

Die kardiale Funktion von *Popdc1* in der Maus: Vom Gen zum Phän

Dissertation

zur Erlangung des

naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Stephanie Breher

aus Kiel

Würzburg 2008

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. M. J. Müller

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Brand

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Müller

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	7
1.1	Zusammenfassung.....	7
1.2	Summary.....	8
2	Einleitung	9
2.1	Das kardiale Erregungsleitungssystem	9
2.1.1	Die Erregungsbildung im Herzen.....	9
2.1.2	Aufbau und Funktion des kardialen Reizleitungssystems.....	10
2.1.3	Das Elektrokardiogramm (EKG).....	11
2.1.4	Aktionspotentiale im Herzen.....	12
2.2	Ionenkanäle im Herzen	15
2.2.1	Kaliumkanäle im Reizleitungssystem.....	15
2.2.2	Calciumkanäle im Reizleitungssystem.....	15
2.2.3	Die HCN (Hyperpolarization-Activated Nucleotide-Gated Cation) Kanalfamilie.....	16
2.2.4	Natriumkanäle im Reizleitungssystem.....	16
2.2.5	TREK1.....	17
2.2.6	Connexine im Reizleitungssystem.....	19
2.3	Die Schrittmacherfunktion des Sinusknotens	20
2.4	T-Tubuli und die Kopplung von Erregung und Kontraktion	22
2.4.1	Die Kopplung von Erregung und Kontraktion.....	22
2.4.2	Struktur und Funktion der kardialen T-Tubuli.....	23
2.4.3	Ca ²⁺ -und Na ⁺ -Kanäle in den T-Tubuli.....	24
2.4.4	K ⁺ -Kanäle in den T-Tubuli.....	25
2.4.5	Anionenaustauscherproteine in den T-Tubuli.....	25
2.4.6	Entwicklung der T-Tubuli in kardialen Myozyten.....	25
2.5	Zyklische Nukleotide	26
2.5.1	Zyklische Nukleotide und deren Bindungsproteine.....	26
2.5.2	Der Aufbau der Bindungsdomäne.....	27
2.6	Die Popeye domain containing-Genfamilie	28
2.6.1	Die Isolierung der <i>Popeye domain containing</i> -Genfamilie.....	28
2.6.2	Die Expressionsdomänen der <i>Popdc</i> -Genfamilie.....	29
2.6.3	Der Aufbau von Popdc-Proteinen.....	30
2.6.4	Die Funktion von Popdc-Proteinen.....	31
2.6.5	Popdc in der Erregungsleitung.....	32
2.7	Ziele der Arbeit	33

3	Material	35
3.1	Geräte	35
3.2	Verbrauchsmaterial	36
3.3	Chemikalien, Reagenzien.....	37
3.4	spezielle Agarosen	39
3.5	Enzyme und dazu gehörige Puffer.....	40
3.6	Antikörper.....	40
3.6.1	Primäre Antikörper	40
3.6.2	Sekundäre Antikörper	40
3.7	Kits.....	41
3.8	Marker.....	41
3.8.1	DNA-Marker	41
3.8.2	Protein-Marker	41
3.9	Eier.....	41
3.10	Eukaryotische Zellen.....	41
3.11	Bakterienstämme und Vektoren	41
3.12	Synthetische Oligonukleotide	42
4	Methoden.....	43
4.1	DNA-analytische Methoden	43
4.1.1	Mini-Präparation	43
4.1.2	Aufreinigung der Mini-DNA	43
4.1.3	Midi-Präparation	43
4.1.4	PCR	44
4.1.5	Restriktionsverdau.....	44
4.1.5.1	Standardrestriktionsansatz	45
4.1.6	Dephosphorylierung von DNA	45
4.1.7	Geextraktion von DNA-Fragmenten.....	45
4.1.8	Ligation	45
4.1.8.1	Ligationsansatz.....	46
4.1.9	Herstellung transformationskompetenter Zellen.....	46
4.1.10	Transformation	46
4.1.11	Herstellung von Glycerinstocks	47
4.2	Genotypisierung von <i>Podc1</i> -Mäusen	47

