

Aus dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie der Medizinischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

(Direktor: Prof. Dr. med. Michael Gekle)

**Wirkung von Lipopolysacchariden auf kardiale
Schrittmacherkanäle vom Typ hHCN2**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Saskia Undine Dahm, geb. Matzat

geboren am 13.03.1987 in Zwickau

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Michael Gekle
2. Prof. Dr. med. Joachim Neumann
3. PD Dr. med. Michael Wagner, Dresden

23.10.2018

26.04.2019

REFERAT

Ein entscheidender prognostischer Parameter im Rahmen von Sepsis und Multiorganversagen (MODS) ist die Einschränkung der Herzfrequenzvariabilität. Ursächlich hierfür wird neben einer autonomen Dysfunktion auch eine direkte Beeinträchtigung des kardialen Schrittmacherstroms (I_f) und dessen molekularer Korrelate, der hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels (HCN-Kanäle), diskutiert. I_f leistet einen wesentlichen Beitrag zur spontanen diastolischen Depolarisation und damit zur Modulation der Herzfrequenz auf Ebene des Sinusknotens. Hauptverantwortlich für die toxische Manifestation schwerer gramnegativer Entzündungen scheinen Lipopolysaccharide (LPS) zu sein, welche deshalb auch als Endotoxin bezeichnet werden. Im Rahmen der gramnegativen Sepsis werden LPS aus der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien systemisch freigesetzt. Falls LPS die Kinetik von HCN-Kanälen direkt modulieren, könnte so die Herzfrequenzvariabilität beeinflusst werden. In dieser Arbeit wurden elektrophysiologische Messungen in der whole-cell-Konfiguration der patch-clamp-Technik in stabil mit cDNA des humanen HCN2-Kanals transfizierten Klonen der HEK293-Zelllinie durchgeführt. Im Kurzzeitexperiment wurden durch Zugabe von LPS in die Badlösung elektrophysiologische Zielparameter unbehandelter Zellen gegen die LPS-exponierter Zellen verglichen. Im Langzeitexperiment wurde die Badlösung während des patch-clamp-Experiments ausgetauscht. Dies ermöglichte den Vergleich vor und nach LPS-Exposition an derselben Zelle. Zellen mit Exposition gegen LPS aktivierten im Vergleich zu Kontrollzellen langsamer und bei negativeren Membranpotenzialen, zudem geschah die Deaktivierung beschleunigt. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig und tritt innerhalb von wenigen Sekunden ein. Er bleibt in Anwesenheit von LPS für mehrere Stunden erhalten. Die maximale Stromamplitude war nach LPS-Exposition im Langzeitexperiment dauerhaft reduziert. Unmittelbar nach Applikation der Badlösung wurden instantane Ströme beobachtet, über deren klinische Bedeutung nur spekuliert werden kann. Die beobachtete erschwerte Aktivierung und erleichterte Deaktivierung kardialer Schrittmacherkanäle unter dem Einfluss von LPS könnte in vivo durch einen verzögerten Ablauf der langsamen diastolischen Depolarisation zur Bradykardie und Einschränkung der Herzfrequenzvariabilität führen. Eine direkte Modulation des hHCN2-Kanals durch LPS ist wahrscheinlich. Bezüglich der klinischen Bedeutung der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich um ein heterologes Expressionssystem handelt und somit kardiomyozytenspezifische Wechselwirkungen und systemische Einflüsse nicht abgebildet werden. Eine weitere Limitation ist die Unkenntnis der lokalen LPS-Konzentrationen und die verschiedenen LPS-Varianten bei Patienten.

Dahm, Saskia: Die Wirkung von Lipopolysacchariden auf kardiale Schrittmacherkanäle vom Typ hHCN2, Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 57 Seiten, 2018

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Rolle der autonomen Dysfunktion bei Sepsis, SIRS und MODS	1
1.2	HCN-Kanäle	2
1.2.1	Art des Schrittmacherstroms	2
1.2.2	Die Familie der HCN-Kanäle	2
1.2.3	Expression und Funktion der HCN-Isoformen	2
1.2.4	Struktur und Modulation von HCN-Kanälen	3
1.3	Lipopolysaccharide	5
1.4	Kardiale Effekte von LPS	6
1.4.1	Effekt von LPS auf den Schrittmacherstrom I_f	7
2	Zielstellung	8
3	Material und Methodik	9
3.1	Chemikalien und pharmakologische Substanzen	9
3.2	Zusammensetzung der Lösungen	9
3.3	Herstellung der Lipopolysaccharid-Stammlösung	11
3.4	Kultivierung der HEK-293-Zellen	12
3.5	patch-clamp-Experimente	13
3.5.1	Versuchsaufbau und verwendete Geräte	13
3.5.2	Herstellung der Patchpipetten	14
3.5.3	Prinzip und Erreichen der whole-cell-Konfiguration	15
3.5.4	Analyse der Daten und statistische Auswertung	16
3.5.5	Modifikation der Versuchsanordnung für Langzeitexperimente	17
3.5.6	Standardisierter Ablauf eines Langzeitexperiments	18
3.5.7	Pulsprotokolle und elektrophysiologische Parameter	20
4	Ergebnisse	23
4.1	Eintritt des Effektes	23
4.2	Einfluss von LPS auf Aktivierung	25
4.3	Einfluss von LPS auf die Deaktivierung	32
4.4	Instantaner Strom	34
4.5	Voll aktivierter Strom	35
4.6	Stationäre Aktivierungskurve von I_{hHCN2}	38
5	Diskussion	43

5.1	Erschwerte Aktivierung und erleichterte Deaktivierung	43
5.2	LPS modifiziert die Kinetik des hHCN2-Kanals	43
5.3	Wie wirkt LPS auf den hHCN2-Kanal?	44
5.4	Der Einfluss des intrazellulären cAMP-Spiegels auf die Aktivierung von hHCN2	45
5.5	Stromerschöpfung	46
5.6	Instantaner Strom	47
5.7	Bedeutung der LPS-Konzentration	48
5.8	Der inhibitorische Effekt von LPS auf die Aktivität von hHCN2-Kanälen	49
5.9	Bedeutung in vivo	49
6	Zusammenfassung	51
7	Literaturverzeichnis	52
8	Thesen	57
	Lebenslauf	
	Selbstständigkeitserklärung	
	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
	Danksagung	

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

A ₁	maximale Stromamplitude
A ₂	offset des Haltestroms
ATP	Adenosintriphosphat
CD	cluster of differentiation
CL	cycle length
C _m	elektrische Kapazität der Zellmembran
CNG	durch zyklische Nukleotide gesteuert
CNBD	cyclic nucleotide binding domain
DNA	deoxyribonucleic acid
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
ΔI_{tail}	Differenz des tail-Stroms
$\Delta V_{0,5}$	Differenz der halbmaximalen Aktivierung (shift)
$\Delta V_{0,5\text{max}}$	maximale Differenz der halbmaximalen Aktivierung
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N,N-tetraessigsäure
E _{hHCN2}	Gleichgewichtspotenzial des hHCN2-Kanals
EU	endotoxin units
FCS	fetales Kälberserum
ghHCN2	Einzelleitfähigkeit des hHCN2-Kanals
GlcN	Glucosamin
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GYG-Motiv	Glycin-Tyrosin-Glycin Motiv
HCN-Kanal	durch Hyperpolarisation aktivierter und durch zyklische Nukleotide gesteuerter Kanal
Hep	Heptose
HEK293	humane embryonale Nierenzellen (Zelllinie 293)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HF	Hochfrequenzanteile
HRV	Herzfrequenzvariabilität
I _f	I _{funny} , Schrittmacherstrom
I _h	I _{hyperpolarisation}
I _{hHCN2}	durch Hyperpolarisation verzögert aktivierter Strom des HCN2-Kanals

I_{instHCN2}	instantaner Strom des HCN2-Kanals
IL	Interleukin
I_{tail}	tail-Strom
IV-Relation	Strom-Spannungs-Beziehung
K_D	Dissoziationskonstante
Kdo	2-Keto-3-desoxyoctonsäure
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
K_v	Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle
LF	niederfrequente Anteile
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharide
MDP	maximales diastolisches Potenzial
MD2	myeloid differentiation protein 2, Lymphozytenantigen 96
MirRP1	Min-K-related peptide 1
MODS	Multiorganversagen
MW	Mittelwert
MSR	macrophage scavenger receptor
NF- κ -B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
n_{hHCN2}	Anzahl der auf der Zelle exprimierten hHCN2-Kanäle
NO	Stickstoffmonoxid
OPA	Operationsverstärker
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
p_{hHCN2}	Offenwahrscheinlichkeit des hHCN2-Kanals
PIP(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
RNA	ribonucleic acid
R_f	Rückkopplungswiderstand
R_m	Membranwiderstand
R_s	Serienwiderstand
s	slope, Neigungsfaktor
S 1-6	Transmembransegment 1-6
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
Ser-306	Serinrest 306
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SpIH	HCN-Kanal der Seeigel-Samenzelle
τ_{Akt}	Aktivierungszeitkonstante

τ_{Deakt}	Deaktivierungszeitkonstante
TLR4	toll-like-receptor 4
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
U_{aus}	Ausgangsspannung
U_{pip}	durch die Patchpipette registriertes Potenzial (Pipettenspannung)
U_{soll}	Kommandospannung
V	Testpotenzial
V_{tail}	Membranpotenzial bei Aufzeichnung des tail-Stroms
VLF	sehr niederfrequente Anteile
$V_{0,5}$	Membranpotenzial der halbmaximalen Aktivierung von I_{hHCN2}

1 EINLEITUNG

1.1 ROLLE DER AUTONOMEN DYSFUNKTION BEI SEPSIS, SIRS UND MODS

Die Sepsis zählt als schwerste Verlaufsform akuter Infektionen zu den häufigsten Todesursachen in deutschen Krankenhäusern. Im Jahr 2003 gab es 60 000 sepsisassoziierte Todesfälle auf deutschen Intensivstationen (Brunkhorst 2006). Im Jahr 2013 konnte eine Prävalenz von 335:100 000 Einwohnern und eine Letalität von 24,3% festgestellt werden (Fleischmann et al., 2016). Sepsis ist ein komplexes klinisches Syndrom, das durch Verstärkung und Dysregulation einer initial adäquaten Immunantwort des Wirts auf eine Infektion entsteht und zur lebensbedrohlichen Organdysfunktion führt (Cohen 2002; Singer et al., 2016). Durch eine überschießende Aktivierung des angeborenen Immunsystems kommt es zur übermäßigen Freisetzung von Entzündungsmediatoren und damit zur Organschädigung und Organdysfunktion. Beim Fortschreiten zum Mehrfach- oder Multiorganversagen (multi organ dysfunction syndrome, MODS) spielt die Entkopplung der durch das autonome Nervensystem vermittelten Interaktion der Organe eine entscheidende Rolle. Bakterielle Toxine und Sepsismediatoren beeinträchtigen neuronale Reflexe und Zytokinkaskaden (Schmidt et al., 2014) und führen zur autonomen Dysfunktion (Heinroth et al., 1999; Schmidt et al., 2008).

Ein prognostisch entscheidender Faktor für das Überleben einer Sepsis ist der kardiovaskuläre Status (Parrillo 1989). Bei Patienten mit systemischer Entzündungsreaktion (SIRS), Sepsis und Multiorganversagen wurde eine Abnahme der Herzfrequenzvariabilität beobachtet (Werdan et al., 2009). Im Rahmen eines Multiorganversagens und im Rahmen der chronischen Herzinsuffizienz ist das Ausmaß der Einschränkung der Herzfrequenzvariabilität entscheidend für Prognose und Mortalität (Schmidt et al., 2005; Schmidt et al., 2008; Schmidt et al., 2014). Bei der Entwicklung der autonomen Dysfunktion spielen neben den Veränderungen am vegetativen Nervensystem Veränderungen an der Zielzelle selbst eine entscheidende Rolle. Auf zellulärer Ebene konnte gezeigt werden, dass die Exposition gegen Endotoxin die Schlagfrequenzvariabilität an spontan kontraktiven Herzmuskelzellen reduziert (Schmidt et al., 2007) und den Schrittmacherstrom I_f beeinträchtigt (Zorn-Pauly et al., 2007).

1.2 HCN-KANÄLE

1.2.1 ART DES SCHRITTMACHERSTROMS

Der Schrittmacherstrom I_f leistet einen wesentlichen Beitrag zur spontanen diastolischen Depolarisation und zur Modulation der Herzfrequenz auf Sinusknotenebene (DiFrancesco 2010). Es handelt sich um einen bei Hyperpolarisation aktivierten gemischten Kationenstrom, der hauptsächlich von K^+ , jedoch auch von Na^+ (DiFrancesco 1981) getragen wird. Je nach extrazellulärer Kaliumkonzentration wird ein Verhältnis der Na^+ - zur K^+ -Permeabilität ($P_{Na}:P_K$) von 1:3 bis 1:5 angegeben (Biel et al., 2009). In physiologischer Lösung findet sich ein Umkehrpotenzial des Schrittmacherstromes von -10mV bis -20mV (Accili et al., 2002).

1.2.2 DIE FAMILIE DER HCN-KANÄLE

Das molekulare Korrelat für I_f sind HCN-Kanäle (hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channels, Ludwig et al., 1998; Gauss et al., 1998; Santoro und Tibbs, 1999; Ishii et al., 1999). Sie gehören zur großen Superfamilie der Porenschleifen-Kationenkanäle (pore-loop ion channels). Die vier Gene HCN1-4 kodieren die α -Untereinheit von I_f -Kanälen und werden sowohl kardial als auch neuronal exprimiert (Biel et al., 2009). Im Säugetierherzen werden hauptsächlich HCN1, HCN2 und HCN4 exprimiert (Stieber et al., 2003; Stieber et al., 2004; Marionneau et al., 2005). Jede HCN-Isoform zeigt eine unterschiedliche Kinetik, ein unterschiedliches Aktivierungspotenzial und eine unterschiedliche Sensitivität für cAMP. Neben Homotetrameren existieren in vivo ebenfalls Heterotetramere (Baruscotti et al., 2005), deren biophysikalischen Eigenschaften zwischen denen der einzelnen Homotetrameren liegen (Chen et al., 2001).

1.2.3 EXPRESSION UND FUNKTION DER HCN-ISOFORMEN

Im Sinusknoten des Erwachsenen werden HCN1, HCN2 und HCN4 stärker als im Vorhofmyokard exprimiert. HCN1 ist die häufigste Isoform, gefolgt von HCN4 und HCN2. Im Vorhofmyokard sind HCN2 und HCN4 am stärksten exprimiert (Li et al., 2015). HCN1 aktiviert am schnellsten bei am wenigsten negativen Membranpotenzialen und hat die geringste Sensitivität für cAMP (Ludwig et al., 1999). HCN4 aktiviert am langsamsten und reagiert am empfindlichsten auf cAMP. HCN2 aktiviert schneller als HCN4, jedoch langsamer als HCN1. cAMP führt zur Modifikation der Kinetik des HCN2-Kanals im Sinne einer beschleunigten Aktivierung bei weniger negativen Membranpotenzialen. Dies geschieht im stärkeren Ausmaß als bei Kanälen des HCN1-Typs, jedoch nicht so stark wie bei Kanälen vom HCN4-Typ (Mangoni und Nargeot, 2008). Unabhängig von heterologer oder homologer Expression aktiviert HCN4 langsamer und bei positiveren Membranpotenzialen als HCN2 (Bucchi et al., 2002).

HCN3 wird ventrikulär exprimiert und scheint in ventrikulären Kardiomyozyten das Ruhemembranpotenzial und den Ablauf der Repolarisation durch eine depolarisierende Hintergrundleitfähigkeit, die vor allem in der Phase der späten Repolarisation den Effekt von hyperpolarisierenden K^+ -Strömen antagonisiert, zu stabilisieren (Fenske et al., 2011). Die Überexpression von HCN2-Kanälen in embryonalen ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte führte zum Anstieg der elektrischen Spontanaktivität, während die Überexpression einer nicht-funktionalen Isoform zur Suppression der natürlichen Schrittmacheraktivität und damit zu einer verminderten Schrittmacheraktivität führte (Qu et al., 2001). Beim kongenitalen Fehlen von HCN-Kanälen im Sinusknoten wurde sowohl für den knockout von HCN1, als auch für HCN2 und HCN4 Sinusarrhythmie und eine gesteigerte Herzfrequenzvariabilität beobachtet (Herrmann et al., 2007; Baruscotti et al., 2011; Fenske et al., 2013; Li et al., 2015). Zusätzlich war beim knockout des HCN2-Kanals das Membranpotenzial in negativere Bereiche verschoben. An Sinusknotenzellen war die Stromamplitude um ca. 30% reduziert (Ludwig et al., 2003).

Die beobachtete gesteigerte Herzfrequenzvariabilität scheint dabei mit einer eigenständigen Pathologie im Sinne eines Sinusarrests oder sinuatrialen Blocks einherzugehen, die Antwort auf betaadrenerge Stimulation zeigte sich unverändert. Das kongenitale Fehlen von HCN1 oder HCN2-Kanälen kann kompensiert werden, der HCN4-Kanal ist für die Entwicklung des kardialen Reizbildungs- und Reizleitungssystems unerlässlich (Stieber et al., 2003). Trotz der sehr lebendigen Diskussion der Wissenschaftswelt über die tatsächliche Bedeutung von HCN-Kanälen kann somit durch knockout-Modelle zweifelsfrei eine wesentliche Rolle bei der kardialen Impulsbildung belegt werden.

1.2.4 STRUKTUR UND MODULATION VON HCN-KANÄLEN

Katecholamine wie Adrenalin und Noradrenalin beschleunigen die Aktivierung von I_f und führen zu einer gesteigerten Herzfrequenz (Tsien 1974; Noma et al., 1980; DiFrancesco et al., 1986). Einen Beitrag zur Sympathikus-vermittelten Modulation der Herzfrequenz leistet die betaadrenerge Stimulation der G_s -Protein gekoppelten Adenylatcyclase. Bei steigenden intrazellulären cAMP-Spiegeln wird das Öffnen der HCN-Kanäle erleichtert und die Aktivierung beschleunigt. Im Gegenzug dazu führt die G_i -Protein gekoppelte muskarinische Stimulation durch das parasympathische Nervensystem zum Absinken des intrazellulären cAMP-Spiegels und damit zu einer verlangsamten Aktivierung von I_f (DiFrancesco und Tromba, 1988).

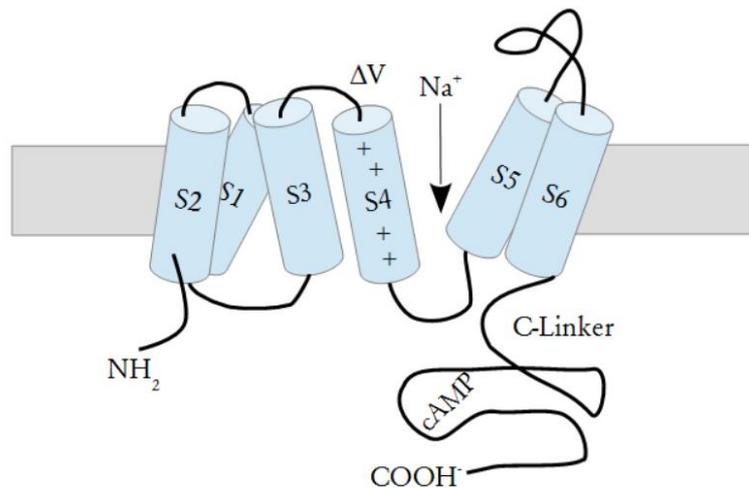


Abbildung 1 Schematischer Aufbau der α - Untereinheit eines HCN-Kanals, modifiziert nach Biel et al., 2009

Strukturell sind HCN-Kanäle den spannungsgesteuerten Kalium-Kanälen (Kv) ähnlich. Sie weisen sechs Transmembransegmente (S1-S6), eine Selektivitäts-Filter-Sequenz mit GYG-Motiv, multiple Basenreste in der S4-Domäne und einige saure Reste im Bereich der S2 und S3-Domäne auf. Die Basenreste im Bereich von S4 dienen als Spannungssensor und interagieren mit den sauren Resten im Bereich von S2 und S3. Bei Mutation eines Serinrestes (Ser-306) im Bereich der S4-Helix werden HCN2-Ströme mit großer instantaner Komponente und kleiner zeitabhängiger Komponente beobachtet. Die instantane Komponente beschreibt einen spannungsabhängigen Einwärtsstrom, dessen Amplitude sich nach Änderung des Membranpotenzials ebenfalls ohne Zeitverzögerung ändert (Chen et al., 2000). Im Grenzbereich von S4 und der S4-S5-Verbindungsregion befindet sich ein Histidinrest, der die pH-Sensitivität von HCN-Kanälen vermittelt (Zong et al., 2001). Jeder HCN-Kanal besteht aus vier α -Untereinheiten mit je einem Spannungssensor und einer Bindungsstelle für cAMP. Die Kernregion ist von Subtyp zu Subtyp stabil, N- und C-Terminus zeigen eine hohe Variabilität. Am C-Terminus befindet sich die Bindungsstelle für zyklische Nukleotide (cyclic nucleotide-binding domain, CNBD; Biel et al., 2009).

Das Öffnungsverhalten wird sowohl durch das Membranpotenzial als auch durch die intrazelluläre cAMP-Konzentration beeinflusst. cAMP bindet dabei phosphorylierungsunabhängig auf der zyttoplasmatischen Seite direkt an den Kanal. Es verschiebt die Aktivierungskurve in positivere Potenzialbereiche, beschleunigt die Aktivierung, verlangsamt die Deaktivierung und stabilisiert dabei die HCN-Kanäle im offenen Zustand (DiFrancesco et al., 2006). Ob dabei eine allosterische Interaktion der Untereinheiten stattfindet wird noch kontrovers diskutiert (DiFrancesco 1999; Altomare et al., 2001; Thon et al., 2013). Neben cAMP kann If auch durch phosphorylierungsabhängige Prozesse, auxiliäre Untereinheiten und interagierende Strukturproteine, die die sub-Membran-Lokalisierung beeinflussen, moduliert werden. MinK-Related Peptide 1 (MirRP1) stellt eine auxili-

äre β -Untereinheit für HCN1 und HCN2 dar. Es beschleunigt die Aktivierungskinetik und erhöht die Protein- und Stromexpression (Yu et al., 2001). Die Lokalisation von HCN-Kanälen in Caveolae, spezialisierten lipid rafts, reguliert sowohl im homologen als auch im heterologen Expressionssystem die Kanalkinetik (Barbuti et al., 2004). Die durch β_2 -Rezeptoren abhängige Aktivierung kann nur bei Kolo­kalisierung in lipid rafts stattfinden (Barbuti et al., 2007).

Die maximale Leitfähigkeit liegt im homologen Expressionssystem bei ca. 1pS (DiFrancesco 1986), im heterologen Expressionssystem für HCN2 bei 1,5-1,8pS (Dekker und Yellen 2006; Thon et al., 2013). Sie wird durch Bindung von cAMP nicht beeinflusst (Bois et al., 1997). Die Expression im homologen oder heterologen System hat bei HCN2 und HCN4 einen Einfluss auf das Potenzial der halbmaximalen Aktivierung (Bucchi et al., 2002). Die stationäre Aktivierungskurve von hHCN2-Kanälen verläuft sigmoidal, während der Zeitverlauf der Aktivierung nach anfänglicher Verzögerung durch eine monoexponentielle Funktion beschrieben werden kann.

