGGATCCGCTGAGGTC

CAGCCTTCTAAGTCCTGCCTGGTGTTCCTCCATCTGTTTATTGAGAGGCATTTCTCCAAA - 180
GTCGGAAGATTTCAGGACGGACCACAAGGAGGTAGACAAATAACTCTCCGTAAAGAGGTTT

ACACAACCTCCAAATGTGCAGGCTGCCTCTGTACACAATGGCTGGCCAGGAGGCTACTGTCC - 240
TGTGTTGAGGTTTACACGTCCGACGGAGACAGTGTTACCGACCGGTCTCCGATGACAGG

TGCCAGGCCTGTCTACTGGGCTGCTGTAAACAAACAAACAAACAAGCAAACAAAACACTCA - 300
ACGGTCCGGACAGATGACCCGACGACAATTTGTTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGAGT

GCCGGGAGAAGTGGTATATGCTTTGAGTCCCTGCAGAGGCAGAGGCAGAGAGGCAGAGAG - 360
CGGCCCTCTTACCATATACGAAACTCAGGGACGTCTCCGTCTCCGTCTCTCCGTCTCTC

GCAGAGAGGCAGAGAGGCAGAGAGGCAGAGAGGCAGAGAGGCAGAGAGGCAGAGAGGCAG - 420
CGTCTCTCCGTCTCTCCGTCTCTCCGTCTCTCCGTCTCTCCGTCTCTCCGTCTCTCCGTC

AGAGGCAGAGGCAGGCAGATCTTCATGAGCTGGAGGCAAGCCTGGTTTACAAAGTGAGTT - 480
TCTCCGTCTCCGTCCGTCTAGAAGTACTCGACCTCCGTTCGGACCAATGTTTCACTCAA

TCAGGCAGAACATCCAGGACTCTACACAGAGAAACCTGTGTCAAAAAACAAAAACAAA - 540
AGTCCGTCTTGTAGGTCCTGAGATGTGTCTCTTTGGGACACAGTTTTTTTGTGTTTGTGTT

```

ACCACCACCACCACCACCATCACCCTACCACCACCACCACCAAATCTCAAGGTCTCAGC TGGTGGTGGTGGTGGTGGTAGTGGTGATGGTGGTGGTGGTGGTTAGAGTTCCAGAGTCG	-	600
TGAGGCCATATCTATCTACAGACACAGCTTGCAAAGAGTCAGGTGTTCTCACTTGCACTT ACTCCGGTATAGATAGATGTCTGTGTGCGAACGTTTCTCAGTCCACAAGAGTGAACGTGAA	-	660
CCTGTATTGTGCCCCATTGCAGCTCTGTCTGTTACTGGGCCTATTTCTCCTGGCAGGAGT GGACATAACACGGGGTAACGTCGAGACAGACAATGACCCGGATAAAGAGGACCGTCCTCA	-	720
TGGTGACTCCAATATGCTTAGAGGAACTAGTTAACCCACCCCTCCTAGTCATTGTGGCT ACCACTGAGGTTATACGAATCTCCTTTGATCAATTGGGGTGGGAGGATCAGTAACACCGA	-	780
ATAGTCAGCCCTGTTCCCACTCATCTTTATAGTTTTGGGCATGGTGAGGACCAACCATGG TATCAGTCGGGACAAGGGTGAGTAGAAATATCAAAACCCGTACCACTCCTGGTTGGTACC	-	840
ATGGAAGCCTCCTTCCTTTTCTCCCTACCTCCATCACCCCGCAGAGCTGGGAGTCAGGGC TACCTTCGGAGGAAGGAAAAGAGGGATGGAGGTAGTGGGGCGTCTCGACCCTCAGTCCCG	-	900
CATTATTTTGGGTACCGTGTGCTTACATTACATTGAGCCCCAAGTTAGCTAAGAAAGCCCC GTAATAAAACCCATGGCACACGAATGTAATGTAACTCGGGTTCATCGATTCTTTTCGGGG	-	960
AGGGTTGGAGTGTGCCTCTGGCTACCAGCCTGGGGTGCCTGGAGGTGACTCCTGTCTCTC TCCCAACCTCACACGGAGACCGATGGTCGGACCCACGGACCTCCACTGAGGACAGAGAG	-	1020
TCCCCCGTCTCAGTATAAACAGGTGGAGCAGTACATGTCCTTCCACAAGCTCCCGCCTGA AGGGGGCAGAGTCATATTTGTCCACCTCGTCATGTACAGGAAGGTGTTTCGAGGGCGGACT	-	1080
CACCCGACAGCGCATCCATGACTACTATGAACACCGCTACCAAGGCAAGATGTTTGATGA GTGGGCTGTGCGGTAGGTACTGATGATACTTGTGGCGATGGTTCCGTTCTACAACTACT	-	1140
GGAAAGCATCCTGGGTGAGCTGAGTGAGCCACTTCGAGAGGTGAGCTGCAGACAGCCTGG CCTTTCGTAGGACCCACTCGACTCACTCGGTGAAGCTCTCCACTCGACGTCTGTTCGGACC	-	1200
GTGGGTGGTGGCGGTGCCAGGCCTCGCTGGCACACAGTTCCCTGACCTTCTTCTTTCTTT CACCCACCACCGCCACGGTCCGGAGCGACCGTGTGTCAAGGGACTGGAAGAAGAAAGAAA	-	1260
GTGTCCCAACCTTTGCTGTACGTGGAGCAGGAGATCATCAACTTTAACTGCCGAAAGCTG CACAGGGTTGGAAACGACATGCACCTCGTCCTCTAGTAGTTGAAATTGACGGCTTTTCGAC	-	1320
GTGGCATCCATGCCACTGTTTGCCAACGCAGATCCCAACTTTGTGACATCCATGCTGACC CACCGTAGGTACGGTGACAAACGGTTGCGTCTAGGGTTGAAACACTGTAGGTACGACTGG	-	1380
AAGTTGCGTTTTCGAGGTCTTCCAGCCTGGGGATTACATCATCCGCGAAGGCACCATCGGC TTCAACGCAAAGCTCCAGAAGGTCCGACCCCTAATGTAGTAGGCGCTTCCGTGGTAGCCG	-	1440
AAGAAGATGTACTTTATCCAGCACGGCGTGGTCAGCGTGCTCACTAAGGGCAACAAAGAG TTCTTCTACATGAAATAGGTGCGTCCCGCACACAGTGCACAGAGTATTCCTCGTTGTTTCTC	-	1500
ACCAAGCTGGCTGATGGCTCCTATTTTGGAGGTGAGACAGCCAGGGGGCCCCAGGAGAAC TGTTTCGACCGACTACCGAGGATAAAACCTCCACTCTGTGCGTCCCCCGGGGTCTCTTG	-	1560
ATGGGTGACTGGGAGCTAAGCTAGAGGGATACCTAAGATCAGAAGCTTGAGGGACCCCT TACCACTGACCCTCGATTGATCTCCCTATGGGATTCTAGTCTTCGAACCTCCCTGGGA	-	1620
TTATAGCCACAGCCTGGGCATCTGTGAGGCCAGTATAGGGGTGTCTGTCTGTGCAGTCTG AATATCGGTGTGCGACCCGTAGACACTCCGGTCATATCCCCACAGACAGACACGTCAGAC	-	1680
CTTTAGTAGAGTACTTAAGACTGGTGGCTTATAAACCATAGAACTGGATTCTTAGCTCT GAAATCATCTCATGAATTCTGACCACCGAATATTTGGTATCTTTGACCTAAGAATCGAGA	-	1740
GGAGGCTGGGAGTCACAGGCCAGGGTGCAAGTGTGGTAGGTTCCATTGAGGGTTCTAGAC CCTCCGACCCTCAGTGTCCGGTCCACGTTACACCATCCAAGGTAACCTCCCAAGATCTG	-	1800

TCGAGGAATT	CATAACTTCGTATA	AATGTATGCT	TATACGAAGTTATG	CGGCCCTAGACTCG	-	1860
AGCTCCTTAAG	TATTGAAGCATAT	TACATACG	ATATGCTTCAATAC	GCCGGGATCTGAGC		