4.3	Zellbiologische Methoden	48
4.3.1	Auftauen von Zellen	48
4.3.2	Kultur von Zellen	48
4.3.3	Splitten von Zellen	48
4.3.4	Einfrieren von Zellen	49
4.3.5	Transfektion von Zellen	49
4.3.6	Isolierung von adulten kardialen Myozyten aus der Maus	49
4.4	Protein-analytische Methoden	49
4.4.1	Erstellen des 3D-Modells von Popdc1	49
4.4.2	Herstellung von Protein-Totalextrakten	50
4.4.2.1	von neonatalen Mäuseherzen	51
4.4.2.2	von adultem Mäuseherzgewebe	51
4.4.2.3	von embryonalen Hühnerherzen	52
4.4.2.4	von Zellkulturen	52
4.4.3	Fraktionierung von Proteinen	52
4.4.3.1	Subzelluläre Fraktionierung in Kerne, Zytosol und Membranen	52
4.4.3.2	Subzelluläre Fraktionierung in membranassoziierte und transmembrane Proteine	53
4.4.4	Deglykosylierung von Popdc1	54
4.4.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	54
4.4.6	Methanol-Chloroform-Fällung von Proteinen	55
4.4.7	Immunpräzipitation	55
4.4.8	cAMP-Präzipitation	56
4.4.8.1	cAMP-Präzipitation und Ethanolamin-Präzipitation	56
4.4.8.2	cAMP-Präzipitation mit embryonalen Hühnerherzlysat und anschließender Elution	56
4.4.8.3	cAMP-Präzipitation mit Lysaten aus transfizierten Zellen	57
4.4.8.4	Kompetition mit cGMP und 6-MB-cAMP	57
4.4.9	Diskontinuierliche Gelelektrophorese/ SDS-PAGE	58
4.4.9.1	Aufarbeitung der Proben	58
4.4.9.2	Gelelektrophorese	59
4.4.9.3	Western Blot	59
4.4.9.3.1	Antikörpernachweis auf der Membran	60
4.4.9.3.2	Primärantikörper	60
4.4.9.3.3	Sekundärantikörper	60
4.4.9.4	Entwicklung von Filmen	61
4.5	Histologie	61
4.5.1	Präparation von Mäuseherzen und Sinusknoten	61
4.5.2	Anfertigung von Gefrierpräparaten	62
4.5.3	Anfertigung von Gefrierschnitten	62
4.5.4	LacZ-Färbung	62
4.5.5	Acetylcholinesterase-Färbung	63
4.5.6	Eindeckeln von Objektträgern	63
4.6	Antikörperfärbungen auf Gefrierschnitten	63
4.6.1	Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten	64
4.6.2	Immunfluoreszenz	65
4.6.2.1	Antikörperverdünnungen	65
4.6.2.1.1	Primärantikörper	65

4.6.2.1.2	Sekundärantikörper	65
4.6.2.2	Immunfluoreszenz auf Gefrierschnitten und isolierten kardialen Myozyten mit Primärantikörpern aus verschiedenen Spezies.....	65
4.6.2.3	Immunfluoreszenz mit zwei Primärantikörpern aus der gleichen Spezies ..	66
4.7	Dokumentation mit dem konfokalen Mikroskop	66
4.8	Messung der Profile	66
4.9	Whole mount Färbungen vom Sinusknoten	66
4.9.1	Antikörper	67
4.9.1.1	Primärantikörper.....	67
4.9.1.2	Sekundärantikörper	67
4.10	3D-Rekonstruktion.....	67
4.10.1	3D-Rekonstruktion von Schnitten des Sinusknotens	67
4.10.2	3D-Rekonstruktion des <i>whole mount</i> - gefärbten Sinusknotens	68
4.11	Student's t-test.....	68
4.12	Elektrophysiologische Messungen	69
4.12.1	Elektrophysiologische Messungen in Froschoozyten	69
4.12.2	Elektrophysiologische Messungen an Mäusen	69
4.12.2.1	Echokardiographie	69
4.12.2.2	EKG und Telemetrie	70
4.12.2.3	Elektrophysiologische Studien am isolierten Herzen.....	70
5	Ergebnisse	71
5.1	Die <i>Popdc1</i>-Maus	71
5.1.1	Der Phänotyp der <i>Popdc1</i> -Mäuse	71
5.1.2	<i>Popdc1</i> -Mäuse zeigen ein geringeres Körper- und Herzgewicht.....	72
5.1.3	<i>Popdc1</i> -Mäuse zeigen eine geringere Herzrate nach Stressinduktion	74
5.1.4	<i>Popdc1</i> -Mäuse zeigen nur eine Veränderung in der Herzrate	75
5.1.5	Der stressinduzierte Phänotyp in den <i>Popdc1</i> -Mäusen ist altersabhängig.....	77
5.1.6	Zwischen <i>Popdc1</i> - und Wildtypmäusen gibt es keinen Unterschied in den PQ- Intervallen	79
5.1.7	Elektrophysiologische Untersuchungen an isolierten Herzen.....	79
5.1.8	Strukturelle Veränderungen des Sinusknotens von <i>Popdc1</i> -Mäusen	80
5.1.9	Der <i>Popdc1</i> -Antikörper zeigt nur in Wildtypmäusen ein Signal	84
5.2	Das Expressionsmuster von <i>Popdc1</i> im Herzen	86
5.2.1	Das Expressionsmuster von <i>Popdc1</i> im Reizleitungssystem im Herzen	86
5.2.2	Die <i>Popdc1</i> -Expression kolokalisiert mit der HCN4-Expression im Reizleitungssystem	87
5.2.3	Die <i>Popdc1</i> - und Cx40-Lokalisation in den verschiedenen Bereichen des Herzens	89
5.2.4	<i>Popdc1</i> wird nicht im Epikard und nicht in den Gefäßen des Myokards exprimiert.....	91
5.2.5	Subzelluläre Distribution von <i>Popdc1</i>	92