Es lassen sich eine instantane Komponente $I_{inst(hHCN2)}$ und eine zeitabhängige Komponente I_{hHCN2} unterscheiden. Die instantane Komponente ist nicht durch Cs^+ blockierbar und kommt möglicherweise durch einen „Leckzustand“ des Kanals zustande (Proenza et al., 2002). Bei Membranpotenzialen, die gering negativ sind, dominiert die langsam aktivierende Komponente, bei stark negativen Membranpotenzialen gewinnt die schnelle Komponente an Bedeutung (Chen 2001).

1.3 LIPOPOLYSACCHARIDE

Hauptverantwortlich für die toxische Manifestation schwerer gramnegativer Infektionen und der generalisierten Entzündung ist Endotoxin (Rietschel et al., 1994). Endotoxin ist als Lipopolysaccharid ein integraler Bestandteil der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien. Bei Sepsispatienten sind 62% in der Blutkultur gesicherten Bakterien gramnegativ. *E. coli* zählt zu den häufigsten gramnegativen Erregern (Angus et al., 2013). Der Phospholipidanteil von Endotoxin wird als Lipid A bezeichnet und verankert das Molekül in der bakteriellen Zellwand. Nach Bindung an das LPS-bindende Protein (LBP) und CD14 aktiviert freies Lipid A das angeborene Immunsystem in Verbindung mit dem akzessorischen Molekül MD-2 über den Toll-like-Rezeptor 4 (TL-R 4) als pathogenassoziiertes molekulares Muster (PAMP, pathogen associated molecular pattern; Akira et al., 2006). Das Ausmaß der Aktivierung variiert je nach Bakterienspezies. Lipid A von *E. coli* ist ein starker Aktivator der angeborenen Immunantwort. Es enthält zwei Phosphatgruppen und sechs Acylketten mit 12 bis 14 C-Atomen (Trent et al., 2006).

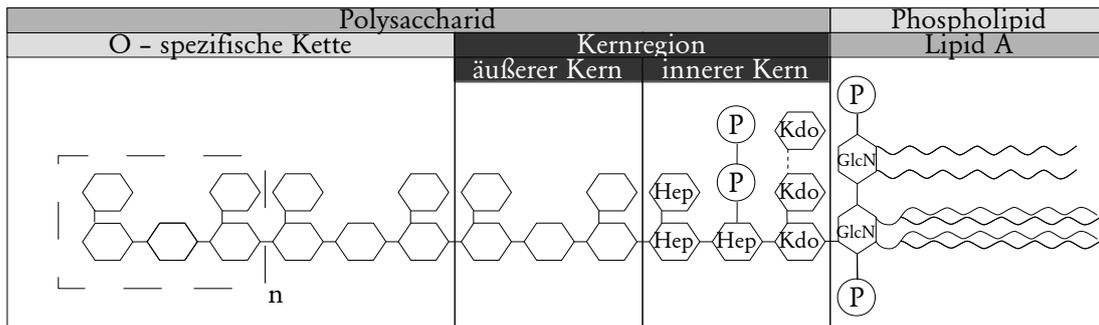


Abbildung 2 Schematischer Aufbau von LPS modifiziert nach Klöckner et al., 2011. Glucosamine (GlcN) bilden die Basis von Lipid A, die innere Kernregion besteht typischerweise aus Heptosen (Hep) und 2-Keto-3-desoxyoctonsäure (Kdo)

Der Saccharidanteil besteht aus O-Antigen und Kernregion (Raetz 1990). Die Anzahl der sich wiederholenden Kohlenhydrateinheiten und damit die Länge der O-spezifischen Kette sind hoch variabel. Es existieren sowohl deutliche Unterschiede zwischen unterschiedlichen Spezies als auch innerhalb eines Bakterienstammes bis hin zur unterschiedlichen Anzahl von Wiederholungseinheiten auf der Oberfläche eines Individuums. Die Heterogenität der Kernregion ist weniger ausgeprägt und beschränkt sich auf das hauptsächlich aus Hexosen bestehende Gebiet des äußeren Kerns (Rietschel et al., 1994). Neben CD14 und TLR-4 wird LPS ebenfalls durch den MSR (macrophage scavenger receptor), CD11b/CD18 und Ionenkanäle erkannt (Blunck et al., 2001; Cohen 2002). Die Bindung von LPS an den TLR-4 induziert unter anderem die Translokation von NF- κ B und führt somit zur Aktivierung von Zytokin-Gen-Promotoren. Neben verschiedenen anderen Interleukinen kommt es zur Freisetzung von IL-1, IL-6 und TNF- α . IL-1 und TNF- α sind dabei prototypische inflammatorische Zytokine und vermitteln viele der immunpathologischen Wirkungen des LPS-induzierten Schocks. Neben proinflammatorischen Zytokinen sind dabei ebenfalls Chemokine, Lipidmediatoren wie Prostaglandine und der Plättchen-aktivierende Faktor (platelet activating factor, PAF), sowie Sauerstoffradikale wie Superoxid und NO beteiligt. Diese Mediatoren führen zur Hyperkoagulabilität, zu Fieber, zur Vasodilatation und zum kapillaren Leck (Cohen 2002).

1.4 KARDIALE EFFEKTE VON LPS

LPS kann auch mediatorenunabhängig direkt Zellen des neuronalen, kardiovaskulären und des Immunsystems beeinflussen und somit zu organspezifischen Erkrankungen führen (Werdan und Müller-Werdan, 1996). Die kardiale Funktion wird durch LPS auf vielfältige Weise beeinträchtigt. LPS wird in Kardiomyozyten stärker als in Makrophagen intrazellulär aufgenommen (Cowan et al., 2001) und führt an atrialen Myozyten direkt zur Reduktion der Kontraktilität und zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α (Kapadia et al., 1995). Dies geschieht unabhängig von CD14 oder Lipopolysaccharid-bindendem Protein. Später führt LPS über ver-

schiedene Mechanismen, wie die Produktion von NO-Derivaten, die Produktion von freien Radikalen und Arachidonsäurederivaten zu einer progredienten kontraktile Dysfunktion, zu einer erschwerten betaadrenergen Stimulation und zum Zelltod (Cowan et al., 2000).

Nach intraperitonealer Injektion von Endotoxin konnte bei Ratten eine Abnahme der Herzfrequenzvariabilität bei tachykarder Kreislaufsituation beobachtet werden (Gholami et al., 2012). In der Analyse der Frequenzspektren zeigte sich nach LPS-Injektion sowohl eine Abnahme der im Bereich der durch die respiratorische Sinusarrhythmie beeinflussten hochfrequenten Anteile (high frequency, HF) als auch im Bereich der durch sympathische und parasympathische Modulation beeinflussten niederfrequenten Anteile (low frequency, LF; Zila, et al., 2015). Nach intravenöser LPS-Injektion bei freiwilligen Probanden führte LPS zu einer Reduktion der Herzfrequenzvariabilität (Godin et al., 1996). Dabei führt bereits eine Dosis von 0,04ng/kg KG zu einem biologischen Effekt. Dieser trat 1-2h nach LPS-Injektion auf und erreichte sein Maximum nach 3-4h. Die Gabe von Ibuprofen konnte den Verlust der Herzfrequenzvariabilität nicht aufhalten.

Die Reduktion der Herzfrequenzvariabilität durch Exposition gegen Endotoxin könnte durch eine autonome Dysfunktion und Veränderungen am zentralen Nervensystem oder direkt durch die Interaktion mit der Zielzelle bedingt sein (Werdan et al., 2009). Auf zellulärer Ebene reduziert Endotoxin die Schlagfrequenz von Herzmuskelzellen (Schmidt et al., 2007), was für einen direkten Einfluss von LPS auf die Bildung von Schrittmacherpotenzialen am Herzen spricht.

1.4.1 EFFEKT VON LPS AUF DEN SCHRITTMACHERSTROM I_f

Der in vitro-Effekt von LPS auf I_f wurde an humanen Myozyten des rechten Atriums erstmals 2007 untersucht (Zorn-Pauly et al., 2007). Menschliche Vorhofmuskelzellen aktivieren nach mehrstündiger Inkubation mit 1 μ g/ml oder 10 μ g/ml LPS im Vergleich zu Kontrollzellen langsamer und bei negativeren Membranpotenzialen. Eine Konzentration von 100 μ g/ml zeigte sich zytotoxisch. Die maximale Leitfähigkeit war nicht beeinflusst. Zudem zeigte sich ein vermehrtes Ansprechen der mit 10 μ g/ml LPS inkubierten Zellen auf Isoprenalin. Im mathematischen Modell einer Sinusknoten-Schrittmacherzelle des Kaninchens führte die Verschiebung der halbmaximalen Aktivierung von I_f in negativere Potenzialbereiche zu einer Zunahme der Zykluslänge (cycle length, CL) des Aktionspotenzials. An HL-1 Zellen, einer immortalisierten Zelllinie von Kardiomyozyten der Maus, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Gabe von LPS die Aktivierung von I_f verzögert und die Deaktivierung beschleunigt. Dieser Effekt tritt schon nach mehreren Minuten auf (Wongergem et al., 2010).

2 ZIELSTELLUNG

Nachdem erstmals der direkte Einfluss von LPS auf den Schrittmacherstrom I_f gezeigt werden konnte (Zorn-Pauly et al., 2007), war es Ziel dieser Arbeit, diesen Effekt näher zu untersuchen. Dies sollte nun nicht auf Ebene der Vorhofmuskelzellen, sondern auf der Ebene des molekularen Korrelats von I_f , der HCN-Kanäle, geschehen. Es wurden stabil mit cDNA des hHCN2-Kanals transfizierte Klone der HEK293-Zelllinie gewählt. An nativen HEK 293-Zellen konnte I_f nicht nachgewiesen werden (Varghese et al., 2006). Um mit der Arbeit von Zorn-Pauly (Zorn-Pauly et al., 2007) vergleichbare Ergebnisse zu erreichen, wurde der hHCN2-Kanal untersucht, der im menschlichen Vorhofgewebe am stärksten exprimiert wird (Li et al., 2015). Es sollte untersucht werden, unter welchen Voraussetzungen LPS einen Effekt auf I_{hHCN2} erzielen kann (z.B. Aufbereitung der LPS-Stammlösung und Inkubationsdauer). Der Eintritt des Effektes sollte zeitlich untersucht werden. Der Einfluss von LPS auf wesentliche elektrophysiologische Zielparameter von I_{hHCN2} , wie z.B. Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik, stationäre Aktivierungskurve und Maximalstrom, sollte näher charakterisiert werden. Schließlich galt es den konzentrationsabhängigen Einfluss von LPS auf diese Parameter untersucht werden. Aufgrund der starken Variabilität der stationären Aktivierungskurve ($\Delta V_{0,5}$) zwischen unterschiedlichen Zellen gelang es in diesem Versuchsaufbau nicht, diskrete Änderungen der Aktivierungskinetik nach Exposition gegen geringe Dosen LPS zu detektieren. Die Unterschiede der stationären Aktivierung waren zwischen unterschiedlichen Zellen stärker ausgeprägt als vor und nach Exposition gegen geringe Dosen LPS. So musste eine Messkonfiguration für elektrophysiologische Langzeitexperimente mit Lösungsaustausch entwickelt werden, die den direkten Vergleich elektrophysiologischer Zielparameter an einer Zelle vor und nach Exposition gegen LPS ermöglichte.

3 MATERIAL UND METHODIK

3.1 CHEMIKALIEN UND PHARMAKOLOGISCHE SUBSTANZEN

Tabelle 1 Chemikalien und pharmakologische Substanzen

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Firma
CaCl ₂	147,02	Merck - Gruppe, Darmstadt
EDTA	372,24	Sigma-Aldrich, Einthofen
EGTA	380,04	Sigma-Aldrich, Einthofen
Glukose	180,16	Sigma-Aldrich, Einthofen
HEPES	238,3	Sigma-Aldrich, Einthofen
KCl	74,55	Merck - Gruppe, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	136,1	Sigma-Aldrich, Einthofen
MgCl ₂	203,3	Merck - Gruppe, Darmstadt
Na ₂ ATP	765,39	Sigma-Aldrich, Einthofen
NaCl	58,44	Merck - Gruppe, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	137,99	Merck - Gruppe, Darmstadt
Trypsin	14476 Units/mg protein	Sigma-Aldrich, Einthofen

3.2 ZUSAMMENSETZUNG DER LÖSUNGEN

Tabelle 2 Zusammensetzung der Lösungen für die Zellkultur

	EDTA-Waschpuffer	Trypsinlösung 0,1%	HEPES-Ringer
CaCl ₂ x2H ₂ O	-	-	1,2
EDTA	0,54	0,54	-
Glukose xH ₂ O	-	-	5,5
HEPES	-	-	10
KCl	2,68	2,68	5,4
KH ₂ PO ₄	1,47	1,47	-

	EDTA-Waschpuffer	Trypsinlösung 0,1%	HEPES-Ringer
MgCl ₂ x6H ₂ O	-	-	0,8
NaCl	137	137	122,5
Na ₂ HPO ₄ xH ₂ O	8,33	8,33	1
pH-Einstellung	-	-	NaOH (pH=7,4 bei 37°C)
Streptomycin	10 mg/l	-	-
Trypsin	-	0,1% (v/v)	-

Tabelle 3 Zusammensetzung der Lösungen für die elektrophysiologischen Experimente

	Badlösung (Tyrode, Extrazellulärlösung)	Pipettenlösung (Intrazellulärlösung)
CaCl ₂ x2H ₂ O	1,8	-
EGTA	-	1
Glukose	10	-
HEPES	5	10
KCl	30	140
KH ₂ PO ₄	-	-
MgCl ₂ x6H ₂ O	0,5	6
Na ₂ -ATP	-	5
NaCl	110	-
pH-Einstellung	NaOH (pH 7,4 bei 20°C)	KOH (pH = 7,2 bei 20°C)

3.3 HERSTELLUNG DER LIPOPOLYSACCHARID-STAMMLÖSUNG

Tabelle 4 Verwendete Lipopolysaccharide

	LPS 2630	LPS 3012
Firma	Sigma-Aldrich, Einthofen	Sigma-Aldrich, Einthofen
E.coli Serotyp	Escherichia coli 0111:B4	Escherichia coli 0111:B4
Endotoxingehalt	>500 000EU/mg	>500 000EU/mg
Gehalt an denaturierten Proteinen	<1%	<1%
RNA-Gehalt	60%	10-20%
Extraktionsmethode/ Aufreinigung	Phenolextraktion	Phenolextraktion und Gelchromatografie

In den elektrophysiologischen Experimenten wurde überwiegend LPS 2630 verwendet. Die Präparationsmethode der LPS-haltigen Badlösung wurde im Rahmen der Dissertation modifiziert. Aus dem LPS-Pulver wurde zunächst eine Stammlösung (5mg/ml, MolBio-Wasser, Sigma-Aldrich) hergestellt, diese wurde bei 9°C aufbewahrt. Am Tag des Experiments wurde die Stammlösung im Inkubationsmischer (TS 100 Thermo Shaker, Peqlab, Erlangen) bei 100°C für 60min gekocht und geschüttelt, um mögliche Mizellen aufzubrechen. Anschließend wurde diese zunächst in Badlösung (Tyrode) zur Zielkonzentration verdünnt. Unmittelbar vor dem Experiment wurde die LPS-haltige Badlösung erneut bei Raumtemperatur mit 2900U/min durchmischt (IKA MS2 Mini Shaker, Gemini BV, Apeldoorn, NL).

3.4 KULTIVIERUNG DER HEK-293-ZELLEN

Die elektrophysiologischen Experimente wurden an nativen HEK293-Zellen und stabil mit cDNA des hHCN2-Kanals transfizierten Klonen der HEK293-Zelllinie durchgeführt. Die stabil transfizierten Zellklone wurden freundlicherweise durch PD Dr. Juliane Stieber vom Institut für Klinische und Experimentelle Pharmakologie der Universität Erlangen bereitgestellt. Die HEK-293-Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Als Nährmedium diente DMEM/Ham's F12-Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Nutrient Mixture F-12, PAA, Pasching, Österreich). Diesem wurde 10% FCS zugesetzt (DMEM- Ham's-F12-+-Medium). Das Medium wurde spätestens nach 72h ausgetauscht.

Wenn der Boden der Zellkulturschale (Ø 10cm, Falcon, Colorado, USA) dicht bewachsen war, wurden die Zellen passagiert. Nach dem vorsichtigen Entfernen des Nährmediums wurden 5ml EDTA-Waschpuffer hinzugegeben. Dieser wurde nach 3min entfernt und 10 Tropfen (ca. 0,5ml) Trypsin-Lösung appliziert. Sie wurde belassen bis die Zellpopulation sich durch sanftes Klopfen vom Boden der Zellkulturschale ablösen ließ. Anschließend wurde 8 ml DMEM- Ham's-F12-+-Medium hinzugegeben. Die Zellen wurden durch kraftvolles Pipettieren vereinzelt, 1ml der Zellsuspension wurden mit 10ml DMEM- Ham's-F12-+-Medium in der neuen Zellkulturschale ausgesät. Für die elektrophysiologischen Experimente wurden die Zellen am Vortag in kleine Zellkulturschalen (Ø 3,5cm) in DMEM-Ham's-F12-Medium ohne den Zusatz FCS ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellkulturschale wurde unmittelbar vor Beginn des Experiments aus dem Brutschrank entnommen. Nach etwa 20 Passagen wurde die Zelllinie verworfen.

3.5 PATCH-CLAMP-EXPERIMENTE

3.5.1 VERSUCHSAUFBAU UND VERWENDETE GERÄTE

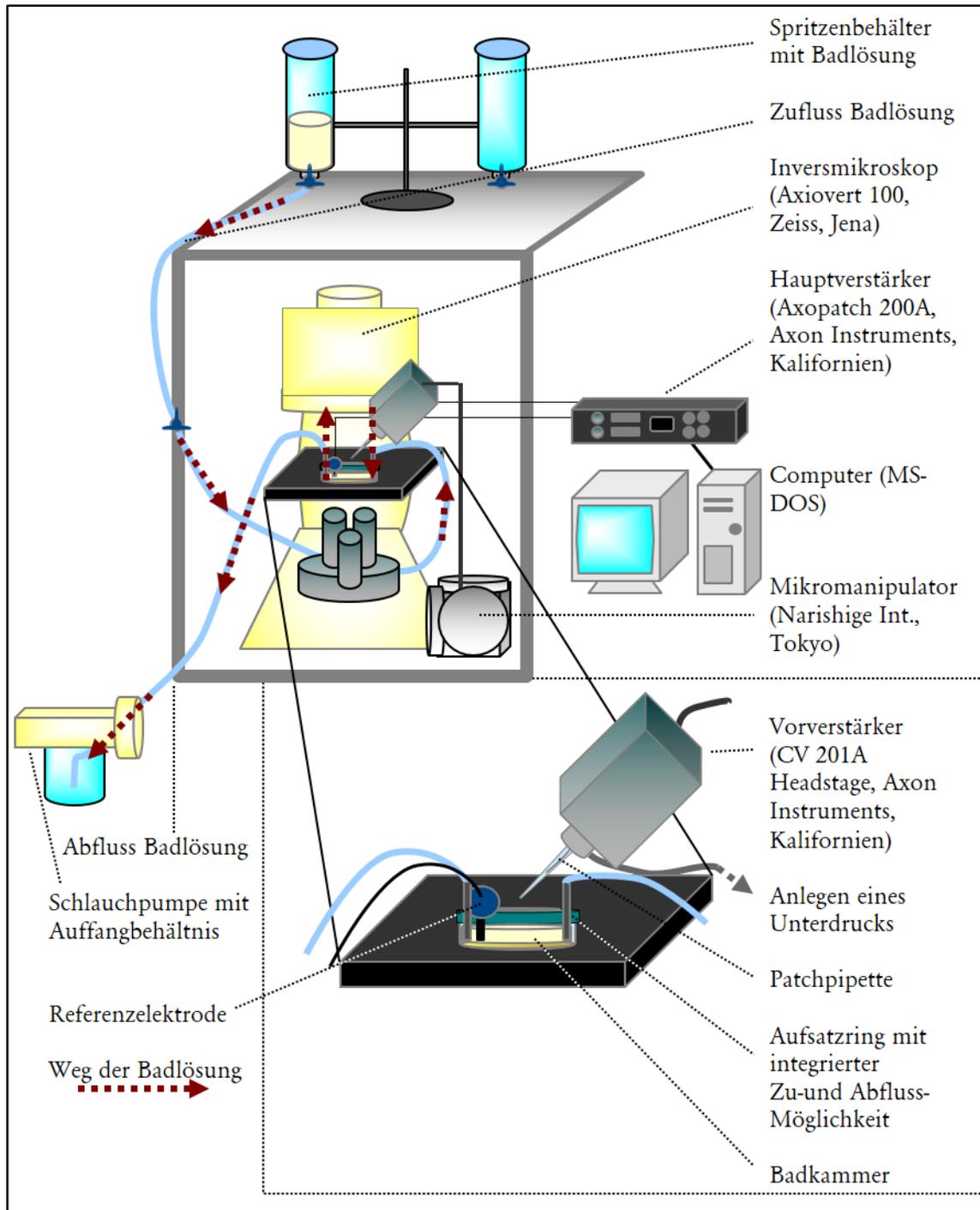


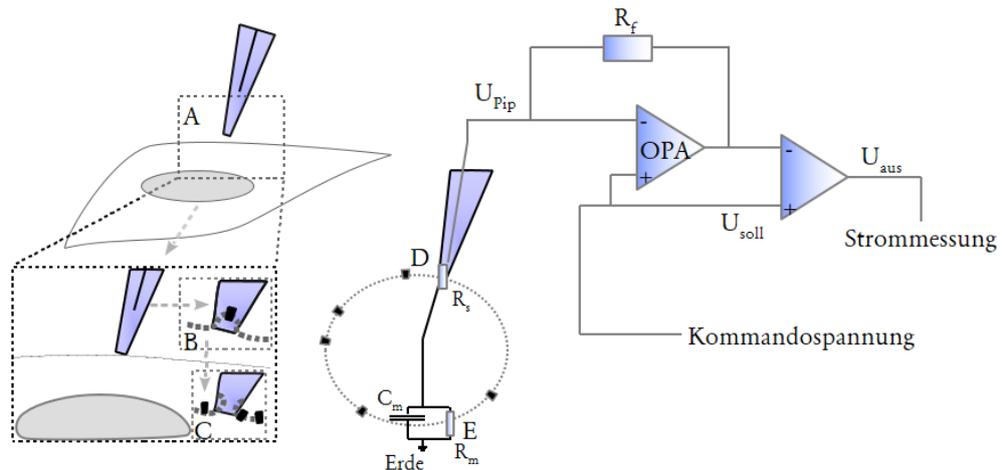
Abbildung 2 Schematischer Aufbau des patch-clamp-Messplatzes mit den Modifikationen für die Langzeitexperimente

Das Inversmikroskop befand sich auf einem durch Luftkissen schwingungsgedämpften Tisch in einem Faraday'schen Käfig. Als Badkammer diente die Zellkulturschale (\varnothing 3,5cm). Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur (20-24°C) durchgeführt. Die Zellkulturschale wurde wenige Mi-

nuten vor Beginn des Experimentes aus dem Brutschrank entnommen und auf Konfluenz und Vitalität überprüft. Ideal hat sich ein überwiegend konfluierender Zellrasen mit isoliert liegenden, fest haftenden Einzelzellen herausgestellt. Ein umgebender Zellverbund ohne direkten Kontakt zur Zielzelle und ein spindelförmiges Aussehen der Zielzelle erwies sich als günstig. Das Zellkulturmedium wurde am Messplatz entfernt und die Badkammer mit Badlösung befüllt. Die Messselektrode aus chloriertem Silberdraht befand sich in der mit Elektrodenlösung gefüllten Glaspipette, die Referenzelektrode (Silber/Silberchlorid-Pellet, Science Products, Hofheim) in der Badlösung der Zellkulturschale. Ein mechanischer Mikromanipulator (Narishige International, Tokyo, Japan) ermöglichte das Manövrieren des Pipettenhalters in allen drei Ebenen.