ACGGATCCGAACAAACGACCCAAACACCCGTGCGTTTTATTCTGTCTTTTTATTGCCGATC	-	1920				
TGCCTAGGCTTGTTTGCTGGGTTGTGGGCACGCAAAATAAGACAGAAAAATAACGGCTAG						
CCCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGC	-	1980				
GGGAGTCTTCTTGAGCAGTTCTTCCGCTATCTTCCGCTACGCGACGCTTAGCCCTCGCCG						
GATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTACGCCCATTCGCCGCCAAGCTCTTCAGCAATATC	-	2040				
CTATGGCATTTCGTGCTCCTTCGCCAGTCGGGTAAAGCGGCGGTTCGAGAAGTCGTTATAG						
ACGGGTAGCCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGAT	-	2100				
TGCCCATCGGTTGCGATACAGGACTATCGCCAGGCGGTGTGGGTGCGCCGGTGTCTAGCTA						
GAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGT	-	2160				
CTTAGGTCTTTTCGCCGGTAAAAGGTGGTACTATAAGCCGTTTCGTCCGTAGCGGTACCCA						
CACGACGAGATCCTCGCCGTGCGGCATGCGCGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTTCGGCTGG	-	2220				
GTGCTGCTCTAGGAGCGGCAGCCCGTACGCGCGGAACCTCGGACCGCTTGTCGAAGCCGACC						
CGCGAGCCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCATCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCG	-	2280				
GCGCTCGGGGACTACGAGAAGCAGGTCTAGTAGGACTAGCTGTTCTGGCCGAAGGTAGGC						
AGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGGTTCGAATGGGCAGGTAGCCGGATC	-	2340				
TCATGCACGAGCGAGCTACGCTACAAAGCGAACCACCAGCTTACCCGTCCATCGGCCTAG						
AAGCGTATGCAGCCGCCGATTGCATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAG	-	2400				
TTCGCATACGTGCGCGGCGTAACGTAGTCGGTACTACCTATGAAAGAGCCGTCTCTCGTTC						
GTGAGATGACAGGAGATCCTGCCCCGGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCCGC	-	2460				
CACTCTACTGTCCTCTAGGACGGGGCCGTGAAGCGGGTTATCGTCGGTCAGGGAAGGGCG						
TTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCCGTCGTGGCCAGCCACGATAG	-	2520				
AAGTCACTGTTGCAGCTCGTGTCGACGCGTTTCCTTGCGGGCAGCACCGGTCGGTGCTATC						
CCGCGCTGCCTCGTCTCTGCAGTTCATTACAGGGCACCGGACAGGTTCGGTCTTGACAAAAAG	-	2580				
GGCGCGACGGAGCAGGACGTCAAGTAAGTCCCGTGGCCTGTCCAGCCAGAACTGTTTTTC						
AACCGGGCGCCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTG	-	2640				
TTGGCCCGCGGGGACGCGACTGTGCGGCCTTGTCGCCCGCGTAGTCTCGTCGGCTAACAGAC						
TTGTGCCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAGCGGCCGGAGAACCTGCGTGCAA	-	2700				
AACACGGGTCAGTATCGGCTTATCGGAGAGGTGGGTTCCGCCGGCCTCTTGACGCACGTT						
TCCATCTTGTTCAATGGCCGATCCCATATTGGCTGCAGGGTCGCTCGGTGTTTCGAGGCCA	-	2760				
AGGTAGAACAAGTTACCGGCTAGGGTATAACCGACGTCCCAGCGAGCCACAAGCTCCGGT						
CACGCGTCACCTTAATATGCGAAGTGACCTGGGACCGCGCCGCCCGACTGCATCTGCG	-	2820				
GTGCGCAGTGGAATTATACGCTTACCTGGACCTGGCGCGGCGGGGCTGACGTAGACGC						
TGTTCGAATTCGCCAATGACAAGACGCTGGGCGGGGTTTGCTCGACATTGGGTGGAAACA	-	2880				
ACAAGCTTAAGCGGTTACTGTTCTGCGACCCGCCCAACGAGCTGTAACCCACCTTTGT						
TTCCAGGCCTGGGTGGAGAGGCTTTTTGCTTCCTCTTGCAAAACCACACTGCTCGACATT	-	2940				
AAGGTCCGGACCCACCTCTCCGAAAAACGAAGGAGAACGTTTTGGTGTGACGAGCTGTAA						
GGGTGGAAACATTCCAGGCCTGGGTGGAGAGGCTTTTTGCTTCCTCTTGCAAAACCACAC	-	3000				
CCCACCTTTGTAAGGTCCGGACCCACCTCTCCGAAAAACGAAGGAGAACGTTTTGGTGTG						
TGCTCGAGGAATT	CATAACTTCGTATA	AATGTATGCT	TATACGAAGTTATG	CGGCCCGAGCA	-	3060
ACGAGCTCCTTAAG	TATTGAAGCATAT	TACATACG	ATATGCTTCAATAC	GCCGGCGTCGT		

CTTGTGTTGTTTCCTTAGCTTCTTCTATTATATTTGCGTGTATGCCTGAGCCTGCATATA GAACACAACAAAGGAATCGAAGAAGATAATATAAACGCACATACGGACTCGGACGTATAT	-	3120
CCCAACCATACTACCTATTCCCACATACCACCATGCCCCGTGTAGAGGTTAGGGCACAAC GGGTTGGTATGGATGGATAAGGGTGTATGGTGGTACGGGCACATCTCCAATCCCCGTGTTG	-	3180
TTGGGCAGTCAAGTCTCTCCTACCATGTGGGTCTGGGTATCCAACACGTTATCAGAC AACCCGTCAGTTCAGAGAGGATGGTACACCCAGGACCCATAGGTTGAGTGCAATAGTCTG	-	3240
TTGGCCCGGAAGTGCCATACTGCTGAGCCATCTGACTTGCCCCCTTCTCTAGCCTCTTCTA AACCGGGCCTTCACGGTATGACGACTCGGTAGACTGAACGGGGAAGAGATCGGAGAAGAT	-	3300
TAAAGGTATGAATCACCTCCCAAAGCCCCACCTCTAAGTTCCAGATCACCTTGAGACCAG ATTTCCATACTTAGTGAGGGTTTCGGGGTGGAGATTCAAGGTCTAGTGGAACCTCTGGTC	-	3360
GGGTTGGCCCCAGAGAGAGAAACAACCTAGACACCCAGTTGATAGGGGTGCTGCTGGTACC CCCAACCGGGGTCTCTCTCTTTGTTGATCTGTGGGTCAACTATCCCCACGACGACCATGG	-	3420