5.2.5.1	Popdc1 kolokalisiert mit N-Cadherin und Connexin 43 in den Glanzstreifen.	92
5.2.5.2	Die Expression von Popdc1 in den T-Tubuli der Herzmuskulatur	95
5.2.5.3	Die Popdc1-Expression in der Querbänderung von ventrikulären Myozyten	97
5.3	Die biochemische Charakterisierung von Popdc1.....	100
5.3.1	Popdc1 ist ein Membranprotein	100
5.3.2	Popdc1 ist ein glykosyliertes Protein und dimerisiert.....	101
5.3.3	Die <i>Popeye</i> -Domäne	102
5.3.4	Die Bindung von Popdc1 an cAMP	106
5.3.5	Popdc1 kann mit cAMP und cGMP von der cAMP-Agarose eluiert werden	107
5.3.6	Kompetition der Popdc1-Bindung an cAMP-Agarose durch cGMP und cAMP.	108
5.3.7	Popdc1, Popdc2 und Popdc3 binden an cAMP.....	109
5.4	Popdc und TREK1	111
5.4.1	Popdc1 moduliert den TREK1-Hintergrundstrom	111
5.4.2	Popdc1 und TREK1 kolokalisieren partiell im Herzgewebe	114
5.4.3	Die Lokalisation von Popdc1 und TREK1 in isolierten Myozyten	118
5.4.4	Lokalisation von Popdc1-myc und TREK1-flag in Cos7-Zellen.....	120
5.4.5	Interaktionsstudien für Popdc1 und TREK1	123
6	Diskussion.....	125
6.1	Die <i>Popdc1</i>-Maus zeigt ein geringeres Körpergewicht und Herzgewicht sowie einen geringeren Fettanteil.....	125
6.2	Popdc1 im Reizleitungssystem	126
6.2.1	Die elektrophysiologischen Untersuchungen an der <i>Popdc1</i> -Maus	126
6.2.2	Das Volumen und die Oberfläche des Sinusknotens von <i>Popdc1</i> -Mäusen ...	130
6.2.3	Die Expression von Popdc1 im Reizleitungssystem	131
6.3	Popdc1-Lokalisation im Arbeitsmyokard.....	132
6.4	Popdc1 ist ein glykosyliertes Transmembranprotein und bildet Dimere	135
6.5	Die <i>Popeye</i>-Domäne und deren Eigenschaft zyklische Nukleotide zu binden	136
6.6	Die Interaktion von Popdc1 und TREK1.....	139
6.6.1	Popdc1 und TREK1 kolokalisieren.....	139
6.6.2	Popdc1 moduliert den TREK1-Strom und wird von TREK1 immuopräzipitiert	140
6.7	Das Arbeitsmodell von Popdc1	142

7	Literaturverzeichnis	145
8	Anhang.....	157
8.1	Abkürzungen	157
8.2	Lebenslauf	160
8.3	Publikationen	161
8.4	Präsentationen/Poster	161
8.5	Erklärung.....	162
8.6	Danksagung.....	163