3.5.2 HERSTELLUNG DER PATCHPIPETTEN

Die Glaspipetten wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Hilgenberg, Malsfeld; $\varnothing_{\text{Innen}} 1\text{mm}$ $\varnothing_{\text{Außen}} 2\text{mm}$) mit einem automatischen Elektrodenziehgerät (DMZ Universal Puller, Zeitz Instruments, München) hergestellt und anschließend am aufrechten Lichtmikroskop manuell nachpoliert. Der elektrische Widerstand der sich in der Badlösung befindlichen Patchpipette lag bei $2\text{-}4\text{M}\Omega$.



▀ Schematische Darstellung eines Ionenkanals

Abbildung 3 Links: Erreichen der whole-cell-Konfiguration. Die Patchpipette nähert sich der Zielzelle (A). Durch Druck auf die Zellmembran und Anlegen eines Unterdrucks an das Innere der Patchpipette stülpt sich ein Teil der Zellmembran omega-förmig in die Spitze der Patchpipette. So entsteht eine hochohmige Verbindung zwischen dem Glas der Patchpipette und der Zellmembran (gigaseal), die cell-attached-Konfiguration der patch-clamp-Technik ist erreicht (B).

Durch erneuten Unterdruck wird der Membranfleck (patch) aufgerissen, ohne dass der gigaseal zerstört wird, die whole-cell-Konfiguration der patch-clamp-Technik ist erreicht (C). In dieser Konfiguration ist die Lösung im Zellinneren mit der Lösung im Inneren der Patchpipette verbunden. Es besteht ein direkter elektrischer Zugang zur Zellmembran. So kann das Potenzial der gesamten Zellmembran kontrolliert werden. Die Experimente in dieser Arbeit wurden in der whole-cell-Konfiguration der patch-clamp-Technik durchgeführt.

Rechts: Vereinfachtes Ersatzschaltbild für whole-cell-Konfiguration und Funktionsprinzip des patch-clamp-Verstärkers. Durch Fragmente von Zellsoma und Zellmembran in der Öffnung der Patchpipette entsteht der Serienwiderstand R_s (D). Die Zellmembran gleicht einem Kondensator mit der Membrankapazität C_m und dem Membranwiderstand R_m (E).

Über den Operationsverstärker (OPA) wird sowohl ein Kommandopotenzial vorgegeben (U_{soll}), als auch das aktuelle Membranpotenzial und der über die Zellmembran fließende Strom registriert (U_{pip} über den Rückkopplungswiderstand R_f zum Ausgangspotenzial U_{aus}). **Abbildung 3** modifiziert nach Numberger und Draguhn, 1996.

3.5.3 PRINZIP UND ERREICHEN DER WHOLE-CELL-KONFIGURATION

Die Patchpipette wurde mit Elektrodenlösung befüllt. In der 200xVergrößerung wurde eine passende Zielzelle ausgewählt und die Patchpipette mit Hilfe des mechanischen Mikromanipulators in deren Nähe bewegt. Nach Eintauchen der Patchpipette in die Badlösung wurde zuerst der Pipetten-offset im voltage-clamp-Modus kompensiert. Offset-Potenziale bilden sich an Übergängen in der Messapparatur aus (Silberdraht-Elektrodenlösung oder Badlösung-Erdungselektrode). Zur Kompensation der offset-Potenziale wurde zuerst mit einer Frequenz von 1Hz ein rechteckiger Testpuls von 100ms Länge und einer Spannung von 10mV repetitiv appliziert. Das Stromsignal

konnte auf einem Computerbildschirm beobachtet werden. Mittels des Pipetten-offset-Potentiometers des patch-clamp-Verstärkers wurde dann solange das Potenzial verändert, bis der Strompuls die Nulllinie (0 pA) erreicht hatte. Bei diesem Potential fließt kein Strom mehr zwischen Pipetten- und Badlösung. Das Offset-Potenzial ist jetzt kompensiert. Anschließend wurde der elektrische Widerstand der Patchpipetten mittels des Softwareprogramms berechnet.

In der 400xVergrößerung wurde die Patchpipette sanft auf die Oberfläche der Zielzelle aufgesetzt. Es wurde ein dosierter Druck auf die Zelloberfläche ausgeübt (cell-attached-Konfiguration). Über eine am Pipettenhalter befestigte 1ml-Spritze wurde ein Sog ausgeübt, so dass die Zellmembran sich dicht um die Öffnung der Patchpipette schmiegt (gigaseal). Durch erneutes Applizieren eines Unterdrucks wurde die Zellmembran durchgerissen, dieser Zeitpunkt galt als Start des Experiments.

Durch Strominjektion über die Patchpipette wurde zwischen Intrazellulär (Patchpipette) und Extrazellulär (Referenzelektrode in der Badlösung) ein Sollpotenzial vorgegeben (voltage clamp). Das Prinzip des patch-clamp-Verstärkers ermöglicht die nahezu simultane Registrierung des aktuellen Membranpotenzials und Strominjektion bis Sollwert und Membranpotenzial übereinstimmen (Numberger und Draguhn, 1996). In der whole-cell-Konfiguration entspricht der durch die Patchelektrode injizierte Strom dem über die komplette Zellmembran fließenden Strom. Die Eingangskapazität der HEK293-Zelle und der Serienwiderstand wurden registriert. Der Serienwiderstand R_s lag zwischen 4 und 10M Ω . Nach dem Registrieren von R_s wurde dieser maximal kompensiert (>95%). Die Eingangskapazität C_m der HEK293-Zellen lag zwischen 10-15pF. Das Signal wurde durch einen in den Hauptverstärker integrierten Tiefpass-Bessel-Filter bei 1kHz gefiltert. Liquid-junction-Potenziale wurden nicht korrigiert.

3.5.4 ANALYSE DER DATEN UND STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Generierung, Aufzeichnung und Auswertung der Spannungs- und Stromsignale am Messplatz geschah durch einen MS DOS-PC mit AD- und DA-Wandlern der Firma MFK (Niederhausen) mit der „ISO2 Multitasking Patch-Clamp Software“. Bei der Analyse der tail-Stromamplituden wurde zu einem definierten Zeitpunkt im Pulsprotokoll der Mittelwert aus sieben umliegenden Messpunkten gebildet, um zufällige Fehler beim Registrieren der Stromamplitude zu minimieren. Die Amplituden der tail-Ströme wurden um die Stromamplitude bei -40mV korrigiert. Diese entspricht am ehesten der Leckleitfähigkeit, d.h. einer unspezifischen Hintergrundleitfähigkeit, da bei diesem Membranpotenzial ein Öffnen der HCN2-Kanäle nicht zu erwarten ist. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte in der Software „Origin 6.0“ (Microcal TM, Northampton, MA, USA). Sofern nicht anders angegeben sind alle Daten als Mittelwert \pm SEM angegeben. Statistische Unterschiede wurden mit dem t-Test ermittelt. p-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3.5.5 MODIFIKATION DER VERSUCHSANORDNUNG FÜR LANGZEITEXPERIMENTE

In den bisherigen Publikationen wurde I_f bei Zellen mit LPS-Exposition und I_f bei Zellen ohne LPS-Exposition verglichen (Zorn-Pauly et al., 2007; Klöckner et al., 2011). Im Rahmen der Datenerhebung wurde deutlich, dass sich mit dieser Versuchsanordnung diskrete Modifikationen der Kanalkinetik und konzentrationsabhängige Unterschiede der elektrophysiologischen Zielparame-ter, v.a. der stationären Aktivierungskurve, nicht abbilden ließen. Ziel war es, I_f an derselben Zelle vor und nach LPS-Exposition zu untersuchen. Dazu war ein Austausch der Badlösung während des laufenden patch-clamp-Experiments notwendig. Aufbau und Ablauf des Versuchs wurden deutlich gegenüber des etablierten Kurzzeitexperiments mit dem Vergleich von unterschiedlichen Zellen mit und ohne Exposition gegen LPS modifiziert.

Die als Badkammer dienende Zellkulturschale wurde zunächst um einen Aufsatzring mit integrierter Zu- und Abflussmöglichkeit erweitert (siehe **Abbildung 2**). Nach Entfernen des Zellkulturmediums wurde die Badkammer manuell mit 1ml Badlösung befüllt und in den Objektisch des Inversmikroskops eingesetzt. Die Badlösung befand sich in offenen Spritzenbehältern auf dem Dach des Aluminiumkäfigs. Der Zufluss der Badlösung wurde durch Öffnen der Dreiwegehähne und kurzzeitiges Einsetzen und Druck des Spritzenkolbens in Gang gebracht. Anschließend wurde der Spritzenkolben aus dem Lösungsbehälter entfernt. Für den Abfluss der Badlösung während des Lösungsaustauschs wurde eine elektrische Schlauchpumpe verwendet. Die Kinetik des Zu- und Abflusssystems wurde mit Phenolrot untersucht. Je nach Füllstand des Spritzenbehälters ergab sich eine Flussrate von 3-4ml/min. Das Eintreffen der Lösung aus dem neuen Spritzenbehälter wurde durch aufsteigende Luftbläschen signalisiert. Bis zum Eintreffen dauert es ca. 45s, bis zum kompletten Austausch der Lösung in der Badkammer ca. 2min. Im elektrophysiologischen Experiment wurde die Badlösung für mindestens 4min in Fluss gehalten, um einen vollständigen Lösungsaustausch in der Badkammer zu gewährleisten.

3.5.6 STANDARDISIERTER ABLAUF EINES LANGZEITEXPERIMENTS

Alle Langzeitexperimente an ein und derselben Zelle folgten dabei prinzipiell demselben standardisierten Versuchsablauf:

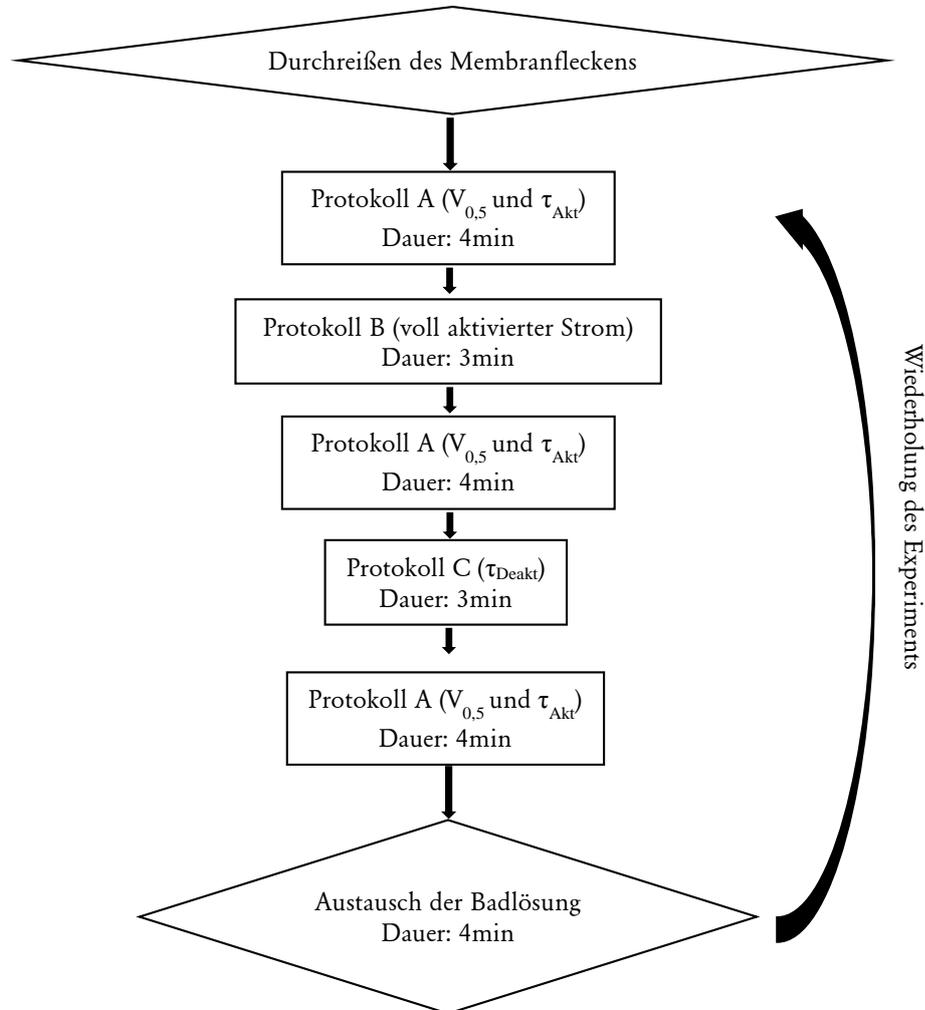


Abbildung 4 Ablauf eines Experiments an einer Zelle vor und nach LPS-Exposition

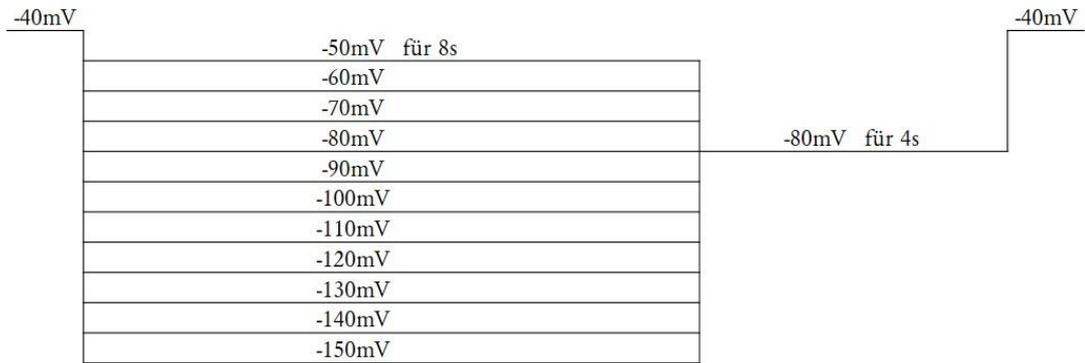
Je nach aktueller Fragestellung und Konstitution der Zelle wurde die Abfolge der Pulsprotokolle verändert bzw. das Experiment auf bestimmte Pulsprotokolle beschränkt.

Je nach konkreter Fragestellung des geplanten Experimentes und Konstitution der Zelle wurde das Experiment auf bestimmte Pulsprotokolle beschränkt. Insbesondere Pulsprotokolle mit zahlreichen Hyperpolarisationsschritten (wie z.B. das Protokoll für den vollaktivierten Strom) waren besonders belastend für die Zelle und wurden daher nicht in jedem Experiment erhoben. Mit jedem Pulsprotokoll stieg das Risiko für den Zelltod bzw. die Zerstörung des gigaseals. In Abhängigkeit von der Zahl der verwendeten Pulsprotokolle belief sich die Dauer eines kompletten Versuchs im Idealfall auf 45min, im Extremfall wurde die letzte Messung nach 120min abgeschlossen. Der Lö-

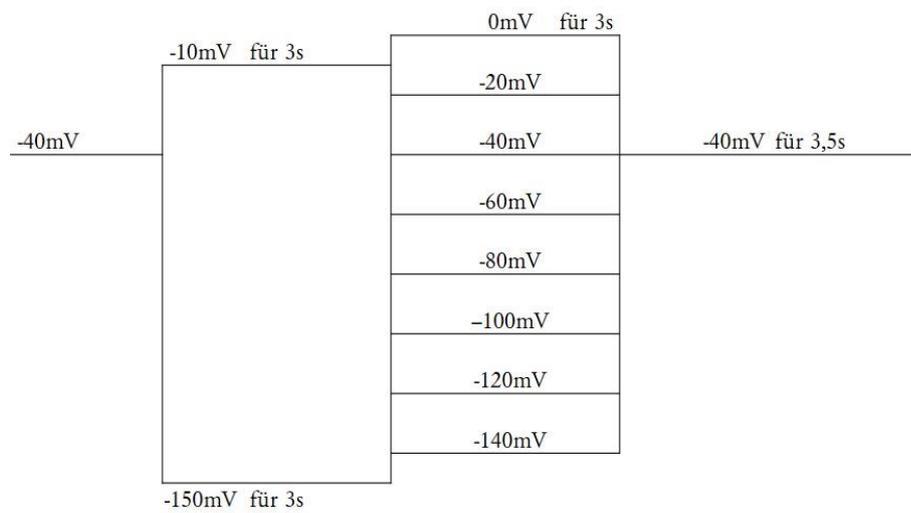
sungswechsel musste möglichst sanft geschehen, damit Zelle und gigaseal keinen Schaden nahmen. Vor allem nach dem Lösungswechsel musste das Auftreten und Vergehen von instantanen Strömen, die I_{hHCN2} überlagern, abgewartet werden (siehe Kapitel 4.4). Pulsprotokolle mit sehr hohem Leckstromanteil wurden verworfen. Die Osmolalität von Badlösung und Pipettenlösung beeinflussten das Überleben der Zelle und die Stabilität des gigaseal ebenfalls, da in der whole-cell-Konfiguration das Zellsoma durch Pipettenlösung ersetzt wird. Die Osmolalität von Pipettenlösung und Badlösung wurden stichprobenartig ermittelt. Günstig erwies sich für die Badlösung eine Osmolalität von 280mosm/kg und für die Pipettenlösung von 300mosm/kg. Das Wandern der Patchpipette um Bruchteile von Millimetern über einen längeren Zeitraum bezeichnet man als Drift. Driftphänomene der Patchpipette spielen bei Kurzzeitmessungen eine untergeordnete Rolle, bei Langzeitmessungen können sie zur mechanischen Zerstörung des gigaseals und damit zum Ende des Experiments führen, ebenso kleinste Erschütterungen oder Vibrationen. Die Langzeitmessungen mit Lösungsaustausch waren daher wesentlich aufwändiger und anspruchsvoller als die Kurzzeitexperimente.

3.5.7 PULSPROTOKOLLE UND ELEKTROPHYSIOLOGISCHE PARAMETER

A



B



C

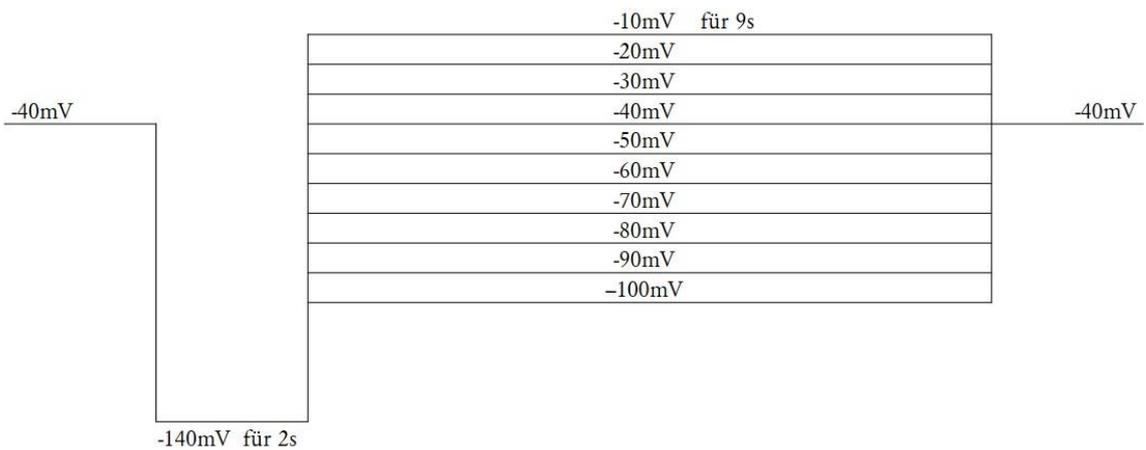


Abbildung 5 Verwendete Pulsprotokolle

- A Bestimmung der Aktivierungszeitkonstante, der Strom-Spannungs-Beziehung und stationären Aktivierungskurve
- B Bestimmung des Umkehrpotenzials und Maximalstroms
- C Bestimmung der Deaktivierungszeitkonstante

Im Pulsprotokoll A wurde ausgehend vom Haltepotenzial -40mV für 8s auf das Testpotenzial hyperpolarisiert. Anschließend wird bei -80mV für 4s der tail-Strom (I_{tail}) aufgezeichnet. Die Amplitude des tail-Stroms erlaubte direkten Rückschluss auf die Offenwahrscheinlichkeit der HCN2-Kanäle beim jeweiligen Testpotenzial, da diese kurz nach Ende des Testpotenzial aufgrund ihres verzögerten Schließverhaltens noch geöffnet waren und der Einfluss der elektrochemischen Triebkraft eliminiert war, da alle tail-Ströme beim selben Membranpotenzial aufgezeichnet wurden. Es gilt:

$$I_{\text{tail}} = n_{\text{hHCN2}} \times g_{\text{hHCN2}} \times p_{\text{hHCN2}} \times (V_{\text{tail}} - E_{\text{hHCN2}})$$

n_{hHCN2} ...	Anzahl der auf der Zelle exprimierten hHCN2-Kanäle
g_{hHCN2} ...	Einzelleitfähigkeit des hHCN2-Kanals
p_{hHCN2} ...	Offenwahrscheinlichkeit des hHCN2-Kanals
V_{tail} ...	Membranpotenzial bei Aufzeichnung des tail-Stroms (-80mV)
E_{hHCN2} ...	Gleichgewichtspotenzial des Stroms durch einen hHCN2-Kanal

Konstant bleiben die Anzahl der Ionenkanäle, die Leitfähigkeit der Einzelkanäle und das Gleichgewichtspotenzial des Stroms durch einen hHCN2-Kanal, das durch die intrazelluläre und extrazelluläre Na^+ - und K^+ -Ionenkonzentration bestimmt wird. Somit sind Änderungen der tail-Stromamplitude auf Änderungen der Offenwahrscheinlichkeit der hHCN2-Kanäle zurückzuführen.

Pulsprotokoll B bestand aus einem Aktivierungsschritt (-140mV) oder Deaktivierungsschritt (-10mV) mit anschließendem Testpotenzial. ΔI_{tail} entspricht dem maximalen I_{hHCN2} für das jeweilige Testpotenzial. Der Aktivierungs- und Deaktivierungsstromverlauf, hervorgerufen durch Anwendung des Pulsprotokoll A bzw. C, konnte monoexponentiell gefittet werden. Die Aktivierungskurve wurde unter Annahme einer sigmoidalen Dosis-Wirkungsbeziehung mit der modifizierten Boltzmann-Funktion aus den tail-Stromamplituden des Pulsprotokolls A bestimmt.

$$I_{\text{tail}}(V) = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(V - V_{0,5})/s}}$$

I_{tail} ...	tail-Stromamplitude
A_1 ...	maximale Stromamplitude
A_2 ...	offset des Haltestroms
V ...	Testpotenzial
$V_{0,5}$...	Potenzial der halbmaximalen Aktivierung
s ...	Neigungsfaktor

Beim Vergleich mehrerer Zellen wurden die tail-Stromamplituden in Bezug auf die maximale tail-Stromamplitude ($A_1 - A_2$) normalisiert und die fraktionelle Aktivierung bestimmt. Im Pulsprotokoll B wurde entweder nach anfänglicher Aktivierung (-150mV) oder Deaktivierung (-10mV) die Stromamplitude beim Testpotenzial (0 bis -140mV) bestimmt. Aus der Differenz der Amplituden von Aktivierung und Deaktivierung ergab sich die maximale Stromamplitude für I_{hCN2} beim jeweiligen Testpotenzial. Im Pulsprotokoll C wurde nach vollständiger Aktivierung bei -140mV mittels monoexponentiellem fitting die Deaktivierungszeitkonstante beim folgenden Testpotenzial bestimmt.