CAGTATGACTACAACCTATCAGGCAGCCTAGTGAGTTCATTGTACCAACTACCAGTGGAG GTCATACTGATGTTGGATAGTCCGTCGGATCACTCAAGTAACATGGTTGATGGTCACCTC	-	3480
ACTAAGGTCAGAATCACGCAGCTCTGGGAGGCCTGGAAATTTCTGTCTGGATTGACCCTG TGATTCCAGTCTTAGTGCGTCGAGACCCTCCGGACCTTTAAAGGACAGCCTAACTGGGAC	-	3540
AGCCCTGCTGTGCTCACAGAGATCTGCTTGCTGACCCGGGGTCGGCGCAGCCAGCGTC TCGGGACGACACGAGTGTCTCTAGACGAACGACTGGGCCCCAGCCGCGTGTCGGTCGCAG	-	3600
AGAGCGGATACTTATTGCCGCCTCTACTCACTGAGCGTGGAACAACCTCAATGAGGTGCTG TCTCGCCTATGAATAACGGCGGAGATGAGTGACTCGCACCTGTTGAAGTTACTCCACGAC	-	3660
GAGGAGTATCCCATGATGCGGAGGGCCTTCGAGACGGTTGCGCTGGACCGCTGGACCGC CTCCTCATAGGGTACTACGCCTCCCGGAAGCTCTGCCAACGCGACCTGGCGGACCTGGCG	-	3720
ATAGGTGAGGAGCAGGATGTGACAGCGGGAGGGCAGGGCGGCAAGCATGCAGACTCCAAG TATCCACTCCTCGTCTACACGTCCGCCCTCCCGTCCCGCCGTTCTGTACGTCTGAGGTTCT	-	3780
TCTCCTTTCTGGGCGTGGCCTGAGTGTCTGGCTCTTGTTCTATGGCTCAGGCAAGAAGA AGAGGAAAGGACCCGACCCGACTCACAGACCGAGAACAAGATAACCGAGTCCGTTCTTCT	-	3840
ACTCCATCCTCCTCCACAAGGTGCAGCACGACCTCAACTCAGGCGTCTTCAACTACCAAG TGAGGTAGGAGGAGGTGTTCCACGTCTGTCTGGAGTTGAGTCCGCAGAAGTTGATGGTTC	-	3900
AGAACGAGATCATCCAGCAGATCGTGCGGCATGACCGTGAGATGGCCCACTGTGCTCACC TCTTGCTCTAGTAGGTCGTCTAGCACGCCGTACTGGCACTCTACCGGGTGACACGAGTGG	-	3960
GCGTCCAGGCTGCCGCCTCAGCCACCCCCAACCCCCACGCCTGTTATATGGACCCCGCTGA CGCAGGTCCGACGGCGGAGTCGGTGGGGTTGGGGGTGCGGACAATATACCTGGGGCGACT	-	4020
TCCAGGCGCCACTGCAGGCTGCTGCTGCTACTACTTCGGTGGCCATAGCCCTCACACACC AGGTCCGCGGTGACGTCCGACGACGACGATGATGAAGCCACCGGTATCGGGAGTGTGTGG	-	4080
ACCCCCGCCTGCCCCGCCGATCTTCCGGCCCCCTCCCGGACCTGGGCTGGGCAACCTTG TGGGGGCGGACGGGCGGCGGTAGAAGGCCGGGGGAGGGCCTGGACCCGACCCGTTGGAAC	-	4140
GGGCTGGACAGACACCGAGGCACCCAAGGAGGCTGCAGTCCTTGATCCCTTCAGCTCTGG CCCGACCTGTCTGTGGCTCCGTGGGTTCCTCCGACGTCAGGAACCTAGGGAAGTCGAGACC	-	4200
GCTCTGCTTCACCCGCCAGCAGCCCCCTCACAGGTGGACACACCGTCTTCATCCTCCTTCC CGAGACGAAGTGGGCGGTCTGTCGGGGAGTGTCCACCTGTGTGGCAGAAGTAGGAGGAAGG	-	4260
ACATCCAACAGCTGGCTGGATTCTCTGCACCTCCTGGATTGAGCCCTCTCCTGCCCTCCT TGTAGGTTGTGACCGACCTAAGAGACGTGGAGGACCTAACTCGGGAGAGGACGGGAGGA	-	4320

CTAGCTCTTCCCCACCTCCAGGAGCCTGCGGTTCCCCACCAGCCCCACACCTCCACCT GATCGAGAAGGGGTGGAGGTCTCTCGGACGCCAAGGGGTGGTTCGGGGGTGTGGGAGGTGGA	-	4380
CCACTGCCGCCGCCGCCTCCACCACTGGGTTCGGCCACTTTCACAAGGCGCTGGGTGGCT GGTGACGGCGGGCGGAGGTGGTGACCCAAGCCGGTGAAAGTGTTCGCGACCCACCGA	-	4440
CCCTGTCATCCTCTGACTCCCCGCTGCTCACCCCACTGCAACCAGGCGCTCGCTCTCCAC GGGACAGTAGGAGACTGAGGGGCGACGAGTGGGGTGACGTTGGTCCGCGAGCGAGAGGTG	-	4500
AGGCTGCCCAGCCACCACCCCACTGCCTGGGGCCCCGAGGAGGTCTGGGACTCCTGGAGC TCCGACGGGTCTGGTGGTGGGGGTGACGGACCCCGGGCTCCTCCAGACCCTGAGGACCTCG	-	4560
ACTTCTTGCCGCCCCCACCCTCCTCCAGGTCAACATCATCCAGCCCTGGGCAGCTGGGGC TGAAGAACGGCGGGGTGGGAGGAGGTCCAGTGGTAGTAGGTCTGGGACCCGTCGACCCGG	-	4620
AGCCTCCTGGAGAGTTGTCCCTAGGTCTGGCAGCTGGTCCATCAAGTACACCAGAGACAC TCGGAGGACCTCTCAACAGGGATCCAGACCGTCGACCAGGTAGTTCATGTGGTCTCTGTG	-	4680
CCCCACGGCCTGAGCGACCATCCTTCATGGCAGGGGCTCTGGAGGGGCTTCTCCTGTAG GGGGTGCCGGACTCGCTGGTAGGAAGTACCGTCCCCGGAGACCTCCCCGAAGAGGACATC	-	4740
CCTTTACCCCCCGAGGAGGCCTCAGTCCTCCGGGCCACAGCCCGGGGCCCCCAAGAACTT GGAAATGGGGGGCTCCTCCGGAGTCAGGAGGCCCGGTGTCTGGGCCCCGGGGGTCTTGAA	-	4800
TCCCGAGTGCCCCACCCCGGGCCTCTGGCTCCCATGGTTCCCTGCTCCTGCCACCTGCAT AGGGCTCACGGGGTGGGGCCCCGAGACCGAGGGTACCAAGGGACGAGGACGGTGGACGTA	-	4860
CCAGCCCTCCACCTCCCCAGGTCCACAGCGCAGGGGCACACCACCCCTCACCCCTGGCC GGTCTGGGAGGTGGAGGGGTCCAGGGTGTCTCGCTCCCCGTGTGGTGGGGAGTGGGGACCGG	-	4920
GCCTCACACAGGACCTGAAGCTCATCTCAGCCTCTCAGCCAGCCCTCCCCAGGATGGGG CGGAGTGTGTCTCTGGACTTCGAGTAGAGTCGGAGAGTCGGTCTGGGAGGGGGTCTACCCC	-	4980
CACAGACTCTCCGCAGGGCCTCGCCTCACTCCTCAGGGGAGTCGGTGGCTGCCTTCTCAC GTGTCTGAGAGGCGTCCCGGAGCGGAGTGAGGAGTCCCCTCAGCCACCGACGGAAGAGTG	-	5040
TCTACCCCAGAGCTGGGGGTGGCAGTGGGAGTAGTGGGGGCCTTGGGCCTCCTGGAAGGC AGATGGGGTCTCGACCCCCACCGTCACCCCTCATCACCCCCGGAACCCGGAGGACCTTCCG	-	5100
CATATGGTGCCATCCCAGGCCAACATGTCACTTTGCCTCGGAAGACATCCTCAGGTTCTT GTATACCACGGTAGGGTCCGGTTGTACAGTGAAACGGAGCCTTCTGTAGGAGTCCAAGAA	-	5160
TGCCACCCCCACTTTCTTTGTTTGGGGCAAGAGCCGCCTCTTCTGGAGGGCCCCCTCTGA ACGGTGGGGGTGAAAGAAACAACCCCGTTCTCGGCGGAGAAGACCTCCCGGGGGAGACT	-	5220
CTACTGCTGCACCCAGAGGGAACCTGGCGCTAGGTCTGAGCCAGTACGCTCCAAACTGC GATGACGACGTGGGGTCTCCCTTGGACCGCGATCCAGACTCGGTCATGCGAGGTTTGACG	-	5280
CGTCTAATTTATGAGCTGGGCCCTCCCTCCCTCTTCTTTTTCTTGCTCCTTTCTTCCTTC GCAGATTAAATACTCGACCCGGGAGGGAGGGAGAAGAAAAAGAACGAGGAAAGAAGGAAG	-	5340
AGGTTTAACTGTGATTAGGAGATATACCAACAACAATAATAACCATAAAAAAACATACCC TCCAAATTGACACTAATCCTCTATATGGTTGTTGTTATTATTGGTATTTTTTTGTATGGG	-	5400
CAGAAAAACAAAAGACAGCAGAAAATAACCAGGTATTCTTAGAGCTATAGATTTTTTGGT GTCTTTTTGTCTTTCTGTCTGCTCTTTTATTGGTCCATAAGAATCTCGATATCTAAAAACCA	-	5460
CACTTGCTTTTATAGACTATTTTAATACTCAGCACTAGAGGGAGAGAGGGAGGGAGGGAG GTGAACGAAAATATCTGATAAAATTATGAGTCGTGATCTCCCTCTCTCCCTCCCTCCCTC	-	5520
GGAGGGGGGAGCAGACAAGGCCCAAGGCCAACAGCCAAAGGAAGACAGGCGGGGTCTCTG CCTCCCCCTCGTCTGTTCCGGGTTTCCGTTGTCTGGTTTCCTTCTGTCCGCCCCAGAGAC	-	5580

GGGACAGGGCAGGGGTGGGGTGACCCGTGTTTGGGTCTAGCATAGACCTGTCATTGTAT CCCTGTCCCGTCCCCACCCCACTGGGCACAAACCCAGGATCGTATCTGGACAGTAACATA	-	5640
TGTTCTGTAGAGCAAGAGCTACCTACCATCAATCAGTTCCTTGGCTGTGAACTTGGAGCC ACAAGACATCTCGTTCTCGATGGATGGTAGTTAGTCAAGGAACCGACACTTGAACCTCGG	-	5700
CACTCTGCTGGGGGCTGCCCTGGAGTGTGTTCCCAGGAGCCTCCTGCGCCCAAGTTCCTT GTGAGACGACCCCCGACGGGACCTCACACAAGGGTCCTCGGAGGACGCGGGTCAAGGAA	-	5760
GGGACACACAGGGCCCTTGAGGGCCTTGCTTTTTTTTTTCTACTGTAAACGTAGCAAGA CCCTGTGTGTCCCGGAACTCCCGGAACGAAAAAAAAAAGATGACATTTGCATCGTTCT	-	5820
TATGTATATGAATATGTATATGTATGTAAGATGTGTCTATGTATAGCTATGTAGTGCTCT ATACATATACTTATACATATACATACATTCTACACAGATACATATCGATACATCACGAGA	-	5880
GTAGAGCCGTGTAGATATCAGCTTCCATGTGTGCACATTTCGTGTGCAGTCTAGTTTAATC CATCTCGGCACATCTATAGTCGAAGGTACACACGTGTAAGCACACGTCAGATCAAATTAG	-	5940
CCATGTTGCCAGGACACCCAGGTCACCTTACATCCAGCAATCTGCTGTGGCCCGCAGGCT GGTACAACGGTCCTGTGGGTCCAGTGGAATGTAGGTCGTTAGACGACACCGGGCGTCCGA	-	6000
GGGCACTGCAGGCTCTGGGGGAAGTTCTCTCTCCCAGCCCTCAGGGAAGGGGACCCCTGG CCCGTGACGTCCGAGACCCCCTTCAAGAGAGAGGGTCGGGAGTCCCTTCCCCTGGGGACC	-	6060
AACCTTGCAGCAGACCCTCTTTCCCCATCTCTGGGCTGCAACCCAGTTCTAGCCCAACCT TTGGAACGTCGTCTGGGAGAAAGGGGTAGAGACCCGACGTTGGGTCAAGATCGGGTTGGA	-	6120
CTAGTCCCATGGAAGGGGAAGACTCCAGGCCGAGCCTTTCACCTCCCAGGGCTTCAAGCA GATCAGGGTACCTTCCCCTTCTGAGGTCCGGCTCGGAAAGTGAGGGTCCCGAAGTTTCGT	-	6180
CACCTGTCACCTCTGTGGCCCGAAGTTTCTCCAGCTGTACAACGGGAGGGGAGGGGAACG GTGGACAGTGAGACACCGGGCTTCAAAGAGGTGCACATGTTGCCCTCCCCTCCCCTTGC	-	6240
TCTATTTATTGAGTCTGTTCTGTGCCAAGCACTGGTTATACATACTCACAGACTGGGGGG AGATAAATAACTCAGACAAGACACGGTTCGTGACCAATATGTATGAGTGTCTGACCCCCC	-	6300
TGAGGATTATGGTTTCTCCATTTTACAGGTGAGGAAACTGAGGGTTGATTAGAATCACA ACTCCTAATACCAAAGAGGGTAAAGTGTCCACTCCTTTGACTCCCAACTAATCTTAGTGT	-	6360
TAACCAGGAGTGGCAGAGCTGGTCTGGTCTGAGCTGCAAAATCAACCTCCCTAAGGTTAAA ATTGGTCCTCACCGTCTCGACCAGACCAGACTCGACGTTTAGTTGGAGGGATTCCAATTT	-	6420
GCCTGTATTCTCCATCAGAAAACCTGTGTTTGGTACAGCCCTAGCTTTTGGTCCCTAGG CGGACATAAGGAGGGTAGTCTTTTGACACAAACCATGTCTGGGATCGAAAACAGGGATCC	-	6480
CAAAGTACAGGAGGAAGAGATGGGAGCTTGGTAGCAGTCAGACTTCAGTTCAAATCCCAG GTTTCATGTCCTCCTTCTCTACCCTCGAACCATCGTCAGTCTGAAGTCAAGTTTAGGGTC	-	6540
TTCTGCCACTTCTTAGCTGTGTGGCCTTGGGCAAGTTATCTGACCTTTCTGTTCCCTCAT AAGACGGTGAAGAATCGACACACCGGAACCCGTTCAATAGACTGGAAAGACAAGGGAGTA	-	6600
TAGTAAATAAGAACTATGGAAGTGCCTCACAATGACCAGTGAGAACCAGATAAGAAAAA ATCATTTTATTCTTGATACCTTGACGGAGTGTTACTGGTCACTCTTGGTCTATTCTTTTTT	-	6660
GATGTGAAACGCCAGCCAGTGCCTGGCACACAGCATAGTAGGTGCTCAATAAATCATG CTACACTTTGCGGGTCGGGTACGGACCGTGTGTCTGATCATCCACGAGTTATTTAGTAC	-	6720
TTTCTTCACCACCCCCCCCCCTATAAACTTAGCCATTGCTCCAGTGAAGTATGATGAG AAAGAAGTGGTGGGGGGGGGAGTATTTGAATCGGGTAACGAGGTCACTTGATACTACTC	-	6780
AGCCAGGGGATTTTAGCTGAGGGCTCCAAGACTTAAACTCTCAGGACTCAGGAGGTGG TCGGGTCCCCTAAAATCGACTCCCGAGGTTCTGAATTTTGAGAGTCCTGAGTCTCCACC	-	6840

CTGGGCCTCCATCATGGCTGGAGGAAGGTGCGTGGCCAGTGGTGGGCTTGAGTCAGGCCT GACCCGGAGGTAGTACCGACCTCCTTCCACGCACCGGTCAACCACCGAACTCAGTCCGGA	- 6900
TGGGATATGGGAAGTGTGGGTAAAGAAAGGAATTAGAGGAGAGAGTGCATAGGAGAGGTT ACCCTATACCCTTCACACCCATTTCTTTCTTAACTCTCCTCTCTCACGTATCCTCTCCAA	- 6960