4 ERGEBNISSE

4.1 EINTRITT DES EFFEKTES

Zunächst wurde untersucht, ob das Austauschen der Badlösung einen Effekt auf die Aktivität von hHCN2-Kanälen hat. Das Membranpotenzial wurde während des Lösungswechsels bei -90mV gehalten. Es folgt die Stromaufzeichnung während des Lösungsaustauschs.

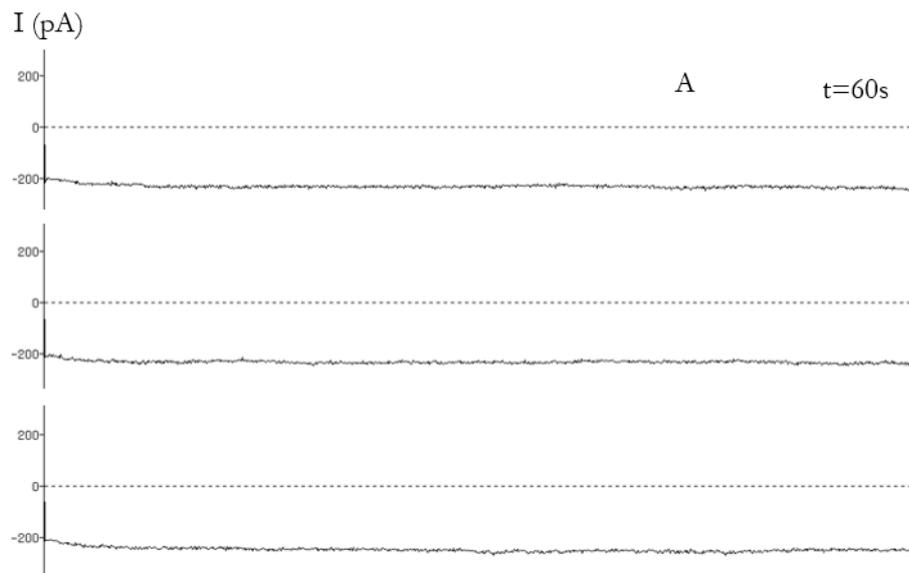


Abbildung 6 Beispiel für kontinuierlich aufgezeichnete Stromspuren während des Lösungsaustauschs ($0\mu\text{g/ml LPS} \rightarrow 0\mu\text{g/ml LPS}$). Eine Stromspur entsprach 60s, Zeitpunkt **A**: Eintreffen der Badlösung aus dem neuen Behälter.

Die einzelnen Stromspuren entsprechen der kontinuierlichen Stromaufzeichnung von drei aufeinanderfolgenden Minuten. Während der Zeit des Lösungsaustauschs blieb die Stromamplitude konstant bei -200pA. Der Austausch der Badlösung ohne den Zusatz von LPS hatte keinen Einfluss auf die Amplitude von I_{hHCN2} .

Auch nach mehreren Minuten und damit erfolgtem vollständigem Lösungsaustausch zeigte sich keine Änderung der aufgezeichneten Stromamplitude. Der alleinige Austausch der Badlösung hatte somit keinen Effekt auf I_{hHCN2} .

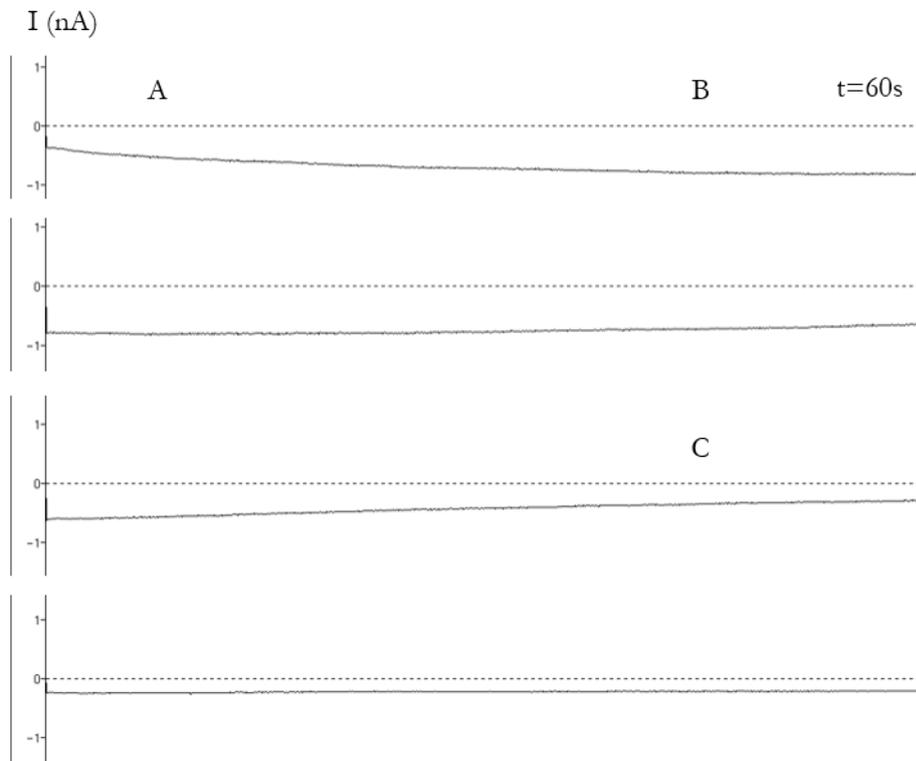


Abbildung 7 Beispiel für kontinuierlich aufgezeichnete Stromspuren während des Lösungsaustauschs auf $50\mu\text{g/ml}$ LPS ($0 \rightarrow 50\mu\text{g/ml}$ LPS)

Eine Stromspur entsprach 60s. Das Membranpotenzial wurde bei -90mV gehalten. Zeitpunkt (**A**): Start des Lösungsaustauschs nach 8s, Zeitpunkt (**B**): Eintreffen der Badlösung mit $50\mu\text{g/ml}$ LPS in der Badkammer nach 40s. Zeitpunkt (**C**): vollständiger Lösungsaustausch.

Beim Austausch der Badlösung zu $50\mu\text{g/ml}$ LPS konnte nach dem Einschwemmen der Badlösung mit LPS eine deutliche Abnahme der Amplitude I_{hHCN2} registriert werden.

Beim Austausch der Lösung von $0\mu\text{g/ml}$ LPS auf $50\mu\text{g/ml}$ LPS und dem Halten des Membranpotenzials bei -90mV kam es zunächst zu einer Zunahme der Stromamplitude bis zum Maximum nach etwa 60s. In Vorexperimenten mit Phenolrot konnte gezeigt werden, dass es bis zum vollständigen Lösungsaustausch im Schälchen 2 Minuten dauerte. Während des Eintreffens der Badlösung bis zum vollständigen Lösungsaustausch konnte eine deutliche Reduktion der Stromamplitude von I_{hHCN2} beobachtet werden.

4.2 EINFLUSS VON LPS AUF AKTIVIERUNG

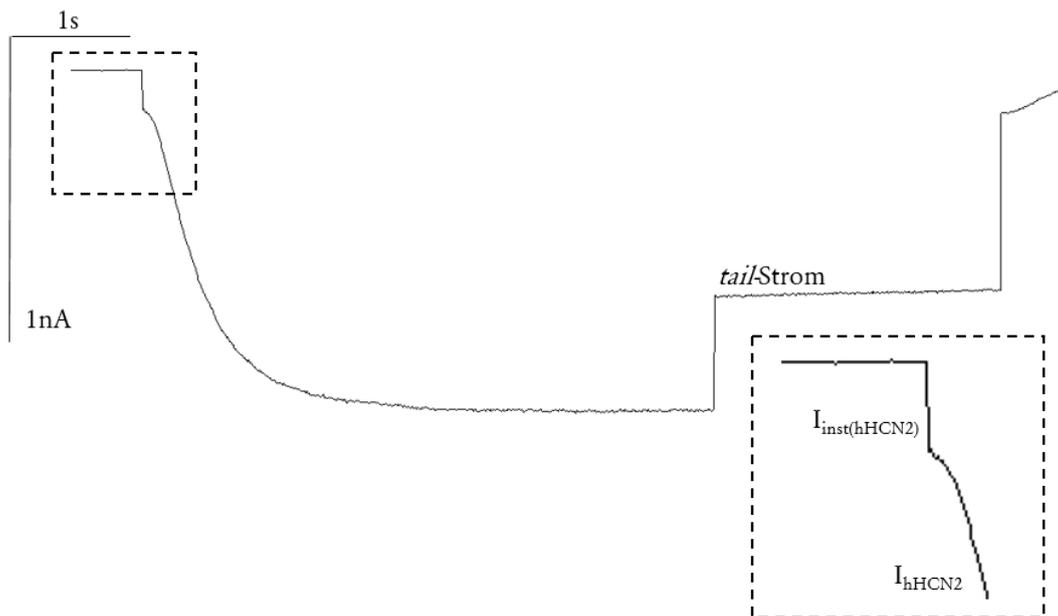


Abbildung 8 Aufzeichnung einer einzelnen Stromspur mit Pulsprotokoll A (Testpotenzial -100mV), Vergrößerung: instantaner Strom $I_{inst(hHCN2)}$ und I_{hHCN2}

Während der Aktivierungsphase beim Testpotenzial -100mV nahm die Amplitude von I_{hHCN2} rasch zu. Anschließend an jedes Testpotenzial folgte die Aufzeichnung des tail-Stroms bei -80mV.

Während der Aktivierungsphase im Pulsprotokoll A kam es zunächst zur raschen Aktivierung des instantanen Stroms $I_{inst(hHCN2)}$, anschließend folgte der langsamer aktivierende Strom I_{hHCN2} . Beim Potenzial -80mV wurde der tail-Strom aufgezeichnet.

Für eine komplette Spannungsserie ergab sich folgende Aufzeichnung:

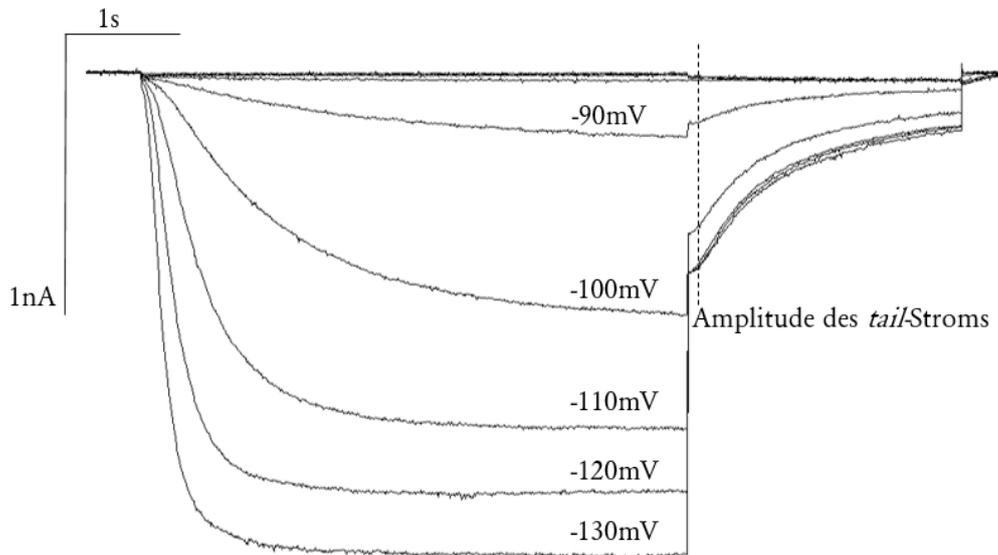


Abbildung 9 Beispiel für komplette Aufzeichnung einer Spannungsserie der Testpotenziale von -50 bis -130mV ($0\mu\text{g/ml}$ LPS in der Badlösung).

Im ersten Teil des Pulsprotokolls kam es zur langsamen Aktivierung von $I_{h\text{HCN}2}$ beim jeweiligen Testpotenzial. Im zweiten Teil wurde der tail-Strom bei -80mV aufgezeichnet. Da $I_{h\text{HCN}2}$ nur zögerlich abnimmt und der Einfluss der elektrochemischen Triebkraft für alle Testpotenziale gleich ist, erlaubte die registrierte tail-Stromamplitude direkten Rückschluss auf die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle.

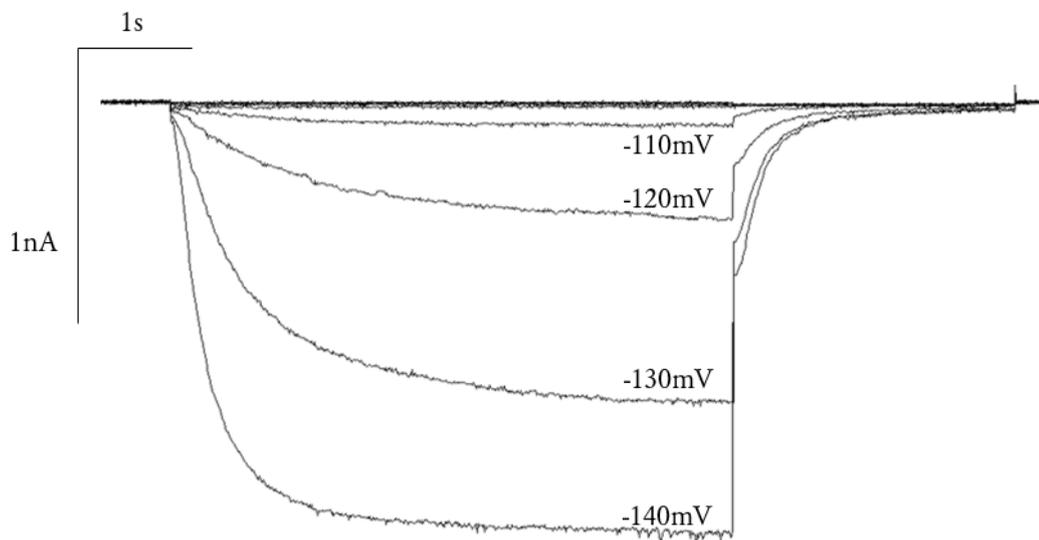


Abbildung 10 Beispiel für Aufzeichnung einer kompletten Spannungsserie der Testpotenziale -50mV bis -130mV nach Austausch der Badlösung auf $50\mu\text{g/ml}$ LPS

Beim selben Testpotenzial wurde $I_{h\text{HCN}2}$ im geringeren Ausmaß aktiviert. Im Vergleich zu Kontrollzellen waren beim selben Testpotenzial die Stromamplitude und die Amplitude des tail-Stroms deutlich reduziert. Nach Ende des Testpulses, bei Aufzeichnung des tail-Stroms, nahm die Amplitude von $I_{h\text{HCN}2}$ rascher ab, der tail-Strom verlief steiler. Im Vergleich zu Kontrollzellen deaktivierte $I_{h\text{HCN}2}$ erleichtert. Da der Einfluss von elektrochemischer Triebkraft bei Aufzeichnung des tail-Stroms eliminiert war, musste dies auf eine reduzierte Offenwahrscheinlichkeit der hHCN2-Kanäle nach Exposition gegen LPS zurückzuführen sein.

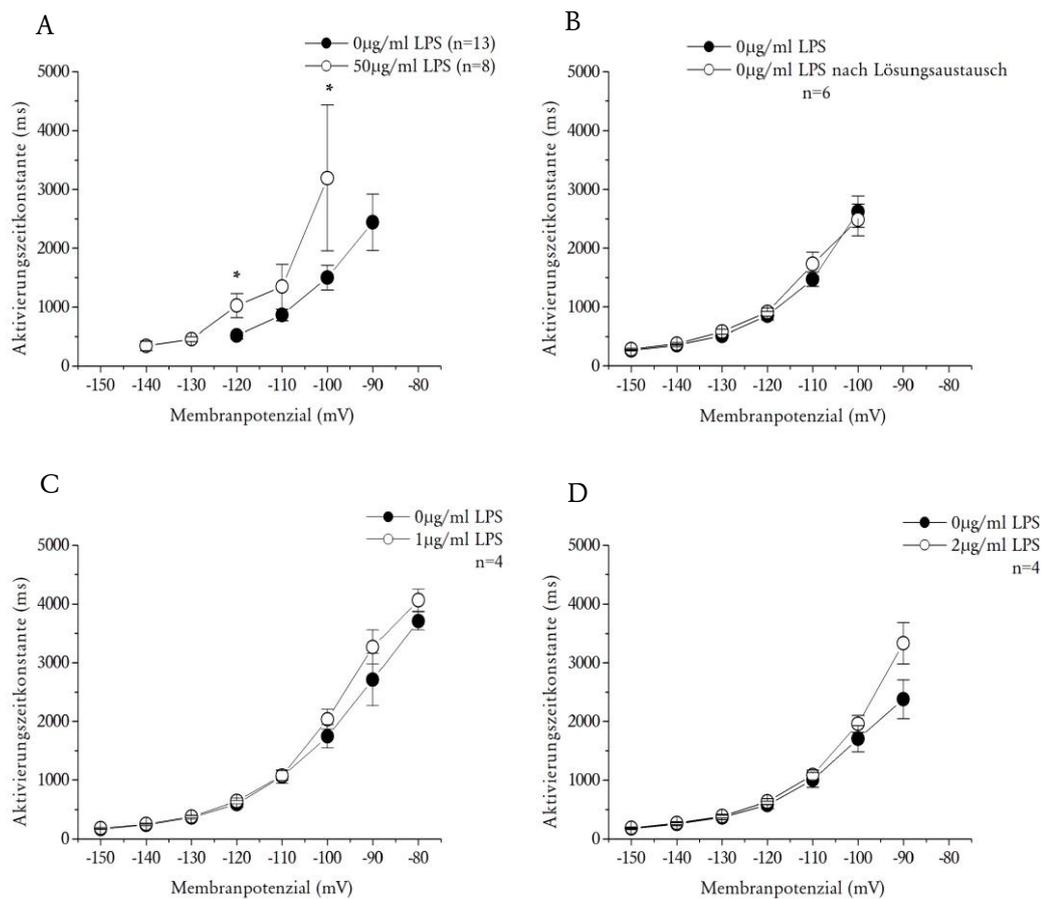


Abbildung 11 Aktivierungszeitkonstante: dosisabhängiger Effekt von LPS auf den Aktivierungsverlauf von I_{hHCN2}

A Vergleich von Zellen mit und ohne LPS-Exposition im Kurzzeitexperiment

B-D Vergleich an Zellen vor und nach LPS-Exposition im Langzeitexperiment

Mittelwert \pm SEM aus mehreren Pulsprotokollen für jede Zelle n

Die registrierten Aktivierungszeitkonstanten für I_{hHCN2} lagen im Sekundenbereich. Im Vergleich von Zellen mit Exposition gegen LPS (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und Zellen ohne Exposition gegen LPS ließ sich bei Exposition gegen LPS eine deutliche Zunahme der Aktivierungszeitkonstante feststellen. I_{hHCN2} aktivierte somit langsamer. Beim Vergleich an Zellen vor und nach Exposition gegen geringe Dosen LPS (1-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zeigte sich kein deutlicher Unterschied der Aktivierungszeitkonstanten.

fehlende Daten in A: Aktivierungszeitkonstante aus dem Pulsprotokoll mittels monoexponentiellem Fitting aufgrund des sehr zögerlichen Anstiegs der Aktivierungskurve nicht sinnvoll bestimmbar

Im Vergleich zu unbehandelten Zellen aktivierte I_{hHCN2} bei Exposition gegen 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS erst bei negativeren Membranpotenzialen. Bei Aufzeichnung des tail-Stroms deaktivierte I_{hHCN2} bei weniger negativen Membranpotenzialen und deutlich beschleunigt. Dies zeigte sich in einer reduzierten tail-Stromamplitude nach dem gleichen Testpotenzial und in einem steiler verlaufenden tail-Strom. Im Vergleich zu Kontrollzellen aktivierte I_{hHCN2} nach Exposition gegen LPS somit erschwert und deaktivierte erleichtert.

Im Vergleich von Kontrollzellen und Zellen mit Exposition gegen LPS verzögerte LPS den Aktivierungszeitverlauf. Bei einer LPS-Konzentration von 50µg/ml unterschieden sich die Aktivierungszeitkonstanten für zwei von sechs Membranpotenzialen statistisch signifikant. Beim Vergleich unterschiedlicher Zellen aktiviert IhHCN2 nach Exposition gegen LPS in hoher Konzentration deutlich langsamer und bei negativeren Membranpotenzialen. Der alleinige Austausch der Badlösung ohne den Zusatz von LPS hatte keinen Einfluss auf die Aktivierungskinetik.

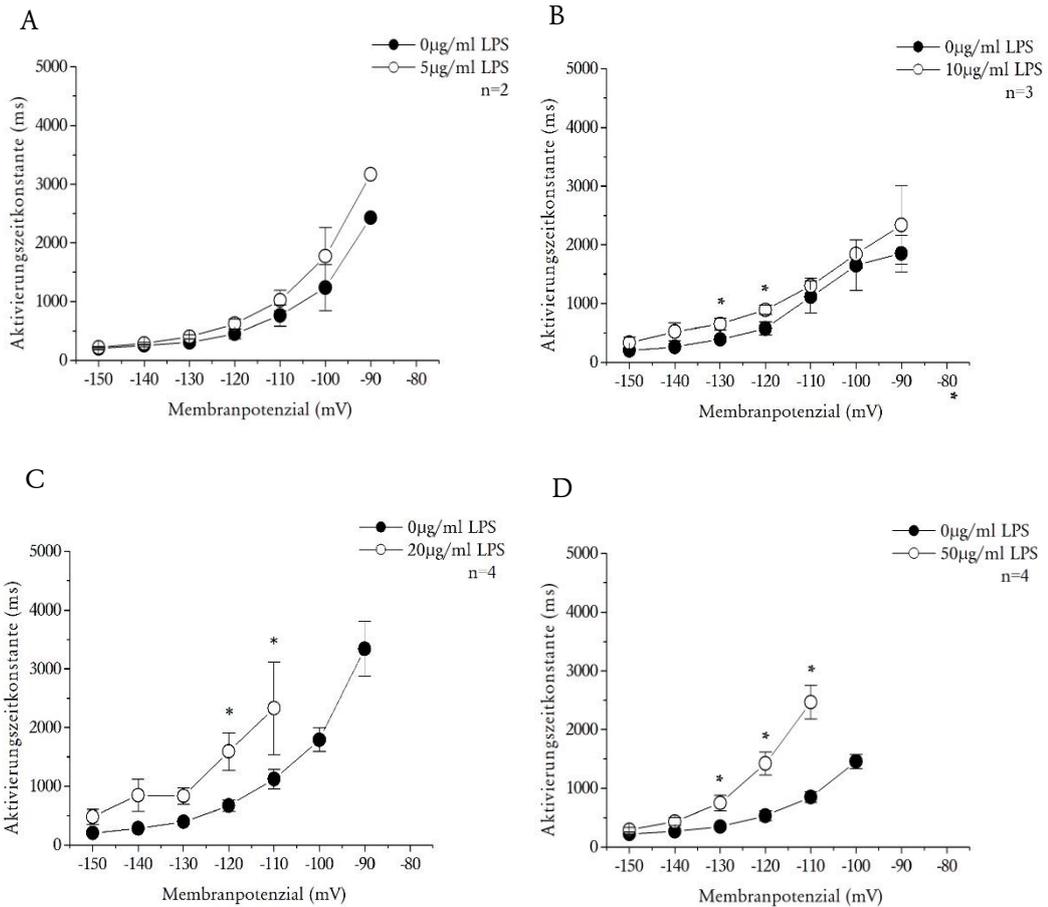


Abbildung 12 Aktivierungszeitkonstante: dosisabhängiger Effekt von LPS auf den Aktivierungsverlauf von I_{hHCN2}

A-D Vergleich an Zellen vor und nach Exposition gegen LPS im Langzeitexperiment
 MW \pm SEM, $p < 0,05$ aus mehreren Pulsprotokollen für jede Zelle n

fehlende Daten in C: Aktivierungszeitkonstante aus dem Pulsprotokoll mittels monoexponentiellem Fitting aufgrund des sehr zögerlichen Anstiegs der Aktivierungskurve nicht sinnvoll bestimmbar

Nach Exposition gegen hohe Dosen LPS ($>20\mu\text{g/ml}$) konnte eine deutliche Zunahme der Aktivierungszeitkonstante festgestellt werden. Die Aktivierung geschah somit verzögert.