ACTGCAGTGATGTTGAGATGTGGGGCAGGGCCTCTGGGGGAGACATAGAGGATGGGGACC TGACGTCACTACAACCTCTACACCCCGTCCCGGAGACCCCTCTGTATCTCCTACCCCTGG	- 7020
TCGGATGAGAGGCTAAGCTGATCTGTGGCTTTGGCCCTGAATTAGAAGCAGATGTCAGGA AGCCTACTCTCCGATTCGACTAGACACCGAAACCGGGACTTAATCTTCGTCTACAGTCCT	- 7080
CCCTGGAGGAGGCACAGCCAACAGCTTCCCTATCCATGGGTGCGAGCAGGTAGGACTGAT GGGACCTCCTCCGTGTGCGTTGTCTGAAGGGATAGGTACCCAGCCTCGTCCATCCTGACTA	- 7140
GCCCGTGCAGTGAGGGGGCTGGTTCTACCATGCCTGTCATCCCCATGCAGCAGCCAGAAG CGGGCACGTCACTCCCCCGACCAAGATGGTACGGACAGTAGGGGTACGTGCTCGGTCTTC	- 7200
GGTGGCATGAGCAGGTTTGGCCCTGGGGTGCCACAGGGAATCCTTTGTGGGTGGCTTGCA CCACCGTACTCGTCCAAACCGGGACCCACCGGTGTCCCTTAGGAAACACCCACCGAACGT	- 7260
GGGAAAGAGAGGGTGAAGTCCCTGGTGCCCTAGAAAATCTGCAGGAGCCCTAGGTTATAC CCCTTTCTCTCCCACTTCAGGGACACGGGATCTTTTAGACGTCTCTCGGGATCCAATATG	- 7320
AGGGCTGGGAGAAGCCTCCCAGACTGAGAGTCTTCGGACCTGTGTTCTGTCCCCAAGGA TCCCAGCCCTCTTCGGAGGGTCTGACTCTCAGAAGCCTGGACACAAGACAGGGGGTTCTCT	- 7380
AGGGAGCTTAGGGAGCCAGCTGGACGCCACAGAACCTGCAGTCCACCCTTGAGGAATAGG TCCCTCGAATCCCTCGGTGACCTGCGGTGTCTTGACGTGAGGTGGGAACCTCTTATCC	- 7440
AGAGGAGCTGGGGTCTGGGATAAGGAGTGAGGGGTCTCTTGTC AACAGGCCTGGCCTAGC TCTCCTCGACCCAGACCCTATTCTCTCACTCCCCAGAGAACAGTTGTCCGGACCGGATCG	- 7500
CACCCTTCTCTACTGATACATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTT GTGGGAAGAGATGACTATGTACGTA	- 7560
GGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACA CCGCATTAGTACCAGTATCGACAAAGGACACACTTTTAACAATAGGCGAGTGTTAAGGTGT	- 7620
CAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACT GTTGTATGCTCGGCCTTCGTATTTACATTTTCGGACCCACGGATTACTCACTCGATTGA	- 7680
CACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCT GTGTAATTAACGCAACGCGAGTGACGGGCGAAAGGTCAGCCCTTTGGACAGCACGGTCTGA	- 7740
GCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGC CGTAATTACTTAGCCGTTGCGCGCCCCCTCTCCGCCAAACGCATAACCCGCGAGAAGGCG	- 7800
TTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCA AAGGAGCGAGTGACTGAGCGACGCGAGCCAGCAAGCCGACGCGCTCGCCATAGTCGAGT	- 7860
CTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTG GAGTTTCCGCCATTATGCCAATAGGTGTCTTAGTCCCTATTGCGTCCTTTCTTGTAAC	- 7920
AGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTTCGA TCGTTTTCCGGTCGTTTTTCCGGTCCTTGGCATTMTTCCGGCGCAACGACCGCAAAAAGCT	- 7980
TAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAA ATCCGAGGCGGGGGGACTGCTCGTAGTGTTTTTAGCTGCGAGTTCAGTCTCCACCGCTTT	- 8040
CCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCC GGGCTGTCCTGATATTTCTATGGTCCGCAAAGGGGGACCTTCGAGGGAGCACGCGAGAGG	- 8100

TGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGC ACAAGGCTGGGACGGCGAATGGCCTATGGACAGGCGGAAAGAGGGAAGCCCTTCGCACCG	-	8160
GCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCT CGAAAGAGTATCGAGTGCACATCCATAGAGTCAAGCCACATCCAGCAAGCGAGGTTCTGA	-	8220
GGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCG CCCGACACACGTGCTTGGGGGGCAAGTCGGGCTGGCGACGCGGAATAGGCCATTGATAGC	-	8280
TCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAG AGAACTCAGGTTGGGCCATTCTGTGCTGAATAGCGGTGACCGTCGTCGGTGACCATTGTC	-	8340
GATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTA CTAATCGTCTCGCTCCATACATCCGCCACGATGTCTCAAGAACTTCACCACCGGATTGAT	-	8400
CGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGG GCCGATGTGATCTTCTGTCTATAAACCATAGACGCGAGACGACTTCGGTCAATGGAAGCC	-	8460
AAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTT TTTTTCTCAACCATCGAGAACTAGGCCGTTTGGTTGGTGGCGACCATCGCCACCAAAAAA	-	8520
TGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTT ACAAACGTTTCGTCTAATGCGCGTCTTTTTTCTTAGAGTTCTTCTAGGAAACTAGAA	-	8580
TTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAG AAGATGCCCCAGACTGCGAGTCACCTTGCTTTTGAGTGCAATTCCCTAAAACCAGTACTC	-	8640
ATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTAAATCAAT TAATAGTTTTTCTAGAAAGTGGATCTAGGAAAATTTAATTTTTACTTCAAAATTTAGTTA	-	8700
CTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACC GATTTTCATATATACTCATTTGAACCAGACTGTCAATGGTTACGAATTAGTCACTCCGTGG	-	8760
TATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGAT ATAGAGTCGCTAGACAGATAAAGCAAGTAGGTATCAACGGACTGAGGGGCAGCACATCTA	-	8820
AACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCC TTGATGCTATGCCCTCCCGAATGGTAGACCGGGGTCACGACGTTACTATGGCGCTCTGGG	-	8880
ACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAG TGCGAGTGGCCGAGGTCTAAATAGTCGTTATTTGGTTCGGTCGGCCTTCCCGGCTCGCGTC	-	8940
AAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAG TTCACCAGGACGTTGAAATAGGCGGAGGTAGGTACAGATAATTAACAACGGCCCTTCGATC	-	9000
AGTAAGTAGTTCCGCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGGCATTGCTACAGGCATCGT TCATTTCATCAAGCGGTCAATTATCAAACGCGTTGCAACAACCGTAACGATGTCCGTAGCA	-	9060
GGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCG CCACAGTGCAGAGCAGCAAACCATAACGAAGTAAGTCGAGGCCAAGGGTTGCTAGTTCCGC	-	9120
AGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGT TCAATGTACTAGGGGTACAACACGTTTTTTTCGCCAATCGAGGAAGCCAGGAGGCTAGCA	-	9180
TGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTC ACAGTCTTCATTCAACCGGCGTCACAATAGTGAGTACCAATACCGTCGTGACGTATTAAG	-	9240
TCTTACTGTTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTC AGAATGACAGTACGGTAGGCATTCTACGAAAAGACACTGACCACTCATGAGTTGGTTCAG	-	9300
ATTCTGAGAATACCGCGCCCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAA TAAGACTCTTATGGCGCGGGCCGCTGGCTCAACGAGAACGGGCCGAGTTATGCCCTATT	-	9360

TAGTGTATGACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCG ATCACATACTGTATCGTCTTGAAATTTTCACGAGTAGTAACCTTTTGCAAGAAGCCCCGC	- 9420
AAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACC TTTTGAGAGTTCCTAGAATGGCGACAACCTTAGGTCAAGCTACATTGGGTGAGCACGTGG	- 9480
CAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAG GTTGACTAGAAAGTCGTAGAAAATGAAAGTGGTCGCAAAGACCCACTCGTTTTTGTCTTC	- 9540
GCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTT CGTTTTACGGCGTTTTTTCCTTATTCCCGCTGTGCCTTTACAACCTTATGAGTATGAGAA	- 9600
CCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATT GGAAAAGTTATAATAACTTCGTAAATAGTCCCAATAACAGAGTACTCGCCTATGTATAA	- 9660
TGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCC ACTTACATAAATCTTTTTATTGTTTATCCCCAAGGCGCGTGTAAGGGGCTTTTCACGG	- 9720
ACCTGTATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGA TGGACATACGCCACACTTTATGGCGTGTCTACGCATTCTCTTTTATGGCGTAGTCCGCT	- 9780
AATTGTAAACGTTAATATTTTGTTAAATTCGCGTTAAATATTTGTTAAATCAGCTCATT TTAACATTTGCAATTATAAAACAATTTTAAGCGCAATTTATAAAACAATTTAGTCGAGTAA	- 9840
TTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGAT AAAATTGGTTATCCGGCTTTAGCCGTTTTAGGGAATATTTAGTTTTCTTATCTGGCTCTA	- 9900
AGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAA TCCCAACTCACAACAAGGTCAAACCTTGTTCTCAGGTGATAATTTCTTGCACCTGAGGTT	- 9960
CGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCAA GCAGTTTCCCGCTTTTTTGGCAGATAGTCCCGCTACCGGGTGATGCACTTGGTAGTGGGTT	- 10020
ATCAAGTTTTTTTGCGGTCGAGGTGCCGTAAAGCTCTAAATCGGAACCTTAAAGGGAGCCC TAGTTCAAAAACGCCAGCTCCACGGCATTTTCGAGATTTAGCCTTGGGATTTCCCTCGGG	- 10080
CCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAAGAAAGC GGCTAAATCTCGAACTGCCCCCTTTCGGCCGCTTGACACCGCTCTTTCCTTCCCTTCTTTTCG	- 10140
GAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCAC CTTTCCTCGCCCGCGATCCCGCGACCGTTACATCGCCAGTGCGACGCGCATTGGTGGTG	- 10200
ACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGGTCCATTGCGCATTCAGGCTGCGCAAC TGGGCGGCGCAATTACGCGGCGATGTCCCGCGCAGGTAAGCGGTAAGTCCGACGCGTTG	- 10260
TGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAAGGGGGA ACAACCTTCCCGCTAGCCACGCCCGGAGAAGCGATAATGCGGTGACCGCTTTCCCCCT	- 10320
TGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAA ACACGACGTTCCGCTAATTCAACCCATTGCGGTCCCCAAAGGGTCAGTGCTGCAACATTT	- 10380
ACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCCGACGTCCGGT TGCTGCCGGTCACTTAACATTATGCTGAGTGATATCCCGCTTAACCCGGGCTGCAGGCCA	- 10440