Für die Konzentrationen 10 und $20\mu\text{g/ml}$ waren die Aktivierungszeitkonstanten bei zwei Membranpotenzialen statistisch signifikant unterschiedlich, bei $50\mu\text{g/ml}$ bei drei Membranpotenzialen.

Während der Aktivierungsverlauf bei alleinigem Austausch der Badlösung oder beim Vergleich von Zellen vor und nach Exposition gegen geringe Dosen LPS kaum Unterschiede zeigte, konnte nach Exposition gegen hohe Dosen LPS ein deutlicher Unterschied des Aktivierungszeitverlaufs festgestellt werden. Es handelt sich somit um einen konzentrationsabhängigen Effekt.

Im Vergleich von Zellen vor und nach Exposition gegen LPS bestand bei niedrigen Konzentrationen kein Einfluss auf die Aktivierungskinetik. Ab einer Konzentration von 10µg/ml LPS bestand für zwei von sieben Membranpotenzialen ein statistisch signifikanter Unterschied der Aktivierungszeitkonstanten (MW ± SEM, p<0,05). Mit zunehmender Konzentration von LPS in der Badlösung nahm die Aktivierungszeitkonstante zu, die Aktivierung von I_hHCN₂ geschah verlangsamt. Es ließen sich im Einzelnen folgende Befunde feststellen:

Tabelle 5 Aktivierung bei Zellen mit und ohne Exposition gegen 50µg/ml LPS (Kurzzeitexperiment)

Testpotenzial (mV)	τ_{Akt} 0µg/ml LPS n=8	± SEM	τ_{Akt} 50µg/ml LPS n=14	± SEM
-90	2444	483	-	-
-100	1502	212	3196(*)	1240
-110	866	99	1348	382
-120	518	55	1025(*)	206
-130	370	114	460	40
-140	-	-	345	80

Im Kurzzeitexperiment (Vergleich von Zellen mit und ohne Exposition gegen 50µg/ml LPS) ließ sich für die Membranpotenziale -100mV und -120mV ein signifikanter Unterschied der Aktivierungszeitkonstanten feststellen.

Tabelle 6 Aktivierung vor und nach Austausch der Badlösung (0µg/ml LPS, Langzeitexperiment)

Testpotenzial (mV)	τ_{Akt} vor Lösungswechsel	± SEM	τ_{Akt} nach Lösungswechsel	± SEM
-100	2624	268	2485	272
-110	1472	124	1731	203
-120	853	73	914	73
-130	514	31	583	41
-140	355	18	382	17
-150	268	11	287	15

MW ± SEM aus 6 Zellen mit ≥ 6 Pulsprotokollen pro Zelle

Der alleinige Austausch der Badlösung im Langzeitexperiment hatte keinen Einfluss auf die Aktivierungszeitkonstante.

Tabelle 7 Aktivierung vor und nach Exposition gegen 10µg/ml LPS (Langzeitexperiment)

Testpotenzial (mV)	τ_{Akt} vor Lösungswechsel	± SEM	τ_{Akt} nach Lösungswechsel	± SEM
-90	1855	310	2340	671
-100	1653	430	1843	240

Testpotenzial (mV)	τ_{Akt} vor Lösungswechsel \pm SEM	τ_{Akt} nach Lösungswechsel \pm SEM
-110	1114 268	1303 131
-120	576 109	892(*) 76
-130	392 46	651(*) 98
-140	265 33	523 146
-150	205 23	336 10

MW \pm SEM aus 3 Zellen mit insgesamt 16 Pulsprotokollen

Bei Vergleich von Zellen vor und nach Exposition gegen 10 μ g/ml LPS war für die Membranpotenziale -120mV und -130mV ein signifikanter Unterschied der Aktivierungszeitkonstanten festzustellen.

Tabelle 8 Aktivierung vor und nach Exposition gegen 20 μ g/ml LPS (Langzeitexperiment)

Testpotenzial (mV)	τ_{Akt} vor Lösungswechsel \pm SEM	τ_{Akt} nach Lösungswechsel \pm SEM
-100	1792 572	-
-110	1122 503	2330(*) 789
-120	672 295	1550(*) 963
-130	397 129	837(*) 483
-140	286 67	845 937
-150	207 36	484 464

MW \pm SEM aus 4 Zellen mit insgesamt 24 Pulsprotokollen

Im Vergleich von Zellen vor und nach Exposition gegen 20 μ g/ml LPS war für die Membranpotenziale -110mV, -120mV und -130mV ein signifikanter Unterschied der Aktivierungszeitkonstanten festzustellen.

Tabelle 9 Aktivierung vor und nach Exposition gegen 50 μ g/ml LPS (Langzeitexperiment)

Testpotenzial (mV)	τ_{Akt} vor Lösungswechsel \pm SEM	τ_{Akt} nach Lösungswechsel \pm SEM
-100	1456 122	-
-110	849 93	2467(*) 287
-120	533 84	1423(*) 196
-130	350 45	749(*) 133
-140	268 32	435 69
-150	223 12	297 40

MW \pm SEM aus 4 Zellen mit insgesamt 19 Pulsprotokollen

Im Vergleich von Zellen vor und nach Exposition gegen 50 μ g/ml LPS ließ sich für die Membranpotenziale -110mV, -120mV und -130mV ein statistisch signifikanter Unterschied der Aktivierungszeitkonstanten feststellen.

Somit zeigte sich im Langzeitexperiment eine signifikante Verzögerung der Aktivierung, welche erstmals beim Wechsel auf 10 μ g/ml LPS festgestellt werden konnte und mit steigender LPS-Konzentration zunahm. Diese Verzögerung der Aktivierung zeigte sich am deutlichsten bei den Membranpotenzialen -110 bis -130mV. Bei den am stärksten hyperpolarisierenden Membranpotenzialen -140 und -150mV zeigte sich bei insgesamt sehr rascher Aktivierung nur eine geringe Differenz der Aktivierungszeitkonstanten.

Der Aktivierungszeitverlauf von hHCN2-Kanälen wird somit unter dem Einfluss von Lipopolysacchariden deutlich verzögert, wobei die Dosis des applizierten LPS eine entscheidende Rolle spielt.

4.3 EINFLUSS VON LPS AUF DIE DEAKTIVIERUNG

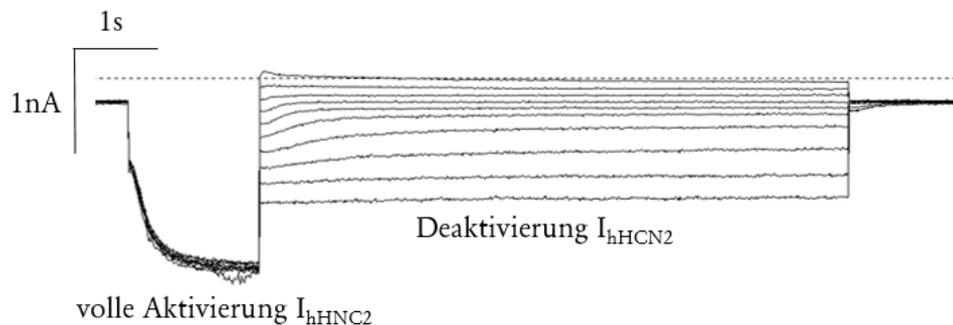


Abbildung 13 Beispiel für Aufzeichnung des kompletten Pulsprotokolls C nach Exposition von $1\mu\text{g/ml}$ LPS.

Im ersten Teil des Pulsprotokolls wird I_{hHCN2} bei -140mV vollständig aktiviert. Im zweiten Teil wurde die Deaktivierung beim Testpotenzial über 9s aufgezeichnet.

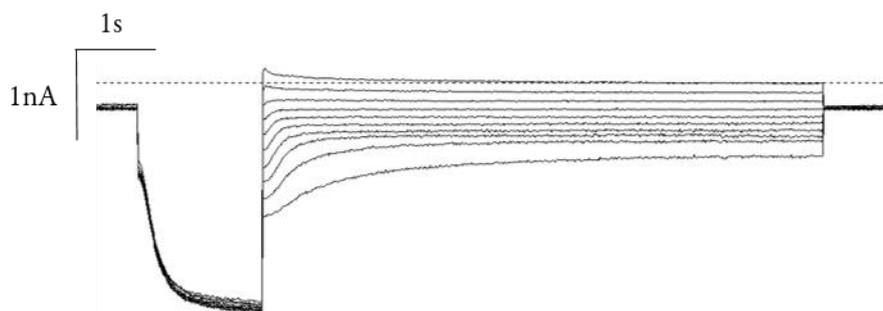


Abbildung 14 Beispiel für Aufzeichnung des kompletten Pulsprotokolls C nach Exposition von $20\mu\text{g/ml}$ LPS.

Nach Exposition gegen $20\mu\text{g/ml}$ LPS nahm die Amplitude von I_{hHCN2} beim jeweiligen Testpotenzial rascher ab, die Deaktivierung geschah im Vergleich zu Kontrollzellen beschleunigt.

Nach voller Aktivierung von I_{hHCN2} bei -140mV folgte über 9s die Deaktivierungsphase von I_{hHCN2} für das jeweilige Testpotenzial. Die Amplitude von I_{hHCN2} nahm unter Exposition gegen $20\mu\text{g/ml}$ LPS deutlich rascher ab. Im Vergleich zur Exposition gegen $1\mu\text{g/ml}$ LPS in der Badlösung deaktivierte I_{hHCN2} bei $20\mu\text{g/ml}$ LPS schneller.

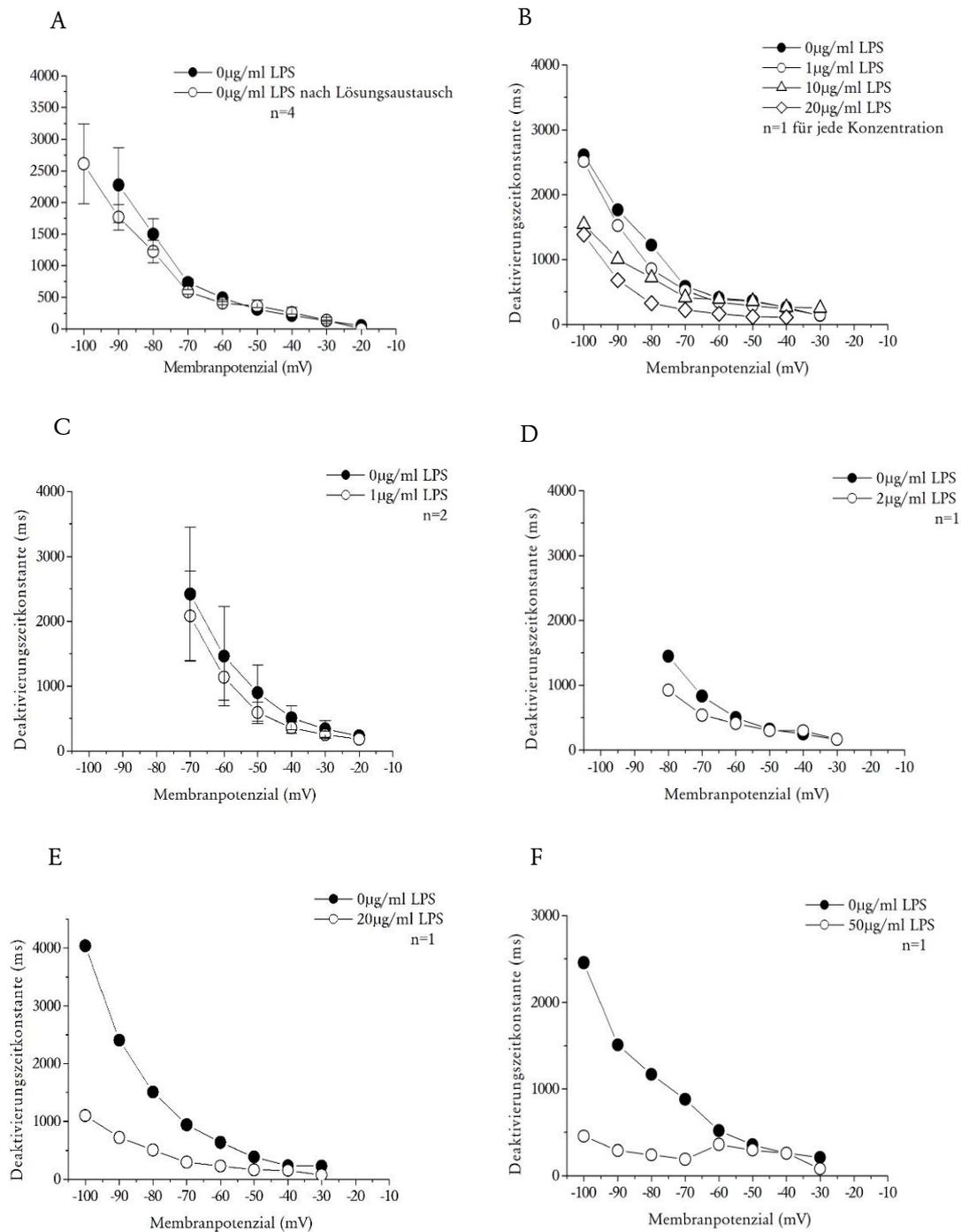


Abbildung 15 Deaktivierungszeitkonstante: dosisabhängiger Effekt von LPS auf die Deaktivierung von I_{hHCN2}

A-, C-F Langzeitexperiment mit Kontrollzellen (A) und LPS-Exposition (C-F)

B Vergleich unterschiedlicher Zellen im Kurzzeitexperiment

Mittelwert \pm SEM, $p < 0,05$ aus mehreren Pulsprotokollen für jede Zelle n

Bei Exposition gegen variable Dosen LPS im Kurzzeitexperiment (B) zeigten sich bei Exposition gegen 20µg/ml LPS deutlich geringere Deaktivierungszeitkonstanten als bei der Kontrollzelle und somit eine beschleunigte Deaktivierung unter LPS. Auch im Langzeitexperiment zeigte sich vor allem bei stark hyperpolarisierenden Membranpotenzialen und unter zunehmender LPS-Konzentration eine beschleunigte Deaktivierung (C-F). Der Lösungsaustausch allein hatte keinen Einfluss (A).

Unter der Exposition gegen LPS konnte eine Abnahme der Deaktivierungszeitkonstante beobachtet werden. Dies betraf sowohl den Vergleich unterschiedlicher Zellen als auch den Vergleich an einer Zelle vor und nach LPS-Exposition. Die Deaktivierung geschah nach Exposition gegen LPS deutlich beschleunigt. Am deutlichsten ausgeprägt war dieser Effekt bei hohen LPS-Konzentrationen ab $20\mu\text{g/ml}$, so dass von einem konzentrationsabhängigen Effekt ausgegangen werden kann.

4.4 INSTANTANER STROM

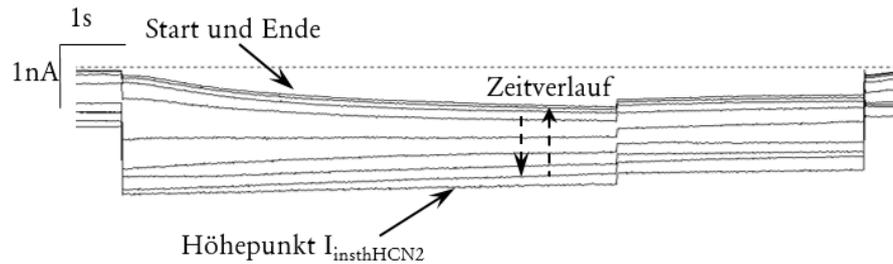


Abbildung 16 Aufzeichnung des instantanen Stroms nach dem Lösungsaustausch

Ausgehend vom Potenzial -40mV wird auf das Testpotenzial -90mV hyperpolarisiert, anschließend bei -80mV der tail-Strom aufgezeichnet. Beim Testpotenzial war eine deutliche Aktivierung von I_{hHCN2} zu erwarten. Die einzelnen Stromspuren wurden im Abstand von 30s aufgezeichnet.

Zu Beginn der Aufzeichnung (oberste Stromspur) nimmt die Amplitude des aufgezeichneten Stromes langsam zu, wie es für I_{hHCN2} typisch ist. In der Mitte der Aufzeichnung (unterste Stromspur) ist in Aktivierung und Deaktivierung keine Verzögerung mehr erkennbar (instantaner Strom). Nach mehreren Minuten kann erneut eine für I_{hHCN2} typische Stromspur aufgezeichnet werden.

Nach dem Lösungswechsel wurde vor allem bei Experimenten mit langer Zeitdauer neben I_{hHCN2} ein instantaner Strom beobachtet. Das Auftauchen des instantanen Stroms war für die Experimentierende überraschend und wurde zunächst als Versuchsabbruchkriterium gewertet, da auch bei -40mV die Stromamplitude zunahm und somit von einer irreversibel verstärkten Leckleitfähigkeit ausgegangen wurde. Jedoch konnte zunächst zufällig beobachtet werden, dass der Strom über einen Zeitraum von ca. $10\text{-}15\text{min}$ zunächst sukzessive zu- und anschließend wieder abnahm, bis die Stromspur nahezu wieder ihrer I_{hHCN2} -typischen Ausgangsform entsprach. Nach dem Vergehen des instantanen Stroms konnte das Experiment fortgesetzt werden. An nativen HEK293-Zellen wurde der instantane Strom nicht gefunden. Der instantane Strom trat nicht in jedem Experiment auf. Wenn er auftrat, dann ausschließlich in der Phase unmittelbar nach dem Lösungsaustausch.

4.5 VOLLAKTIVIERTER STROM

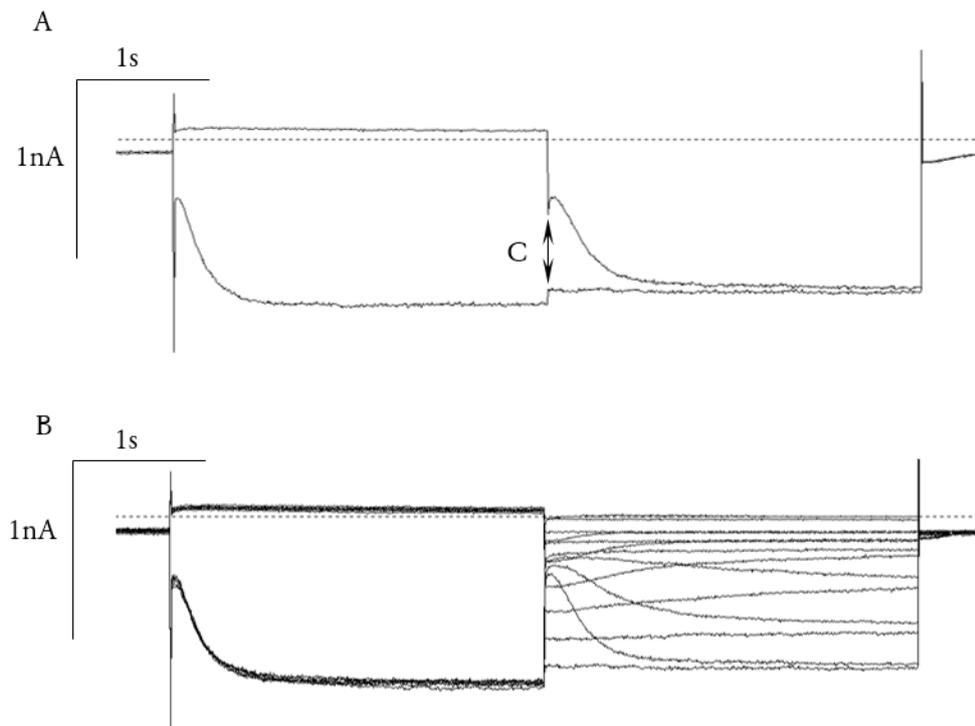


Abbildung 17 Beispiel für Aufzeichnung des voll aktivierten Stroms ($0\mu\text{g/ml}$ LPS)

- A Aufzeichnung zweier Stromspuren des voll aktivierten Stroms beim Testpotenzial -140mV
- B komplette Spannungsserie des vollaktivierten Stroms
- C Stromamplitude I_{hHCN2} als Differenz der tail-Stromamplitude bei -140mV und 10mV

Im ersten Teil des Pulsprotokolls wurde entweder eine vollständige Aktivierung (-140mV) oder eine vollständige Deaktivierung ($+10\text{mV}$) von I_{hHCN2} angestrebt. Anschließend folgte die Aufzeichnung der maximalen Stromamplitude beim jeweiligen Testpotenzial (Testpotenzial in Aufzeichnung **A** -140mV). Aus der Differenz der bei maximaler Aktivierung und maximaler Deaktivierung aufgezeichneten Amplituden ergab sich die maximale Stromamplitude **C** von I_{hHCN2} beim jeweiligen Testpotenzial. Die lange Dauer der Aktivierungs- bzw. Deaktivierungsphase gewährleistet eine vollständige Aktivierung bzw. Deaktivierung.