ACCTTAATTAACAAAAGCTGGGTACCGGGCCCCCCCCCTCGAGCCCCAGCTGGTTCTTTCCG TGGAATTAATTGTTTTCGACCCATGGCCCCGGGGGGGAGCTCGGGGTCGACCAAGAAAGGC	- 10500
CCTCAGAAGCCATAGAGCCCACCGCATCCCCAGCATGCCTGCTATTGTCTTCCCAATCCT GGAGTCTTCGGTATCTCGGGTGGCGTAGGGGTCGTACGGACGATAACAGAAGGGTTAGGA	- 10560
CCCCCTTGCTGTCCTGCCCCACCCACCCCCCAGAATAGAATGACACCTACTCAGACAAT GGGGGAACGACAGGACGGGGTGGGGTGGGGGGTCTTATCTTACTGTGGATGAGTCTGTTA	- 10620

GCGATGCAATTTCTCATTTTATTAGGAAAGGACAGTGGGAGTGGCACCTTCCAGGGTCA CGCTACGTTAAAGGAGTAAAATAATCCTTTCTGTACCCCTCACCGTGGAAGGTCCAGT	- 10680
AGGAAGGCACGGGGGAGGGGCAAACAACAGATGGCTGGCAACTAGAAAGGCACAGTCGAGG TCCTTCCGTGCCCCCTCCCCGTTTGTGTGTCTACCGACCGTTGATCTTCCGTGTCAGCTCC	- 10740
CTGATCAGCGAGCTCTAGGATCTGCATTCCACCACTGCTCCCATTTCATCAGTTCCATAGG GACTAGTCGCTCGAGATCCTAGACGTAAGGTGGTGACGAGGGTAAGTAGTCAAGGTATCC	- 10800
TTGGAATCTAAAATACACAAACAATTAGAATCAGTAGTTTAAACACATTATACACTTAAAA AACCTTAGATTTTATGTGTTTGTTAATCTTAGTCATCAAATTGTGTAATATGTGAATTTT	- 10860
ATTTTATATTTACCTTAGAGCTTTAAATCTCTGTAGGTAGTTTGTCCAATTATGTCACAC TAAAATATAAATGGAATCTCGAAATTTAGAGACATCCATCAAACAGGTTAATACAGTGTG	- 10920
CACAGAAGTAAGGTTTCCTTCACAAAGAGATCGCCTGACACGATTTCTGTCACAGGCTTGA GTGTCTTCATTCCAAGGAAGTGTTCCTCTAGCGGACTGTGCTAAAGGACGTGTCCGAAC	- 10980
GCCATATACTCATACATCGCATCTTGGCCACGTTTTTCCACGGGTTTCAAATTAATCTCA CGGTATATGAGTATGTAGCGTAGAACCAGGTGCAAAAGGTGCCCCAAAGTTTTAATTAGAGT	- 11040
AGTTCTACGCTTAACGCTTTTCGCCTGTTCCAGTTATTAATATATTCAACGCTAGAACTC TCAAGATGCGAATTGCGAAAGCGGACAAGGGTCAATAATTATATAAGTTGCGATCTTGAG	- 11100
CCCTCAGCGAAGGGAAGGCTGAGCACTACACGCGAAGCACCATCACCGAACCTTTTGATA GGGAGTCGCTTCCCTTCCGACTCGTGATGTGCGCTTCGTGGTAGTGGCTTGGAACCTAT	- 11160
AACCTCTCCGTTCCGACTTGCTCCATCAACGGTTCAGTGAGACTTAAACCTAACTCTTTC TTGAGAAGGCAAGGCTGAACGAGGTAGTTGCCAAGTCACTCTGAATTTGGATTGAGAAAG	- 11220
TTAATAGTTTCGGCATTATCCACTTTTAGTGCGAGAACCTTCGTGAGTCTTGATACGTC AATTATCAAAGCCGTAATAGGTGAAAATCACGCTCTTGGAAGCAGTCAGGACCTATGCAG	- 11280
ACTTTGACCACGCCTCCAGCTTTTCCAGAGAGCGGGTTTTTCATTATCTACAGAGTATCCC TGAAACTGGTGCGGAGGTGCAAAAGGTCTCTCGCCCCAAAGTAATAGATGTCTCATAGGG	- 11340
GCAGCGTCGTATTTATTGTGCGTACTATAAAACCCTTTCCAATCATCGTCATAATTTCT CGTCGCAGCATAAATAACAGCCATGATATTTTGGGAAAGGTTAGTAGCAGTATTAAAGGA	- 11400
TGTGTACCAGATTTTGGCTTTTGTATACCTTTTGAATGGAATCTACATAACCAGGTTTA ACACATGGTCTAAAACCGAAAACATATGGAAAACTTACCTTAGATGTATTGGTCCAAAT	- 11460
GTCCCGTGGTACGAAGAAAAGTTTTCCATACAAAAGATTTAGAAGAATCAACAACATCAT CAGGGCACCATGCTTCTTTTCAAAGGTATGTTTTCTAAATCTTCTTAGTTGTTGTAGTA	- 11520
CAGGATCCATGGCGAGGACCTGCAGGTGCAAGGCCCGGAGATGAGGAAGAGGAGAACAG GTCCTAGGTACCGCTCCTGGACGTCCAGCTTTCCGGGCTCTACTCCTTCTCCTCTTGTC	- 11580
CGCGGCAGACGTGCGCTTTTGAAGCGTGCAAGTGCAGGCTCCGGGCTCCGGAGGACCTTCGGGC GCGCCGTCTGCACGCGAAAACCTTCGCACGTCTTACGGCCCGGAGGCTCCTGGAAGCCCG	- 11640
GCCCCGCCCCGCCCCCTGAGCCCGCCCCCTGAGCCCGCCCCCGGACCCACCCCTTCCCAGCCT CGGGCGGGGCGGGGACTCGGGCGGGGACTCGGGCGGGGGCCTGGGTGGGGAAGGGTCGGA	- 11700
CTGAGCCCAGAAAGCGAAGGAGCAAAGCTGCTATTGGCCGCTGCCCCAAAGGCCTACCCG GACTCGGGTCTTTGCTTCCTCGTTTTCGACGATAACCGGCGACGGGGTTTCCGGATGGGC	- 11760
CTTCCATTGCTCAGCGGTGCTGTCCATCTGCACGAGACTAGTGAGACGTGCTACTTCCAT GAAGGTAACGAGTCGCCACGACAGGTAGACGTGCTCTGATCACTCTGCACGATGAAGGTA	- 11820
TTGTACAGTCCTGCACGACGCGAGCTGCGGGGCGGGGGGAACCTTCTGACTAGGGGAGG AACAGTGCAGGACGTGCTGCGCTCGACGCCCCGCCCCCCTTGAAGGACTGATCCCCCTCC	- 11880

AGTAGAAGGTGGCGCGAAGGGGCCACCAAAGAACGGAGCCGGTTGGCGCCTACCGGTGGA - 11940
 TCATCTTCCACCGCGCTTCCCCGGTGGTTTCTTGCCTCGGCCAACCGCGGATGGCCACCT

TGTGGAATGTGTGCGAGCCAGAGGCCACTTGTGTAGCGCCAAGTGGCCAGCGGGGCTGCT - 12000
 ACACCTTACACACGCTCGGTCTCCGGTGAACACATCGCGGTTACGGGTGCGCCCCGACGA

AAAGCGCATGCTCCAGACTGCCTTGGGAAAAGCGCCTCCCCTACCCGGTAGAATTCGATA - 12060
 TTTGCGGTACGAGGTCTGACGGAACCTTTTCGCGGAGGGGATGGGCCATCTTAAGCTAT

TCAAGCTTATCGATAACGTCGAGGTACCGGACGT - 12094
 AGTTCAATAGCTATGGCAGCTCCATGGCCTGCA

6.3 In dieser Arbeit verwendete Primer

Die Sequenzen der Oligonukleotide sind alle in 5'→3'-Richtung angegeben. In der letzten Spalte ist die Matrizen-DNA sowie mit einem Pfeil im Anschluss daran der Verwendungszweck angegeben.

Primer	Sequenz 5'→3'	Matrizen-DNA /Verwendungszweck
#3364	TAGGACCGCATAGTTATGGC	Genomische DNA Maus → 5'-Sonde, 5'-Primer
#3365	AGCTTCAGTCTGGTTGTGGT	Genomische DNA Maus → 5'-Sonde, 3'-Primer
#3366	TAAACACCGACACACTGGCA	Genomische DNA Maus → 3'-Sonde, 5'-Primer
#3367	TCCTCTTCCGAGGACTGTG	Genomische DNA Maus → 3'-Sonde, 3'-Primer
#3554	AATGACGTCCGGTACCTCGACG	pGEMTeasyDTA2 → DTA-Kassette, 5'-Primer
#3555	ACTGACGTCCGGTACCTTAATTAA	pGEMTeasyDTA2 → DTA-Kassette, 3'-Primer
#3752	CTTAGTGGTAGACTGTTGTGGTT	Genomische Maus-DNA → Genotypisierung Wildtyp-PCR, 5'-Primer
#3754	GCTGGCTGTGCGCCGACCC	Genomische Maus-DNA → Genotypisierung Wildtyp-PCR, 3'-Sonde
#3775	CGATAGAAGGCGATGCGCTG	Neoflox-8 → neo-Sonde, 5'-Primer
#3776	GCCATTGAACAAGATGGATTGC	Neoflox-8 → neo-Sonde, 3'-Primer
#3944	TCTGACGCTGGCTGTCTG	Genomische Maus-DNA → Genotypisierung rekombinante PCR, 5'-Primer
#3945	CCATTGAGGGTTCTAGACTC	Genomische Maus-DNA → Genotypisierung rekombinante PCR, 3'-Primer
#4247	TTGGAGAGATCTGCTTGCTGAC	Maus cDNA → HCN4, 5'-Primer
#4248	TTCTTGCTTATGCGGTCCAGG	Maus cDNA → HCN4, 3'-Primer
#4249	GCCTTCCTTCTTGGGTATGGAA	Maus cDNA → β-Aktin, 5'-Primer
#4250	AGCCAGAGCAGTAATCTCCTTC	Maus cDNA → β-Aktin, 3'-Primer

6.4 In dieser Arbeit verwendete Antikörper

Aufgeführt sind alle in dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper. In der Spalte „Antigen“ ist angegeben, welches Protein der Antikörper erkennt. Die Antikörper wurden im Western Blot (WB), in der Immunzytochemie (IZH) oder in der Immunhistochemie (IHC) eingesetzt.

Bezeichnung (hergestellt in)	Hersteller	Antigen	Verdünnung
PPc73K mHCN4 (polyklonal, Kaninchen)	Dr. Alexander Scholten, IBI-1, FZ Jülich	Peptid mHCN4: AS 1048-1083	1:400 (IZC)
mHCN4-beta (polyklonal, Kaninchen)	Anja Mataruga, IBI-1, FZ Jülich	Fusionsprotein GST + mHCN4: AS 1116-Stop	1:2000 (WB)
PG2-7H9 mHCN4 (monoklonal, Ratte)	Anja Mataruga, IBI-1, FZ Jülich	Fusionsprotein GST + mHCN4: AS 1116-Stop	1:2 (WB)
PG2-1A4 (monoklonal, Ratte)	Anja Mataruga, IBI-1, FZ Jülich	Fusionsprotein GST + mHCN4: AS 1116-Stop	unverdünnt (IZC)
Esel-anti-Kaninchen, HRP-gekoppelt	Amersham Biosciences	Kaninchen-Immun- globuline	1:5000 (WB)
Ziege-anti-Ratte, HRP-gekoppelt	Jackson	Ratten-Immunglobuline	1:5000 (WB)
Ziege-anti-Ratte Alexa488	Molecular Probes, Leiden, Niederlande	Ratten-Immunglobuline	1:500 (IHC, IZC)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologische Informationsverarbeitung (IBI-1) des Forschungszentrums Jülich angefertigt. Ich danke **allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern** für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere gilt mein Dank:

- Herrn Prof. Dr. U.B. Kaupp für die Überlassung des Themas und seine stetige Diskussionsbereitschaft,
- Herrn Dr. R. Seifert für die wissenschaftliche Betreuung, für die elektrophysiologische Messungen, seine hilfreichen Diskussionen und Ratschläge, sowie für seine Unterstützung bei der Niederschrift der Arbeit,
- Herrn Holger Pfeiffer für alles, was er in seiner Diplomarbeit zu dieser Arbeit beigetragen hat (ohne Dich wäre es nicht so gut ausgegangen!),
- Herrn C. Aretzweiler für seine stetige Hilfe im Tierstall, bei der Embryonenpräparation, der Immunhistochemie und vielen anderen Dingen im Labor,
- Herrn PD Dr. P. Kirchhof für die Durchführung der telemetrischen EKG-Messungen sowie der Messungen am isolierten Herzen,
- Herrn Dr. A. Waisman und Herrn Dr. T. Buch für die Hilfe bei der Herstellung der Mäuse,
- Herrn PD. Dr. A. Baumann für seine wertvollen Ratschläge und hilfreichen Diskussionen, sowie für seine Unterstützung bei der Niederschrift der Arbeit,
- Anja, Katharina, Timo, Bärbel, Sabine und Sebastian, die mir immer geholfen haben und für mich da waren,
- Herrn D. Grammig für seine Unterstützung bei allen computertechnischen Fragen,
- Frau A. Eckert für ihr offenes Ohr und die freundliche Hilfe bei allen verwaltungstechnischen und organisatorischen Problemen,
- Herrn R. Esser für die Hilfe bei organisatorischen Problemen sowie für die Versorgung mit Lebensmitteln aller Art.

Herrn Prof. Dr. P. Kloppenburg möchte ich für die Übernahme der Beurteilung dieser Arbeit als Gutachter der Universität zu Köln danken.

Ein besonderer Dank gilt meinem Freund, meiner Familie und meinen Freunden, die mich bei allem unterstützt und immer wieder aufgebaut haben.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist (auch nicht in Teilpublikationen) sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. U.B. Kaupp betreut worden.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4219
Juni 2006
ISSN 0944-2952