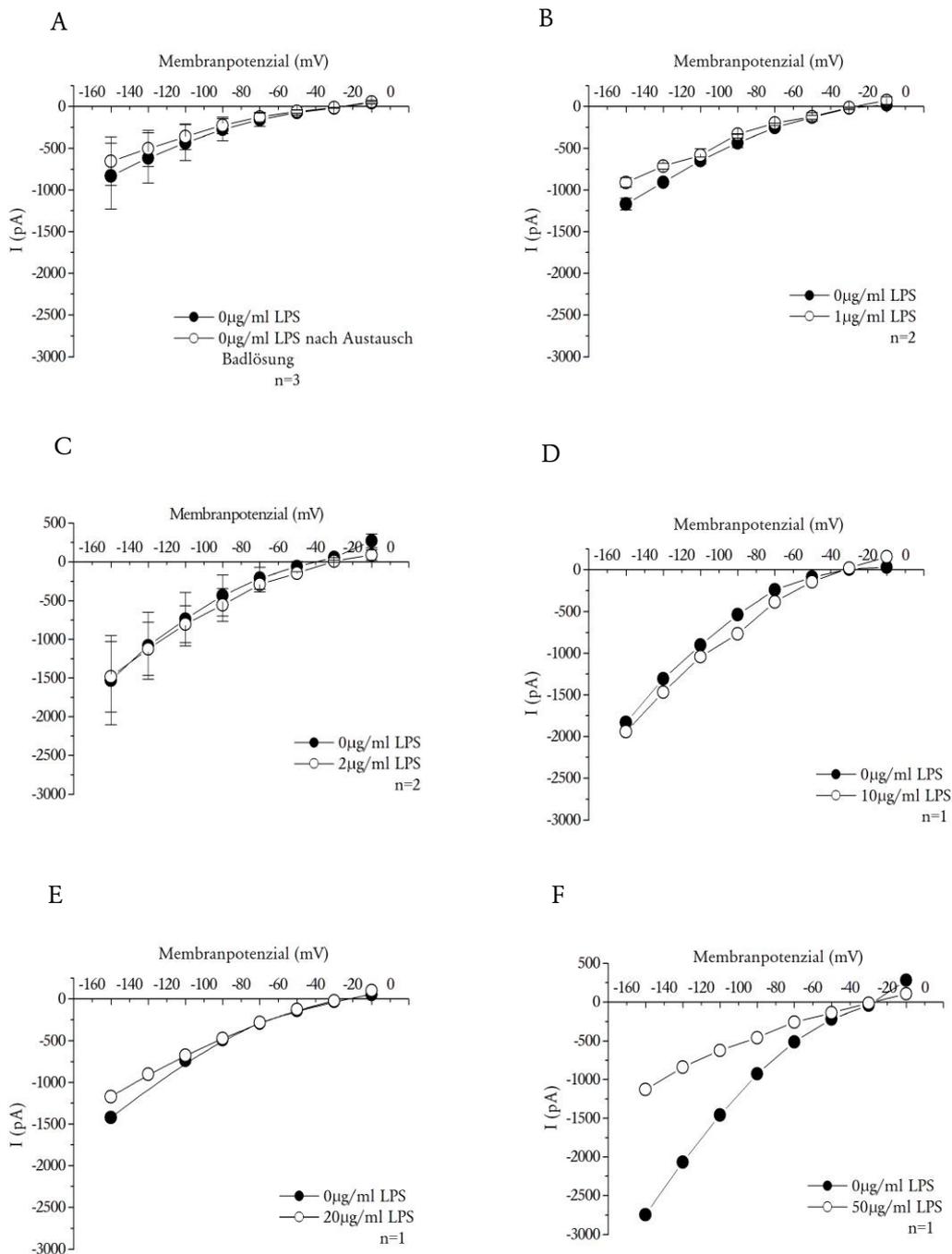


Abbildung 18 IV-Relation des voll aktivierten Stroms I_{hHCN2}

A-F I (pA) als Amplitude von I_{hHCN2} beim Testpotential, Umkehrpotential I_{hHCN2} bei -20 mV

A Vergleich an Zellen vor und nach Austausch der Badlösung (Kurzzeitexperiment)

B-F Vergleich an Zellen vor und nach LPS-Exposition (Langzeitexperiment)

Beim alleinigen Austausch die Badlösung war die maximale Stromamplitude für I_{hHCN2} vor allem bei stark hyperpolarisierenden Membranpotentialen sehr variabel (A).

Nach Exposition gegen geringe Dosen LPS (z.B. B $1 \mu\text{g/ml}$, C $2 \mu\text{g/ml}$) zeigte sich kein deutlicher Unterschied der maximalen Stromamplitude.

Nach Exposition gegen hohe Dosen LPS (z.B. E $20 \mu\text{g/ml}$, F $50 \mu\text{g/ml}$) wurde auch bei stark hyperpolarisierten Membranpotentialen die vor LPS-Exposition registrierte maximale Stromamplitude nicht mehr erreicht. Bei Exposition gegen $50 \mu\text{g/ml}$ LPS zeigte sich dieser Effekt am deutlichsten, so dass von einem konzentrationsabhängigen Effekt auszugehen ist. Das Umkehrpotential wurde nicht beeinflusst.

Der Austausch der Badlösung allein hat keinen Effekt auf das Umkehrpotenzial und die maximale Stromamplitude von I_{hHCN2} . Bei stark hyperpolarisierenden Membranpotenzialen konnten in der Kontrollgruppe und bei Exposition gegen geringe Dosen LPS sehr variable Maximalströme für das jeweilige Testpotenzial registriert werden. Nach Exposition gegen hohe Dosen LPS (ab $20\mu\text{g/ml}$) zeigte sich eine deutliche Reduktion der maximalen Stromamplitude. Das Umkehrpotenzial zeigte sich unbeeinflusst und lag bei allen Konzentrationen um die -20mV ($-18,8\text{mV}$ bis $-24,6\text{mV}$). Mit zunehmender LPS-Konzentration der Badlösung war auch die maximale Stromamplitude deutlicher reduziert, so dass auch hier ein konzentrationsabhängiger Effekt wahrscheinlich ist.

4.6 STATIONÄRE AKTIVIERUNGSKURVE VON I_{hHCN2}

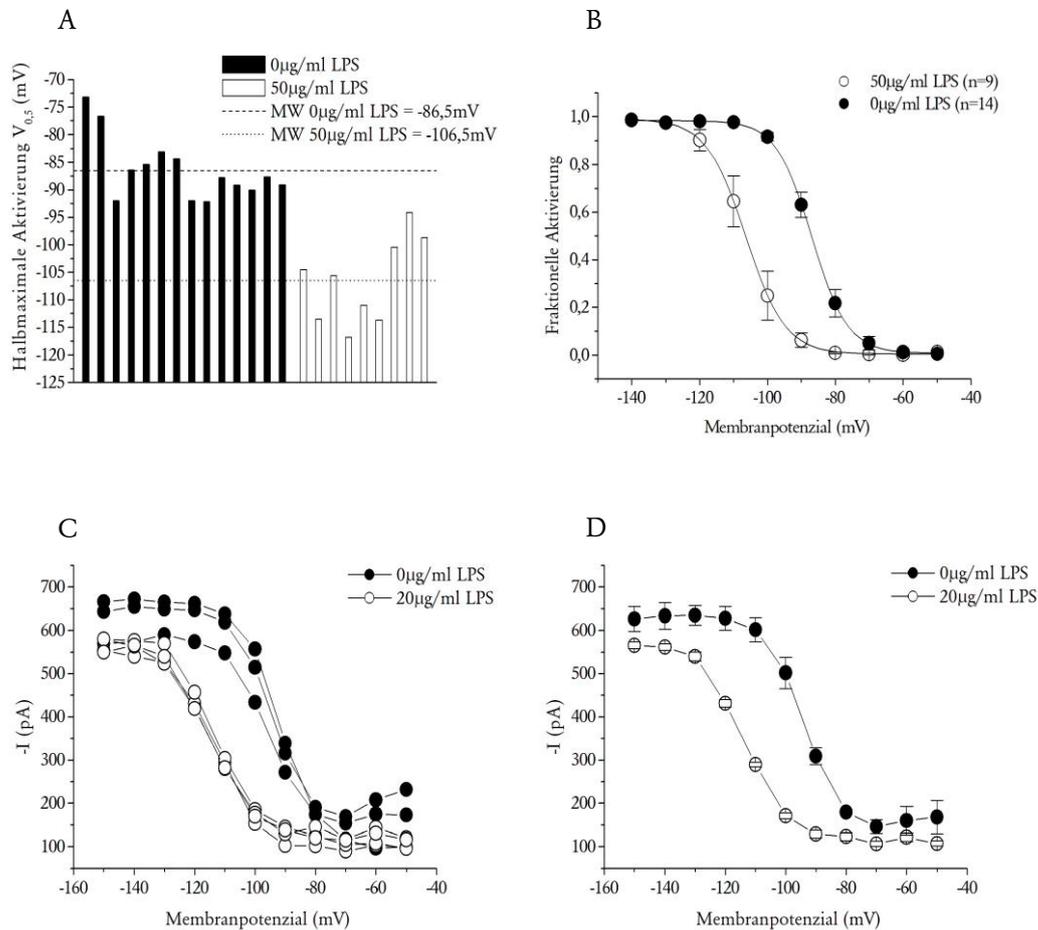


Abbildung 19 Effekt von LPS auf stationäre Aktivierungskurve von I_{hHCN2}

- A Einzelwerte und Mittelwert $V_{0,5}$ von Zellen mit (gepunktete Linie) und ohne (gestrichelte Linie) LPS-Exposition im Kurzzeitexperiment
- B Spannungsabhängigkeit der fraktionellen Aktivierung von I_{hHCN2} bei Zellen mit und ohne Exposition zu $50\mu\text{g/ml}$ LPS (Kurzzeitexperiment, Mittelwert \pm SEM)
- C Einzelauswertung der tail-Stromamplituden einer Zelle vor und nach Exposition zu $20\mu\text{g/ml}$ LPS (Langzeitexperiment)
- D tail-Stromamplituden derselben Zelle vor und nach Exposition zu $20\mu\text{g/ml}$ LPS (Langzeitexperiment, Mittelwert \pm SEM)

Beim Vergleich unterschiedlicher Zellen war $V_{0,5}$ sehr variabel (A). Bei Exposition gegen $50\mu\text{g/ml}$ LPS im Kurzzeitexperiment ließ sich für die 25 untersuchten Zellen (B) jedoch eine deutliche Verschiebung von $V_{0,5}$ ($p=2,0 \cdot 10^{-7}$) in negativere Potenzialbereiche nachweisen. Am Beispiel einer Zelle (C, D) vor und nach Exposition gegen $20\mu\text{g/ml}$ LPS zeigten sich neben der Verschiebung von $V_{0,5}$ in negativere Potenzialbereiche nach LPS-Exposition auch reduzierte tail-Strom-Amplituden bei allen Testpotenzialen.

Beim Vergleich von Zellen mit und ohne LPS-Exposition wurde je Zelle ein Pulsprotokoll ausgewertet. $V_{0,5}$ zeigte sich von Zelle zu Zelle variabel und verschob sich bei Exposition zu $50\mu\text{g/ml}$ LPS deutlich in negativere Potenzialbereiche. Der Mittelwert von $V_{0,5}$ bei Zellen ohne LPS-Exposition lag bei $-86,5\text{mV}$. Bei Zellen mit Exposition zu $50\mu\text{g/ml}$ LPS war dieser um -20mV auf $-106,5\text{mV}$ verschoben. Im Vergleich von Kontrollzellen und Zellen mit Exposition zu $50\mu\text{g/ml}$ LPS zeigt sich $V_{0,5}$ statistisch signifikant unterschiedlich ($n=14$ für die Kontrollzellen, $n=9$ für die Zellen mit LPS-Exposition, $p= 2,0 \cdot 10^{-7}$). Die Exposition zu $100\mu\text{g/ml}$ LPS erweist sich als letal toxisch auf die Zellkultur.

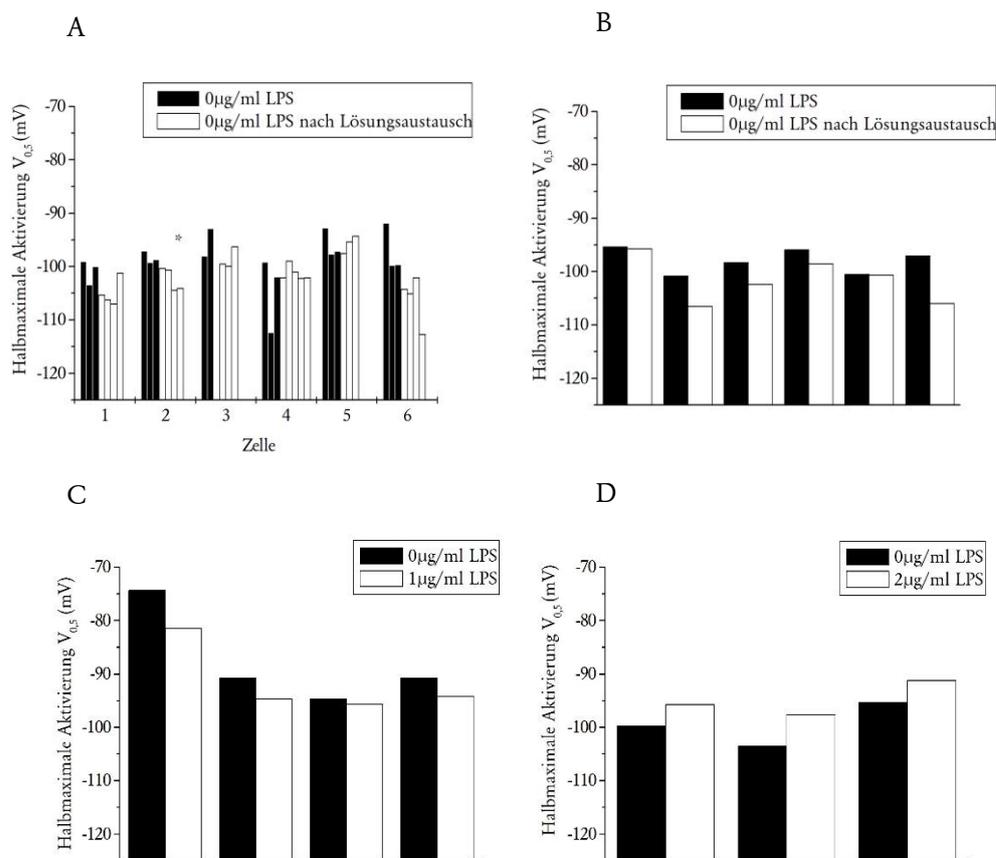


Abbildung 20 dosisabhängige Wirkung von LPS auf das Membranpotenzial der halbmaximalen Aktivierung ($V_{0,5}$)

A Einfluss des Lösungsaustauschs auf $V_{0,5}$ (Langzeitexperiment, ein Balken entspricht der Auswertung eines Pulsprotokolls)

B-D Einfluss von LPS-Exposition auf $V_{0,5}$ (Langzeitexperiment)

Ein Balkenpaar entspricht einer Zelle vor (schwarzer Balken) und nach (weißer Balken) LPS-Exposition. Beim alleinigen Austausch der Badlösung konnte für eine von sechs Zellen eine Verschiebung der halbmaximalen Aktivierung beobachtet werden. Der Lösungsaustausch an sich kann somit selten zur Verschiebung von $V_{0,5}$ in negativere Bereiche führen. Dies könnte z.B. durch Driftphänomene oder den run-down bedingt sein. Nach Exposition gegen geringe Dosen LPS ($1-2\mu\text{g/ml}$) konnte ebenfalls keine signifikante Verschiebung der halbmaximalen Aktivierung beobachtet werden.

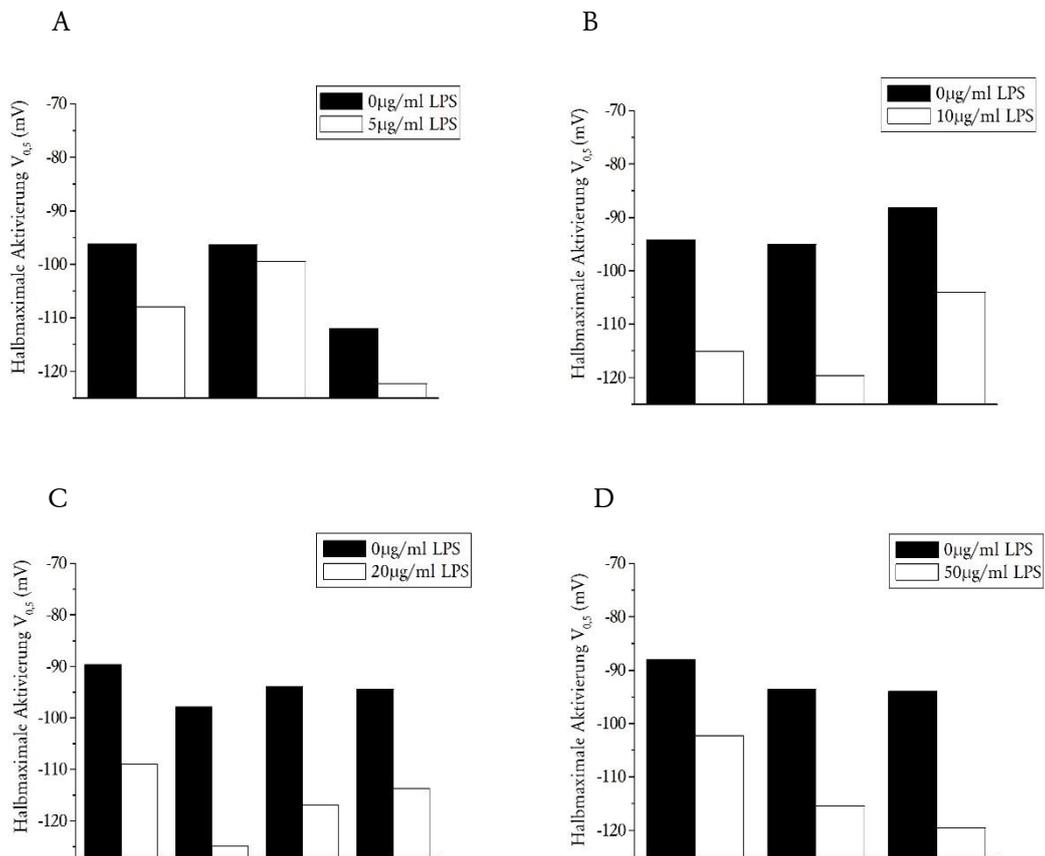


Abbildung 21 dosisabhängige Wirkung von LPS auf das Membranpotenzial der halbmaximalen Aktivierung ($V_{0,5}$)

A-D Einfluss von LPS-Exposition auf $V_{0,5}$ (Langzeitexperiment)

Ein Balkenpaar entspricht einer Zelle vor (schwarzer Balken) und nach (weißer Balken) LPS-Exposition. Es wurden pro Balken mehrere Pulsprotokolle ausgewertet.

Der Ausgangswert von $V_{0,5}$ variierte von Zelle zu Zelle. Nach Exposition gegen LPS ab einer Konzentration von $5\mu\text{g/ml}$ war $V_{0,5}$ stets in negativere Potenzialbereiche verschoben. Das Ausmaß dieser Verschiebung nahm mit zunehmender LPS-Konzentration ebenfalls zu.

Im Vergleich von Zellen vor und nach LPS-Exposition wurden insgesamt 154 Pulsprotokolle von 25 Zellen ausgewertet (0µg/ml n=5; 1µg/ml n=4; 2µg/ml n=3; 5µg/ml n=3; 10µg/ml n=3; 20µg/ml n=4; 50µg/ml n=3). Der Lösungsaustausch führte nur bei einer der Kontrollzellen zur signifikanten Verschiebung von $V_{0,5}$. Bei allen anderen Experimenten hatte der Lösungsaustausch keinen Effekt auf $V_{0,5}$. Ab einer Dosis von 5µg/ml LPS verschob sich $V_{0,5}$ deutlich in negativere Potenzialbereiche. Mit zunehmender LPS-Konzentration nahm das Ausmaß der Verschiebung des Potentials der halbmaximalen Aktivierung zu. Es handelt sich somit um einen konzentrationsabhängigen Effekt. Unter Annahme einer direkten Bindung von LPS an HCN-Kanäle ähnlich einer Enzymkinetik erster Ordnung ergab sich:

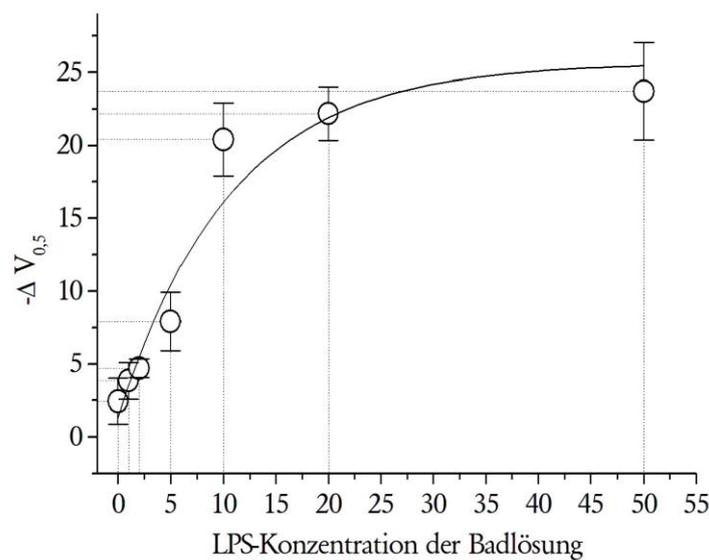


Abbildung 22 Dosis-Wirkungsbeziehung von LPS-Konzentration der Badlösung und Verschiebung des Membranpotentials der halbmaximalen Aktivierung ($\Delta V_{0,5}$)

Mit zunehmender LPS-Konzentration in der Badlösung verschob sich das Membranpotenzial der halbmaximalen Aktivierung ($V_{0,5}$) zunehmend in negativere Potenzialbereiche. Unter Annahme einer direkten Bindung von LPS an den hHCN2-Kanal ähnlich einer Enzymkinetik erster Ordnung ergab sich eine Dissoziationskonstante $K_D=6,3\mu\text{g/ml}$ LPS und $\Delta V_{0,5\text{max}}=-26,5\text{mV}$.

$$\Delta V_{0,5} = \frac{\Delta V_{0,5\text{max}} \times c(\text{LPS})}{K_D + c(\text{LPS})}$$

- $\Delta V_{0,5}$ Differenz der halbmaximalen Aktivierung
- $\Delta V_{0,5\text{max}}$ maximale Differenz der halbmaximalen Aktivierung
- $c(\text{LPS})$ LPS-Konzentration der Badlösung
- K_D Dissoziationskonstante

Es ergibt sich als maximale Differenz der halbmaximalen Aktivierung $\Delta V_{0,5\max} = -26,5\text{mV}$ und als Dissoziationskonstante $K_D = 6,3\mu\text{g/ml LPS}$.

5 DISKUSSION

Im Sinusknoten bestimmt die Geschwindigkeit der diastolischen Depolarisation die Entstehungsfrequenz der Aktionspotenziale. Der Schrittmacherstrom I_f spielt somit eine Schlüsselrolle bei der Genese von kardialer Schrittmacheraktivität und Herzfrequenzkontrolle (DiFrancesco 2010). Die Exposition von hHCN2-Kanälen gegen LPS führt zu einer erschwerten Aktivierung und erleichterten Deaktivierung.

5.1 ERSCHWERTE AKTIVIERUNG UND ERLEICHTERTE DEAKTIVIERUNG

Unter dem Einfluss von LPS aktivierte die Kanalpopulation im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich zeitverzögert. Beim gleichen Membranpotenzial wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe eine niedrigere Stromamplitude erreicht, was auch als Verschiebung der Aktivierung in negativere Potenzialbereiche beschrieben werden kann. Zudem zeigte sich nach langer Exposition gegen LPS eine Reduktion der maximalen Stromamplitude. Somit konnte exemplarisch am hHCN2-Kanal gezeigt werden, dass unter Exposition gegen LPS I_{hHCN2} erst bei negativeren Membranpotenzialen verspätet aktiviert und schneller deaktiviert, ähnlich den Ergebnissen an atrialen Myozyten (Zorn-Pauly et al., 2007).

Die durch LPS hervorgerufene Modulation der Kanalkinetik führt dabei insgesamt zu einem restriktiveren Öffnungsverhalten im Sinne einer Verminderung des Kationeneinstroms beim gegebenen Membranpotenzial, einer verminderten Offenwahrscheinlichkeit und einer erleichterten Deaktivierung. Eine erleichterte Deaktivierung der hHCN2-Kanäle könnte in vivo dazu führen, dass im Rahmen der diastolischen Depolarisation das Schwellenpotenzial von -40mV zur Aktivierung der Spannungsgesteuerten Kalziumkanäle nicht erreicht wird und sich somit das nächste Aktionspotenzial verzögert, es resultiert eine Bradykardie.

5.2 LPS MODIFIZIERT DIE KINETIK DES HHCN2-KANALS

Bei schneller Applikation von LPS auf hHCN2-Kanäle konnte schon nach wenigen Sekunden eine Abnahme der Stromamplitude beobachtet werden (Klößner et al., 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei langsamer Applikation eine langsame Reduktion der Stromamplitude über den Verlauf von mehreren Minuten registriert (siehe Abbildung 7). In Vorexperimenten wurde die Kinetik des modifizierten Versuchsaufbaus mit Phenolrot untersucht. Der vollständige Lösungsaustausch in der Badkammer dauerte etwa 2min. Im Gegensatz zur schnellen Applikation wird der Effekt von LPS auf I_{hHCN2} verzögert beobachtet. Diese Wirkverzögerung erscheint zunächst als Widerspruch zu publizierten Daten (Klößner et al., 2011). Aufgrund des langsameren Applikationsmodus und der deutlich verlängerten Zeitdauer des Lösungsaustauschs erscheint dieser Befund jedoch plausibel.

Die Verschiebung der halbmaximalen Aktivierung in negativere Potenzialbereiche hat sich als robuster Parameter für den Effekt von LPS auf HCN-Kanäle herausgestellt und wurde in den bisherigen Publikationen als Maß für den Effekt von LPS auf I_f verwendet (Zorn-Pauly et al., 2007; Klöckner et al., 2011; Klöckner et al., 2014). Im homologen Expressionssystem (Experimente an humanen Vorhofmuskelzellen) wurde dort unter Exposition gegen LPS eine Abnahme der Stromdichte, Zunahme der Aktivierungszeitkonstante und Verschiebung des Potentials der halbmaximalen Aktivierung in negativere Potenzialbereiche beobachtet.

In dieser Arbeit wurde im heterologen Expressionssystem (Experimente an in HEK293 Zellen klonierten hHCN2-Kanälen) die konzentrationsabhängige Modifikation der biophysikalischen Eigenschaften des hHCN2-Kanals belegt. Im Einzelnen fand sich eine verzögerte Aktivierung, beschleunigte Deaktivierung und Verschiebung der halbmaximalen Aktivierung in negativere Potenzialbereiche. Die Befunde wurden durch den experimentellen Vergleich unterschiedlicher Zellen mit und ohne LPS-Exposition und derselben Zelle vor und nach Exposition gegen LPS erhoben.

Der Zusammenhang zwischen applizierter LPS-Dosis und dem Ausmaß der Verschiebung des Potentials der halbmaximalen Aktivierung ließ sich ähnlich einer Enzymkinetik erster Ordnung beschreiben. Es wurde ein maximaler Effekt erreicht, bei dem die weitere Gabe von LPS zu keiner weiteren Verschiebung der Aktivierungskinetik in negativere Potenzialbereiche führte. Auch der Effekt auf Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik scheint konzentrationsabhängig zu sein. Vor allem in Bezug auf die Deaktivierungskinetik konnte dies jedoch nur beispielhaft dargestellt werden und müsste in weiteren Experimenten hinreichend statistisch belegt werden.

5.3 WIE WIRKT LPS AUF DEN hHCN2-KANAL?

Aus denen für diese Arbeit erhobenen Daten wären sowohl die Geschwindigkeit des Wirkeintritts als auch das Erreichen eines Sättigungsniveaus mit einer direkten Interaktion von LPS und hHCN2-Kanal vereinbar.

Eine direkte Interaktion mit der Kanalpore erscheint aufgrund der inkompletten Blockade und aufgrund der Molekülgröße unwahrscheinlich. Für die dauerhafte Reduktion des maximalen Stroms im Langzeitexperiment wäre prinzipiell die Beteiligung eines intrazellulären Transkriptionsprozesses denkbar. In einigen Experimenten dieser Arbeit wurde für mehrere Stunden mit LPS inkubiert und somit die erforderliche Zeitdauer für einen intrazellulären Transkriptionsprozess erreicht. In der verwendeten Zellkultur wurde wenige Stunden nach LPS-Exposition ein Anstieg von IL-6 registriert (Klöckner et al., 2011).

Der TL-R4-vermittelte klassische Signalweg, der zur Aktivierung von NF- κ -B und somit zur Transkription von IL-1 und IL-6 führt, scheint somit in der verwendeten Zellkultur von stabil mit dem hHCN2-Kanal transfizierten HEK293-Klonen aktiv zu sein. Würde ein intrazellulärer Transkriptionsprozess eine wesentliche Rolle für den Effekt von LPS auf hHCN2-Kanäle spielen, gäbe es nach mehreren Stunden

einen signifikanten Unterschied zur kurzen Inkubationsdauer in Bezug auf die Modifikation der Kanalkinetik. Dies war nicht der Fall. Im Vergleich zur ersten Registrierung nach LPS-Exposition werden bei der letzten Registrierung gegen Ende des Experiments keine wesentlich anderen Befunde erhoben. Somit scheint der klassische Signalweg auch im Langzeitexperiment keine wesentliche Rolle für die Modifikation der Kanalkinetik zu spielen. Die dauerhafte Reduktion der Stromamplitude im Langzeitexperiment wäre mit einer dauerhaften Inaktivierung von hHCN2-Kanälen vereinbar. Ob der klassische Signalweg als intrazellulärer Transkriptionsprozess zur dauerhaften Inaktivierung von hHCN2-Kanälen beiträgt, lässt sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht herleiten.

In der Literatur konnte gezeigt werden, dass LPS die Kinetik von hHCN2-Kanälen nur bei direkter, unmittelbarer Applikation auf den hHCN2-Kanal von extrazellulär moduliert (Klößner et al., 2014). Eine Applikation auf die Kanalumgebung hatte keinen Effekt. Im Gegensatz zu CsCl, das I_{hHCN2} nahezu komplett blockiert, reduziert die Exposition gegen LPS die Stromamplitude lediglich um 30% (Klößner et al., 2011). Ist der beobachtete Effekt im Langzeitexperiment tatsächlich durch LPS bedingt?

Aufgrund der deutlichen Variabilität des Potenzials der halbmaximalen Aktivierung unterschiedlicher Zellen und sogar bei aufeinanderfolgenden Pulsprotokollen derselben Zelle (Abbildung 19 C, Abbildung 20 A) könnte man postulieren, dass es sich beim beobachteten Effekt von LPS auf hHCN2-Kanäle lediglich um einen Zufall oder Experimente minderwertiger Qualität handelt. Um den Einfluss möglicher Störfaktoren zu minimieren, wurden für jede im Langzeitexperiment untersuchte Zelle mehrere um den Leckstromanteil korrigierte tail-Ströme aus verschiedenen Pulsprotokollen zur Ermittlung des Potenzials der halbmaximalen Aktivierung verwendet. Da das Ausgangsniveau der halbmaximalen Aktivierung zwischen einzelnen Zellen stark variierte, wurde der für das Langzeitexperiment modifizierte Versuchsaufbau mit Lösungsaustausch entwickelt. Auch bei Messungen an ein und derselben Zelle ohne Gabe von LPS konnten in unterschiedlichen Messungen Unterschiede des Aktivierungsniveaus festgestellt werden. Im Langzeitexperiment konnte somit erstmals gezeigt werden, dass sich die Aktivierung von hHCN2-Kanälen im Zeitverlauf ändert, somit eine zeitliche Dynamik der Kanalkinetik existiert.

5.4 DER EINFLUSS DES INTRAZELLULÄREN cAMP-SPIEGELS AUF DIE AKTIVIERUNG VON hHCN2

Wäre eine Dynamik des Aktivierungsniveaus physiologisch und wie könnte diese zustande kommen? Unter physiologischen Bedingungen wird die Kinetik von I_f im Rahmen der kardialen Impulsbildung u.a. durch das Ausmaß der betaadrenergen Aktivierung und den damit verbundenen Schwankungen des intrazellulären cAMP-Spiegels moduliert. Im Kurzzeitexperiment konnte belegt werden, dass unabhängig des intrazellulären cAMP-Spiegels LPS die Aktivierung von I_{hHCN2} stets um das gleiche Ausmaß verschiebt (Klößner et al., 2011). Mit der Applikation von cAMP am Ende eines Langzeitexperiments könnte festgestellt werden, ob die Dynamik des Aktivierungsniveaus auch im patch-clamp-Experiment durch einen intrazellulären cAMP-Mangel bedingt ist. Dies wurde durch die Doktorandin noch nicht

realisiert. Festgestellt werden konnte jedoch, dass trotz des variablen Ausgangswerts der halbmaximalen Aktivierung unter Exposition gegen LPS stabil eine konzentrationsabhängige Verschiebung des Potentials der halbmaximalen Aktivierung in negativere Potenzialbereiche vorlag. Schwankungen des cAMP-Spiegels könnten somit eine Rolle für den absoluten Wert der halbmaximalen Aktivierung spielen, relativ gesehen ist der Effekt von LPS auf hHCN2-Kanäle jedoch reproduzierbar.

Die Variabilität des Potentials der halbmaximalen Aktivierung an sich wurde schon früh sowohl an multizellulären Präparationen als auch bei Einzelkanalmessungen von Wildtypkanälen als typische Eigenschaft von I_f beschrieben (DiFrancesco 1993). Sogar der Expressionsmodus beeinflusst die Aktivierung von HCN-Kanälen (Bucchi et al., 2002). Somit ist der absolute Wert des Membranpotentials, bei dem I_f aktiviert, wenig aussagekräftig. Entscheidend für den Effekt von LPS auf HCN-Kanäle ist die konzentrationsabhängige Verschiebung des Potentials der halbmaximalen Aktivierung, die in dieser Arbeit vor allem durch das Langzeitexperiment mit dem direkten Vergleich an derselben Zelle, klar belegt werden konnte.

5.5 STROMERSCHÖPFUNG

Ein weiteres Phänomen im Langzeitexperiment, das zur Verschiebung des Potentials der halbmaximalen Aktivierung in negativere Potenzialbereiche beiträgt, könnte das Phänomen der Stromerschöpfung (current run-down) sein (Pian et al., 2006). Neben der Verschiebung der Aktivierungskinetik von I_{hHCN2} in negativere Potenzialbereiche kommt es in prolongierten patch-clamp-Experimenten ebenfalls zu einer Reduktion des Maximalstroms und einer beschleunigten Deaktivierung. Das Ausmaß der Stromerschöpfung ist von Zelle zu Zelle höchst variabel (DiFrancesco et al., 1986).

Als Ursache der Stromerschöpfung wurde zunächst das Auswaschen einer Substanz aus der Patchpipette vermutet (DiFrancesco und Mangoni, 1994). Später wurde der fehlende regulatorische Einfluss von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ($PIP(4,5)P_2$) diskutiert, das die Aktivierungskinetik von I_{hHCN2} in positivere Potenzialbereiche verschiebt. Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von exogenem $PIP(4,5)P_2$ die Stromerschöpfung verzögert (Pian et al., 2006). LPS führte in den Experimenten der vorliegenden Arbeit zu ähnlichen Effekten wie die Stromerschöpfung. Auch wenn im Vergleich von Kontrollzellen und Zellen mit LPS-Exposition eindeutig gezeigt werden konnte, dass der beobachtete Effekt von LPS auf I_{hHCN2} nicht dem Effekt der Stromerschöpfung entspricht, könnte die Stromerschöpfung einen Beitrag zur Variabilität des Potentials der halbmaximalen Aktivierung leisten.

Falls der Effekt der Stromerschöpfung durch Verlust von $PIP(4,5)P_2$ aus der Zellmembran bedingt wäre, könnte untersucht werden, ob LPS $PIP(4,5)P_2$ möglicherweise bindet und somit zu einer Modulation der Kanalkinetik führt. In diesem Falle würde LPS jedoch auch bei Applikation auf die Kanalumgebung wirken, dies ist jedoch nicht der Fall (Klößner et al., 2014). Neben der Stromerschöpfung wären im Langzeitexperiment zahlreiche weitere Faktoren, die die Kanalkinetik direkt modulieren könnten, denk-

bar. So ist z.B. eine Veränderung des intrazellulären pHs (Zong et al., 2001) recht wahrscheinlich. Ebenso konnte gezeigt werden, dass mechanischer Stress, wie er während des Austauschs der Badlösung auftritt, die Kanalkinetik modulieren könnte (Lin et al., 2007). Jedoch konnte trotz dieser Faktoren und der Variabilität des Potenzials der halbmaximalen Aktivierung vor Exposition gegen LPS ein deutlicher Unterschied zwischen Kontrollzellen und Zellen nach Exposition gegen LPS gefunden werden. Somit konnte belegt werden, dass die Exposition gegen LPS in hinreichender Konzentration die Kinetik von I_{hHCN2} in negativere Potenzialbereiche verschiebt.

5.6 INSTANTANER STROM

Ein weiteres Phänomen wurde während des Austauschs der Badlösung beobachtet. Es handelte sich um einen instantanen Strom, der im Verlauf von ca. 10-15min zunächst schrittweise zu- und anschließend erneut abnimmt. Dieser Strom wurde ausschließlich an Zellen mit hHCN2-Expression beobachtet, an nativen HEK293-Zellen trat er nicht auf. Bisher wurde er im Zusammenhang von LPS-exponierten HCN-Kanälen nicht beschrieben, vermutlich da in der vorliegenden Arbeit erstmals Langzeitexperimente an HCN-Kanälen mit LPS-Exposition und Lösungsaustausch vorgenommen wurden.

Prinzipiell wären durch den Perfusionsschritt aktivierte unspezifische Kationenströme als sog. „Leckströme“ denkbar. Um diese These zu überprüfen, wurden ebenfalls patch-clamp-Experimente an nativen HEK293-Zellen vorgenommen. Dort konnten jedoch instantane Ströme dieser Art nicht gefunden werden, somit erscheint eine Genese des instantanen Stroms durch den hHCN2-Kanal wahrscheinlich. In der Literatur wurden für Wildtyp-HCN-Kanäle, wie z.B. dem SpIH-Kanal (spHCN) des Seeigel-Spermas (Gauss et al., 1998), instantane Ströme beschrieben. Für den HCN2-Kanal wurde neben I_{hHCN2} ebenfalls eine instantane Komponente $I_{inst(hHCN2)}$ beschrieben, welche jedoch lediglich im heterologen Expressionssystem beobachtet werden konnte (Proenza et al., 2002; Pittoors et al., 2015). Ein dauerhafter Offenzustand der Kanäle wurde in der heterologen Expression in *Xenopus*-Oozyten beschrieben (Pittoors et al., 2015).

Zur weiteren Klärung der Genese und Bedeutung des instantanen Stroms wäre es zunächst notwendig, den instantanen Strom provozieren zu können bzw. die Umstände zu finden, unter denen $I_{inst(hHCN2)}$ gegenüber I_{HCN2} überwiegt. Rein mechanistisch gedacht könnte es sich um einen Defekt des Spannungssensors im Bereich der Kanalpore handeln. Bei Mutation eines Serinrests (Ser-306) im Bereich der S4-Helix und somit vorübergehender Deaktivierung des Spannungssensors im Transmembransegment S4 wurden ebenfalls große instantane Ströme wie nach dem Austausch der Badlösung beobachtet (Chen et al., 2000).

Da der instantane Strom ausschließlich nach dem Lösungsaustausch auftritt, wäre mechanischer Stress als Auslöser für diese Modulation prinzipiell denkbar. Bisher ist jedoch ausschließlich für die spannungsabhängige Komponente von heterolog exprimierten HCN2-Kanälen eine Beeinflussung durch me-

chanische Dehnung beschrieben, jedoch nicht für deren instantane Komponente (Lin et al., 2007). Ein Überwiegen der Komponente von $I_{\text{inst(hHCN2)}}$ könnte zu einem stetigen spannungsabhängigen Kationen-Einwärtsstrom mit aufgehobener Modulation durch cAMP führen.

Über eine mögliche Bedeutung *in vivo* kann nur spekuliert werden. Sollte es ebenfalls für HCN1 und HCN4 zur Aktivierung eines instantanen Stromes kommen, könnte dies zu einer sofortigen Depolarisation im Anschluss an die Repolarisationsphase bzw. einer dauerhaften Depolarisation der Sinusknoten-zelle bei aufgehobenen Regulationsmechanismen des vegetativen Nervensystems führen. Eine Modifikation der HCN-Kanalkinetik durch mechanischen Stress wäre zum Beispiel durch turbulente Strömung im Rahmen von Hypertension oder veränderten rheologischen Eigenschaften des Blutes denkbar.

5.7 BEDEUTUNG DER LPS-KONZENTRATION

Als hinreichende Konzentration für die Modulation der Kanalkinetik konnte in den Experimenten für diese Arbeit unter Annahme einer Enzymkinetik erster Ordnung eine minimale Wirkkonzentration (K_D) von $6,3\mu\text{g/ml}$ ermittelt werden. Der maximale Effekt wurde bei $50\mu\text{g/ml}$ erreicht. Diese Konzentrationen liegen etwa 10^4 mal über den bei schwer septischen Patienten ermittelten Endotoxin-Plasmakonzentrationen, welche im Bereich von mehreren hundert pg/ml liegen (Venet et al., 2000; Marshall et al., 2002). Neben dem für diese Arbeit verwendeten *E. coli* LPS existieren unzählige andere Bakterien-Stämme und LPS-Varianten mit unterschiedlicher biologischer Aktivität. Zudem ist LPS im Plasma an Lipopolysaccharid-bindendes-Protein (LBP) gebunden. Somit könnte postuliert werden, dass diese ermittelte minimale Wirkkonzentration *in vivo* niemals erreicht wird und es somit niemals zu einer relevanten Beeinflussung der HCN-Kanalkinetik kommt.

Gegen diese Annahme gibt es wesentliche Gegenargumente. Zum einen muss die Plasmakonzentration von LPS nicht gleich der lokalen LPS-Konzentration im und am kardialen Reizleitungssystem sein. Für Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass diese LPS mittels Endozytose aufnehmen - und dies in weit stärkerem Ausmaß als Makrophagen (Cowan et al., 2001). Die Aufnahme von LPS führte dabei im Rahmen des klassischen Signalwegs zur Aktivierung von NF- κ -B und zur Produktion von TNF- α . Auch wenn bisher nur für in die Zellmembran integriertes LPS einen Effekt auf HCN-Kanäle gezeigt werden konnte, könnte membrangebundenes LPS vor der Aufnahme in den Golgi-Apparat direkt auf HCN-Kanäle wirken.

Zum anderen entspricht das heterologe Expressionssystem mit der Überexpression eines Kanaltyps auf einer immortalisierten Zelllinie nicht der Situation *in vivo*. In atrialen Myozyten werden neben HCN2 ebenfalls HCN1- und HCN4-Kanäle exprimiert, die Heterotetramere mit modifizierten biophysikalischen Eigenschaften bilden können. Ein ideales Experiment, um den Einfluss von LPS auf die kardiale Impulsbildung abschätzen zu können, wäre die Exposition eines intakten Reizbildungssystems gegen LPS im Langzeitexperiment. Dies wäre z.B. an multizellulären Präparationen des Sinusknotens von

Mäusen oder Kaninchen zu realisieren. Der Effekt von intrazellulärem LPS auf HCN-Kanäle müsste durch die Applikation von LPS auf inside-out-patches untersucht werden. Um den Einfluss der LPS-Aufnahme nach intrazellulär abschätzen zu können, müsste das membrangebundene und intrazellulär aufgenommene LPS quantifiziert werden.

5.8 DER INHIBITORISCHE EFFEKT VON LPS AUF DIE AKTIVITÄT VON hHCN2-KANÄLEN

Sowohl an Kardiomyozyten als auch im Rattenexperiment konnte gezeigt werden, dass LPS HCN-Kanäle ähnlich wie Ivabradin blockiert (Ebelt et al., 2015). Nach Gabe des I_f -Blockers Zatebradin wurde ebenfalls eine Reduktion der Herzfrequenzvariabilität beobachtet (Khaykin et al., 1998). In dieser Arbeit wurde modellhaft die konkrete Modifikation der biophysikalischen Eigenschaften des hHCN2-Kanals nach Exposition gegen LPS untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Exposition gegen LPS I_{hHCN2} konzentrationsabhängig beeinträchtigt und die Aktivierung in negativere Potenzialbereiche verschiebt. Dieser Effekt ist lang anhaltend und, soweit in den Experimenten beobachtet, irreversibel.

Die mögliche Bedeutung der Verschiebung des Potenzials der halbmaximalen Aktivierung wurde zuvor an dem mathematischen Modell einer Sinusknotenzelle gezeigt. Dort führte diese Verschiebung zunächst zu einer Zunahme der Zykluslänge, bis der Einfluss von I_f auf die Dauer des Aktionspotenzials abnimmt (Zorn-Pauly et al., 2007). Eine Zunahme der Zykluslänge des Aktionspotenzials des Sinusknotens führt zur Bradykardie. Neben der Aktivierung bei negativeren Membranpotenzialen wurden ebenfalls eine verzögerte Aktivierung und eine beschleunigte Deaktivierung gefunden. Diese Befunde wären mit einer verminderten Anstiegssteilheit des Aktionspotenzials und somit ebenfalls mit einer Bradykardie vereinbar. Im Langzeitexperiment konnte ebenfalls gezeigt werden, dass nach LPS-Exposition ein Teil der Kanalpopulation dauerhaft inaktiviert bleibt, da der Maximalstrom vor Exposition gegen LPS nicht mehr erreicht wird.

5.9 BEDEUTUNG IN VIVO

Neben dem bradykardisierenden Effekt scheint LPS im Rattenmodell bei intaktem autonomen Nervensystem und homologen Expressionssystem ebenfalls zu einer erleichterten Aktivierung durch den Sympathikus bzw. zu einem vermehrten Ansprechen auf Katecholamine zu führen (Zorn-Pauly et al., 2007; Ebelt et al., 2015). Bei Patienten mit Sepsis oder MODS wird trotz tachykarder Kreislaufsituation eine eingeschränkte Herzfrequenzvariabilität beobachtet (Heinroth et al., 1999). In vivo führt die massive endogene Katecholaminfreisetzung und die medikamentöse Therapie mit Katecholaminen zur Tachykardie. Die Modulation der Kinetik von HCN-Kanälen scheint zur beobachteten Einschränkung der Herzfrequenzvariabilität beizutragen. Im Kurzzeitexperiment konnte gezeigt werden, dass LPS unabhängig der cAMP-Ausgangskonzentration und somit des Aktivierungsniveaus der Zelle die Aktivierung um das glei-

che Ausmaß verschiebt (Klößner et al., 2011). Die Gabe von cAMP nach Applikation von LPS wurde im heterologen Expressionssystem noch nicht untersucht und bleibt eine offene Fragestellung. Würde LPS zu einem verstärkten Ansprechen der HCN-Kanäle auf betaadrenerge Stimulation führen, wäre bei Gabe von cAMP nach Exposition gegen LPS eine vermehrte Verschiebung der Aktivierungskurve in positivere Bereiche zu erwarten. Damit wäre der tachykardisierende Effekt von LPS auf HCN-Kanäle auch im heterologen Modellexperiment belegt.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit tragen dazu bei, die ungünstigen Wirkungen von Endotoxin auf den Organismus und somit die Pathogenese der Sepsis weiter zu klären. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Hypothese, dass LPS an hHCN2-Kanäle bindet. Diese Bindung geschieht konzentrationsabhängig, erreicht ein Sättigungsniveau und ist irreversibel. Als Modell-Experiment ist die quantitativ verwendete LPS-Konzentration jedoch nicht übertragbar auf die Situation *in vivo*. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass LPS konzentrationsabhängig die biophysikalischen Eigenschaften von hHCN2-Kanälen moduliert. Konkret kommt es unter der Exposition gegen LPS zu einer verzögerten Aktivierung bei negativeren Membranpotenzialen und einer erleichterten Deaktivierung. Der Effekt tritt nach wenigen Sekunden ein und hält für mehrere Stunden an. Der Versuchsaufbau des Langzeitexperiments wurde entwickelt, um die Effekte der Exposition gegen LPS direkt an derselben Zelle zu untersuchen. Im Rahmen des Lösungsaustauschs wurden instantane Ströme beobachtet, deren Genese und pathophysiologische Bedeutung noch unklar bleiben. Weiterhin wurde eine dauerhafte Reduktion der maximalen Stromamplitude beobachtet, die sowohl durch eine dauerhafte Inaktivierung von hHCN2-Kanälen als auch durch den Effekt der Stromerschöpfung bedingt zu sein schien. Die Verschiebung der Aktivierungskinetik des hHCN2-Kanals in negativere Potenzialbereiche kann zur Verlängerung der Zykluslänge des Aktionspotenzials und damit zur Bradykardie führen. Die Modifikation der Kanalkinetik ist mit dem inhibitorischen Effekt von LPS auf den Schrittmacherstrom I_f vereinbar. Der im Rattenmodell bereits belegte tachykardisierende Effekt von LPS auf HCN-Kanäle wurde im heterologen Expressionssystem noch nicht untersucht. Die direkte Bindung von LPS an HCN-Kanäle könnte *in vivo* einen Beitrag zur prognostisch bedeutsamen Einschränkung der Herzfrequenzvariabilität bei Patienten mit Sepsis und MODS leisten.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Accili E.A., Proenza C., Baruscotti, M., DiFrancesco, D. (2002) From funny current to HCN channels: 20 Years of Excitation. *Physiology*:32-37.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
- Altomare, C., Bucchi, A., Camatini, E., Baruscotti, M., Viscomi, C., Moroni, A. and DiFrancesco, D. (2001) Integrated allosteric model of voltage gating of HCN channels. *J Gen Physiol* 117:519-532.
- Angus, D.C. and van der Poll, T. (2013) Severe sepsis and septic shock. *N Eng J Med* 369:840-851
- Barbuti, A., Gravante, B., Riolfo, M., Milanesi, R., Terragni, B. and DiFrancesco, D. (2004) Localization of pacemaker channels in lipid rafts regulates channel kinetics. *Circ Res* 94:1325-1331.
- Barbuti, A., Terragni, B., Brioschi, C. and DiFrancesco, D. (2007) Localization of f-channels to caveolae mediates specific beta2-adrenergic receptor modulation of rate in sinoatrial myocytes. *J Mol Cell* 42:71-78.
- Baruscotti, M., Bucchi, A. and DiFrancesco, D. (2005) Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker ("funny") current. *Pharmacol Ther* 107:59-79.
- Baruscotti, M., Bucchi, A., Vicomi, C., Mandelli, G., Consalez, G., Gneccchi-Rusconi, T. Montano, N., Casali, K.-R., Micheloni, ., Barbuti, A., DiFrancesco, D. (2011) Deep bradycardia and heart block caused by inducible cardiac-specific knockout of the pacemaker channel gene HCN4. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:1705-1710.
- Biel, M., Wahl-Schott, C., Michalakis, S. and Zong, X. (2009) Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev* 89:847-885.
- Blunck, R., Scheel, O., Muller, M., Brandenburg, K., Seitzer, U. and Seydel, U. (2001) New insights into endotoxin-induced activation of macrophages: involvement of a K⁺ channel in transmembrane signaling. *J Immunol* 166:1009-1015
- Bois, P., Renaudon, B., Baruscotti, M., Lenfant, J. and DiFrancesco, D. (1997) Activation of f-channels by cAMP analogues in macropatches from rabbit sino-atrial node myocytes. *J Physiol* 501 (Pt 3):565-571.
- Brunkhorst, F.M. (2006) Epidemiology, economy and practice - results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet). *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 41:43-44.
- Bucchi, A., DiFrancesco, D., Robinson, R., Qu, J. and Altomare, C. (2002) Functional comparison of HCN isoforms expressed in ventricular and HEK 293 cells. *Pflügers Arch* 444:597-601.
- Chen, S., Wang, J., Siegelbaum, S. (2001) Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J Gen Physiol* 117:491-504.
- Chen, J., Mitcheson, J.S., Lin, M. and Sanguinetti, M.C. (2000) Functional roles of charged residues in the putative voltage sensor of the HCN2 pacemaker channel. *J Biol Chem* 275:36465-36471.
- Cohen, J. (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420:885-891.
- Cowan, D. B., Poutias, D.N., Del Nido, P.J. and McGowan, F.X.Jr (2000) CD14-independent activation of cardiomyocyte signal transduction by bacterial endotoxin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H619-29.
- Cowan, D.B., Noria, S., Stamm, C., Garcia, L.M., Poutias, D.N., del Nido, P.J. and McGowan, F. X. (2001) Lipopolysaccharide internalization activates endotoxin-dependent signal transduction in cardiomyocytes. *Circ Res* 88:491-498.

- Dekker J.P., Yellen G. (2006) Cooperative gating between single HCN pacemaker channels. *J Gen Physiol* 128:561-567.
- DiFrancesco, D. (1981) A study of the ionic nature of the pacemaker current in calf-purkinje-fibres. *J Physiol* 359-376.
- DiFrancesco, D. (1986) Characterization of single pacemaker channels in cardiac sino-atrial node cells. *Nature* 324:470-473.
- DiFrancesco, D., Ferroni A., Mazzanti M. and Tromba C. (1986) Properties of the hyperpolarizing-activated current (I_f) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J Physiol* 377:61-88.
- DiFrancesco, D. and Tromba, C. (1988) Muscarinic control of the hyperpolarization-activated current (I_f) in rabbit sino-atrial node myocytes. *J Physiol* 405:493-510.
- DiFrancesco, D. and Tortora, P. (1991) Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351:145-147.
- DiFrancesco, D. (1993) Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol* 55:455-472.
- DiFrancesco, D. and Mangoni, M. (1994) Modulation of single hyperpolarization-activated channels (I_f) by cAMP in the rabbit sino-atrial node. *J Physiol* 474:473-482.
- DiFrancesco, D. (1999) Dual allosteric modulation of pacemaker (f) channels by cAMP and voltage in rabbit SA node. *J Physiol* 515:367-376.
- DiFrancesco, D. (2010) The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ Res* 106:434-446.
- Ebelt, H., Geissler, I., Ruccius, S., Otto, V., Hoffmann, S., Korth, H., Klöckner, U., Zhang, Y.L.Y., Grossmann, C., Rueckschloss, U., Gekle, M., Stieber, J., Frantz, S., Werdan, K., Muller-Werdan, U. and Loppnow, H. (2015) Direct inhibition, but indirect sensitization of pacemaker activity to sympathetic tone by the interaction of endotoxin with HCN-channels. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 42:874-880.
- Fenske, S., Mader, R., Scharr, A., Pappas, C., Cao-Ehlker, X., Michalakis, S., Shaltiel, L., Weidinger, M., Stieber, J., Feil, S., Feil, R., Hofmann, F., Wahl-Schott, C., Biel, M. (2011) HCN3 Contributes to the Ventricular Action Potential Waveform in the Murine Heart. *Circ Res* 109:1015-1023.
- Fenske, S., Krause, S.-C., Hassan, S.I.H., Becirovic, E., Auer, F., Bernard, R., Kupatt, C., Lange, P., Ziegler, T., Wotjak, C. T., Zhang, H., Hammelmann, V., Pappas, C., Biel, M., Wahl-Schott, C.A. (2013) Sick sinus syndrome in HCN1-deficient mice. *Circulation* 128:2585-2594.
- Fleischmann, C., Thomas-Rueddel, D.O., Hartmann, M., Hartog, C.S., Welte, T., Heublein, S., Dennler, U. und Reinhart, K. (2016) Fallzahlen und Sterblichkeitsraten von Sepsis-Patienten im Krankenhaus. *Dtsch Arztebl int* 113:159-166.
- Gauss, R., Seifert, R. and Kaupp, U.B. (1998) Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 393:583-587.
- Gholami, M., Mazaheri, P., Mohamadi, A., Dehpour, T., Safari, F., Hajizadeh, S. Moore, K.P. and Mani, A.R. (2012) Endotoxemia is associated with partial uncoupling of cardiac pacemaker from cholinergic neural control in rats. *Shock* 37:219-227.
- Godin, P.J., Fleisher, L.A., Eidsath, A., Vandivier, R.W., Preas, H.L., Banks, S.M., Buchman, T.G. and Sufredini, A.F. (1996) Experimental human endotoxemia increases cardiac regularity: results from a prospective, randomized, crossover trial. *Crit Care Med* 24:1117-1124.
- Heinroth, K. M., Kuhn, C., Stache, N., Witthaut, R., Müller-Werdan, U., Werdan, K. und Prondzinsky, R. (1999) Eingeschränkte Herzfrequenzvariabilität bei Patienten mit septischem und nicht-septischem Multiorgan-Dysfunktions-Syndrom. *Intensivmed u Notfallmed* 36:436-445.
- Herrmann, S., Stieber, J., Stöckl, G., Hofmann, F., Ludwig, A. (2007) HCN4 provides a 'depolarization reserve' and is not required for heart rate acceleration in mice. *EMBO J* 26:4423-4432.

- Ishii, T.M., Takano, M., Xie, L.-H., Noma, A. and Ohmori, H. (1999) Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J Biol Chem* 274:12835-12839.
- Kapadia, S., Lee, J., Torre-Amione, G., Birdsall, H.H., Ma, T.S. and Mann, D.L. (1995) Tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest* 96:1042-1052.
- Khaykin, Y., Dorian, P., Tang, A., Green, M., Mitchell, J., Wulffhart, Z., Newman, D. (1998) The effect of sinus node depression on heart rate variability in humans using zatebradine, a selective bradycardic agent. *Can J Physiol Pharmacol* 76:806-810.
- Klößner, U., Rueckschloss, U., Grossmann, C., Ebelt, H., Müller-Werdan, U., Loppnow, H., Werdan, K. and Gekle, M. (2011) Differential reduction of HCN Channel activity by various types of lipopolysaccharide. *J Mol Cell Cardiol* 226-235.
- Klößner, U., Rueckschloss, U., Grossmann, C., Matzat, S., Schumann, K., Ebelt, H., Müller-Werdan, U., Loppnow, H., Werdan, K. and Gekle, M. (2014) Inhibition of cardiac pacemaker channel hHCN2 depends on intercalation of lipopolysaccharide into channel-containing membrane microdomains. *J Physiol* 592:1199-1211.
- Li, N., Csepe, T.A., Hansen, B.J., Dobrzynski, H., Higgins, R.S.D., Kilic, A., Mohler, P.J., Janssen, P.M.L., Rosen, M. R., Biesiadecki, B.J. and Fedorov, V.V. (2015) Molecular mapping of sinoatrial node HCN channel expression in the human heart. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 8:1219-1227.
- Lin, W., Laitko, U., Juranka, P.F. and Morris, C.E. (2007) Dual stretch responses of mHCN2 pacemaker channels: accelerated activation, accelerated deactivation. *Biophys J* 92:1559-1572.
- Ludwig A., Zong, X., Jeglitsch, M., Biel, M. (1998) A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393:587-591.
- Ludwig, A., Hofmann, M., Budde, F., Stieber, J., Moosmang, S., Wahl, C., Holthoff, K., Langebartels, A., Wotjak, C., Munsch, T., Zong, X., Feil, S., Feil, R., Lancel, M.-C., Kenneth, R., Konnerth, H. (2003) Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *EMBO J* 22:216-224.
- Mangoni, M.E. and Nargeot, J. (2008) Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev* 88:919-982.
- Marionneau C., Couette B., Liu J., Li H., Mangoni M.E., Nargeot J., Lei M., Escande D., Demolombe S. (2005) Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol* 562:223-234.
- Marshall, J. C., Walker, P. M., Foster, D. M., Harris, D., Ribeiro, M., Paice, J., Romaschin, A. D., Derzko, A. N. (2002) Measurement of endotoxin activity in critically ill patients using whole blood neutrophil dependent chemiluminescence. *Crit Care* 6:342-348.
- Noma, A., Kotake, H. and Irisawa, H. (1980) Slow inward current and its role mediating the chronotropic effect of epinephrine in the rabbit sinoatrial node. *Pflügers Arch* 388:1-9.
- Numberger, M., Draguhn, A. und Sakmann, B.: Patch-Clamp-Technik. Spektrum, Akad. Verl, Heidelberg, 1996 S. 69, S. 88
- Parrillo JE (1989) The cardiovascular pathophysiology of sepsis. *Annu Rev Med* 40:469-485.
- Pian, P., Bucchi, A., Robinson, R. B., Siegelbaum SA (2006) Regulation of gating and rundown of HCN hyperpolarization-activated channels by exogenous and endogenous PIP2. *J Gen Physiol* 128:593-604.
- Pittoors, F., Van Bogaert, P. P. (2015) HCN2 channels: A permanent open state and conductance changes. *J Membrane Biol* 248:67-81 Proenza, C., Angoli, D., Agranovich, E., Macri, V. and Accili, E.A. (2002) Pacemaker channels produce an instantaneous current. *J Biol Chem* 277:5101-5109.
- Qu, J., Barbuti, A., Protas, L., Santoro, B., Cohen, I.S. and Robinson, R. B. (2001) HCN2 overexpression in newborn and adult ventricular myocytes; distinct effects on gating and excitability. *Circ Res* 89:e8.

- Raetz, C. (1990) Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem* 59:129-170.
- Rietschel, E.T., Kirikae, T., Schade F.U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A.J., Zähringer, U., Seydel, U., Padova, F., Schreier, M. and Brade, H. (1994) Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* 8:217-225.
- Santoro, B. (1998) Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell*: 717-729.
- Santoro, B. and Tibbs, G.R. (1999) The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann N Y Acad Sci* 868:741-764.
- Schmidt, H., Hoyer, D., Hennen, R., Heinroth, K., Rauchhaus, M., Prondzinsky, R., Hottenrott, K., Buerke, M., Müller-Werdan U. and Werdan, K. (2008) Autonomic dysfunction predicts both 1- and 2-month mortality in middle-aged patients with multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 36:967-970.
- Schmidt, H., Lotze, U., Ghanem, A., Anker, S.D., Said, S.M., Braun-Dullaes, R., Oltmanns, G., Rose, S., Buerke, M., Müller-Werdan, U., Werdan, K. and Rauchhaus, M. (2014) Relation of impaired interorgan communication and parasympathetic activity in chronic heart failure and multiple-organ dysfunction syndrome. *J Crit Care* 29:367-373.
- Schmidt, H., Müller-Werdan, U., Hoffmann, T., Francis, D. P., Piepoli, M. F., Rauchhaus, M., Prondzinsky, R., Loppnow, H., Buerke, M., Hoyer, D., Werdan, K. (2005) Autonomic dysfunction predicts mortality in patients with multiple organ dysfunction syndrome of different age groups. *Crit Care Med* 33:1994-2002.
- Schmidt, H., Saworski, J., Werdan, K. and Müller-Werdan, U. (2007) Decreased beating rate variability of spontaneously contracting cardiomyocytes after co-incubation with endotoxin. *J Endotoxin Res* 13:339-342.
- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J.-D., Coopersmith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubenfeld, G. D., van der Poll, T. Vincent, J.-L., Angus, D. C. (2016) The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *J Am Med Assoc* 315:801-810.
- Stieber, J., Herrmann, S., Feil, S., Loster, J., Feil, R., Biel, M., Hofmann, F., Ludwig, A. (2003) The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15235-15240.
- Stieber, J., Hofmann, F., Ludwig, A. (2004) Pacemaker channels and sinus node arrhythmia. *Trends Cardiovasc Med* 14:23-28.
- Thon, S., Schmauder, R. and Benndorf, K. (2013) Elementary functional properties of single HCN2 channels. *Biophys J* 105:1581-1589.
- Trent, S. M., Stead C., Tran A. X., Hankins J. V. (2006) Invited review: Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. *J Endotoxin Res* 12:205-223.
- Tsien, R.W. (1974) Effects of epinephrine on the pacemaker potassium current of cardiac Purkinje fibers. *J Gen Physiol* 64:293-319.
- Varghese, A., TenBroek, E.M., Cole, J. Jr. and Sigg, D.C. (2006) Endogenous channels in HEK cells and potential roles in HCN ionic current measurements. *Prog Biophys Mol Biol* 90:26-37.
- Venet, C., Zeni, F., Viallon, A., Ross, A., Pain, P., Gery, P., Page, D., Vermesch, R., Bertrand, M., Rancon, F., Bertrand, J. C. (2000) Endotoxaemia in patients with severe sepsis or septic shock. *Int Care Med* 26:538-544.
- Werdan, K., and Müller-Werdan, U. (1996) Elucidating molecular mechanisms of septic cardiomyopathy – the cardiomyocyte model. *Mol Cell Biochem* 163:291-303.

- Werdan, K., Schmidt, H., Ebelt, H., Zorn-Pauly, K., Koidl, B., Hoke, R.S., Heinroth, K. and Müller-Werdan, U. (2009) Impaired regulation of cardiac function in sepsis, SIRS, and MODS. *Can J Physiol Pharmacol* 87:266-274.
- Wondergem, R., Graves, B.M., Ozment-Skelton, T.R., Li, C. and Williams, D.L. (2010) Lipopolysaccharides directly decrease Ca^{2+} oscillations and the hyperpolarization-activated nonselective cation current I_f in immortalized HL-1 cardiomyocytes. *Am J Physiol, Cell Physiol* 299:C665-71.
- Yu, H., Wu, J., Potapova, I., Wymore, R.T., Holmes, B., Zuckerman, J., Pan, Z., Wang, H., Shi, W., Robinson, R.B., El-Maghrabi, M R., Benjamin, W., Dixon, J., McKinnon, D., Cohen, I. S. and Wymore, R. (2001) MinK-related peptide 1: A beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ Res* 88:E84-7.
- Zila, I., Mokra, D., Kopincova, J., Kolomaznik, M., Javorka, M. and Calkovska, A. (2015) Heart rate variability and inflammatory response in rats with lipopolysaccharide-induced endotoxemia. *Physiol Res* 64 Suppl 5:S669-76.
- Zong, X., Stieber J., Ludwig, A., Hofmann, F. and Biel, M. (2001) A single histidine residue determines the pH sensitivity of the pacemaker channel HCN2. *J Biol Chem* 276:6313-6319.
- Zorn-Pauly, K., Pelzmann, B., Lang, P., Machler, H. Schmidt, H., Ebelt, H., Werdan, K., Koidl, B. and Munt, B. (2007) Endotoxin impairs the human pacemaker current I_f . *Shock* 28:655-661.

8 THESEN

1. Die Exposition gegen LPS in signifikanter Konzentration führt bei hHCN2-Kanälen zu einer Verschiebung der Aktivierungskinetik in negativere Potenzialbereiche.
2. Die Exposition gegen LPS moduliert die Kinetik von hHCN2-Kanälen im Sinne einer erschwerten Aktivierung und erleichterten Deaktivierung.
3. Durch das restriktivere Öffnungsverhalten nach Exposition gegen LPS kommt es in Folge einer verminderten Offenwahrscheinlichkeit des hHCN2-Kanals beim gegebenen Membranpotenzial zu einer Verminderung des Kationeneinstroms.
4. Die Exposition gegen LPS in hoher Dosierung führt zur irreversiblen Inaktivierung eines Teils der Kanalpopulation.
5. Die Modulation der Kinetik des hHCN2-Kanals durch LPS geschieht innerhalb von wenigen Sekunden und hält in Anwesenheit von LPS für mehrere Stunden an.
6. Die Modulation der Kinetik des hHCN2-Kanals durch LPS geschieht dabei dosisabhängig und erreicht ein Sättigungsniveau. Sie kann ähnlich einer Enzymkinetik erster Ordnung beschrieben werden.
7. Die Modulation der Kinetik des hHCN2-Kanals durch LPS geschieht wahrscheinlich durch eine direkte Interaktion von LPS-Molekül und hHCN2-Kanal.
8. Eine Verschiebung der Aktivierungskinetik von hHCN2-Kanälen in negativere Potenzialbereiche, sowie deren erschwerte Aktivierung und erleichterte Deaktivierung könnten über eine Zunahme der Zykluslänge und verminderten Anstiegssteilheit des Sinusknoten-Aktionspotenzials im Rahmen der diastolischen Depolarisation zur Bradykardie führen (inhibitorischer Effekt).
9. In vivo könnte die direkte Modulation der Kinetik von hHCN2-Kanälen durch LPS einen Beitrag zur prognostisch bedeutsamen Einschränkung der Herzfrequenzvariabilität bei Patienten mit Sepsis und MODS leisten.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Saskia Dahm, geb. Matzat
Geburtsdatum	13.03.1987
Geburtsort	Zwickau

Beruflicher Werdegang

ab 12/2018 Facharztweiterbildung Arbeitsmedizin Fa. Medical Airport (Halle)
01/2013-09/2018 Facharztweiterbildung Innere Medizin
09/2015-09/2018 Martha-Maria Krankenhaus Halle-Dölau
01/2013-06/2015 St. Elisabeth-Krankenhaus Halle

Studium

10/2005-06/2012	Studium der Humanmedizin, MLU Halle-Wittenberg
03/2008	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02/2011-01/2012	Praktisches Jahr, Wahlfach: Psychotherapie und Psychosomatik
06/2012	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Schulbildung

1997-2005	Goethe-Gymnasium Auerbach /V.
07/2005	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Saskia Dahm, 01.11.2018

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet (Amtsblatt der MLU Nr. 5, 02.07.09).

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Saskia Dahm, 01.11.2018

ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE

Ich erkläre hiermit, dass diese Dissertation meinen ersten Promotionsversuch darstellt und an anderen Universitäten kein weiteres Promotionsverfahren gegen meine Person erfolgt.

Saskia Dahm, 01.11.2018

DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Michael Gekle bedanken, der nicht nur diese Arbeit ermöglicht hat, sondern trotz seines enormen Arbeitspensums nicht nur eine offene Tür, sondern auch stets ein offenes Ohr für meine Fragen und Probleme hatte und meine Doktorarbeit auf herausragende Art und Weise begleitet hat. Ich bedanke mich bei Prof. Dr. med. Udo Klöckner, der mich in die Geheimnisse der patch-clamp-Technik eingeweiht, mich während der Experimentalphase in allen Frustrationen und Erfolgen geduldig unterstützt und sehr sorgfältig Korrektur gelesen hat.

Das Team des Julius-Bernstein-Instituts hat die Forschungsarbeit nicht nur zur Belastung, sondern vor allem zur Bereicherung werden lassen. Besonders möchte ich mich bei Sigrid Mildenberger als Laborleiterin für die hervorragende fachliche Betreuung der Laborarbeit bedanken. Für die schöne Zeit im Institut und die vielfältige Unterstützung danke ich auch Katja und Kerstin Quarch, PD Dr. vet. Barbara Schreier, Monika Schmidt, Dr. rer. nat. Anja Pippel und Dr. med. Robert Cuno.

Ohne meine Eltern und meine Oma hätte ich dieses Mammutprojekt niemals stemmen können – ich möchte mich für die großzügige Unterstützung meiner Studien- und Promotionszeit bedanken. Ebenso danke ich Heinke Dahm.

Ich danke meinem Ehemann Christoph Dahm, der als Fels in der Brandung seit unserer frühen Studienzeit durch alle Höhen und Tiefen treu mit mir geht.

Neben der Doktorarbeit gab es noch ein Leben in der Klinik – vielen Dank an die Chefärzte Dr. med. Burcin Özüyaman und Dr. med. Markus Seige, die mich nicht nur fachlich hervorragend ausgebildet, sondern trotz der Belastungen des Klinikalltags auch meine Doktorarbeit aktiv unterstützt haben.

Ebenso möchte ich meinen vielen Freunden danken, die mich auf diesem für uns alle nervenzehrenden Weg begleitet haben und trotzdem meine Freunde geworden und geblieben sind.

Ganz besonders danke ich Prof. Dr. med. Hans-Joachim Busse und Dr. med. Elfi Busse für Gebet und Korrekturlesen, sowie Dr. med. Peter Cuno, ohne dessen Hilfe ich Anatomie nie bestanden hätte.