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Die *Popeye domain containing (Popdc)*-Gene bilden eine evolutionär stark konservierte Genfamilie mit präferenzialer Expression im Herzen und in der Skelettmuskulatur. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Popdc1 in kardialen Myozyten in Glanzstreifen, lateralen Membranen und im T-Tubuli-System exprimiert wird und mit Ionenkanälen und anderen myozytären Membranproteinen wie Ca_v1.2, Caveolin 3 und NCX1 kolokalisiert ist. Im ventrikulären Reizleitungssystem ist die Expression von Popdc1 gegenüber dem ventrikulären Arbeitsmyokard erhöht, während Atrium und Sinusknoten nahezu äquivalente Expressionsdomänen aufweisen. Mithilfe von elektrophysiologischen Untersuchungen konnte bei den *Popdc1*-Nullmutanten eine stressinduzierte Sinusbradykardie festgestellt werden, die altersabhängig auftritt und auf Sinuspausen zurückzuführen ist. Histologische Untersuchungen, unter Zuhilfenahme des Sinusknotenmarkers HCN4, zeigten einen Zellverlust im inferioren Teil des Sinusknotens. Popdc1 ist ein Transmembranprotein, das eine 150 Aminosäure umfassende, stark konservierte *Popeye*-Domäne aufweist. Für diese Domäne konnte auf struktureller Ebene eine Homologie zu zyklischen Nukleotid-Bindungsdomänen vorhergesagt und eine Bindung an cAMP und cGMP experimentell demonstriert werden. Es handelt sich bei den Popdc-Proteinen um einen neuen Zweig der Bindungsproteine für zyklische Nukleotidmonophosphate (cNMP). Die Bindungssequenz weist signifikante Unterschiede zu anderen bereits identifizierten cNMP-Bindungsproteinen auf. Weiterhin wurde die Interaktion von Popdc1 mit TREK1, einem Mitglied der Tandemporenkanäle untersucht. Es zeigte sich, dass Popdc1 nach Koexpression in Froschoozyten, den TREK1-Strom erhöht und dass die β -adrenerge Inhibition des TREK1 Kanals durch Popdc1 verstärkt wird. Im Arbeitsmyokard, im kardialen Reizleitungssystem und in kotransfizierten Cos7-Zellen werden beide Proteine überlappend exprimiert. Diese Daten zeigen, dass Popdc1 eine wichtige Funktion bei der Regulation der Schrittmacheraktivität, der Aufrechterhaltung der Sinusknotenmorphologie und der Modulation von Ionenkanälen aufweist. Interessanterweise wurden von unserer Arbeitsgruppe bereits die gleichen Phänotypen für die *Popdc2* Maus beschrieben, sodass die Popdc Genfamilie überlappende und redundante Funktionen aufweist.

1.2 Summary

The *Popeye domain containing (Popdc)* family is a highly evolutionary conserved gene family, which shows no homology to other genes. This family shows a preferential expression in the heart and skeletal muscle. In the present study it is shown that Popdc1 protein in the heart was predominantly localized to the intercalated disc, lateral membranes and T-tubular-system, where it was co-localized with other cardiac membrane proteins such as $Ca_v1.2$, Caveolin 3 and NCX1. The expression of *Popdc1-LacZ* transgene as well as Popdc1 protein was elevated in the ventricular conduction system compared to the ventricular working myocardium. In contrast, expression in atrial tissue was equivalent to the expression in the sinus node. Electrophysiological measurements in *Popdc1* null mutants revealed a stress-induced and age-dependent sinus bradycardia, which was due to an increase in sinus pauses and independent of the nature of stress. Histological examinations with the help of the sinus node marker HCN4 revealed structural alterations in the inferior part of the sinus node in 8 months old *Popdc1*-mice. Biochemical examinations of Popdc1 showed that Popdc1 is a transmembrane protein. The N-terminus is extracellular and glycosylated, while the C-terminus is intracellular and harbours a highly conserved 150 amino acid-long *Popeye* domain. For this domain, a predicted homology to cyclic nucleotide binding domains was observed. Binding of cAMP and cGMP was experimentally demonstrated and thus, the Popdc proteins constitute a novel branch of the cyclic nucleotide binding protein family. Furthermore interaction of Popdc1 with the tandem pore channel TREK1 was examined. After co-injection of Popdc1 the TREK1 current was increased in *Xenopus* oocytes. Furthermore, β -adrenergic inhibition of TREK1 current was enhanced in the presence of Popdc1. In working myocardium, conduction tissue as well as in co-transfected Cos7 cells the two proteins showed a similar distribution. In conclusion, Popdc1 is involved in cardiac pacemaker activity, maintaining sinus node morphology and modulating ion channels that contribute to the setting of the membrane potential in cardiac myocytes. Interestingly, a highly similar phenotype was observed for the *Popdc2* mouse mutant and therefore the Popdc gene family displays overlapping and redundant functions.

2 Einleitung

2.1 Das kardiale Erregungsleitungssystem

2.1.1 Die Erregungsbildung im Herzen

Das Herz ist das erste Organ, welches während der Morphogenese der Vertebraten seine Funktion aufnimmt. Das Herz ist eine rhythmische, elektromechanische Pumpe, die sauerstoffarmes Blut in den Lungen- und sauerstoffreiches Blut in den Körperkreislauf pumpt. Die Pumpwirkung basiert auf einem Wechsel von Kontraktion und Relaxation der Herzmuskulatur. Diese Funktion ist abhängig von einer exakten elektrischen Erregungsleitung, die realisiert wird durch eine sequentielle Aktivierung von Zellen in spezialisierten „Schrittmacherregionen“ und als kardiales Reizleitungssystem bzw. Erregungsleitungssystem bezeichnet wird, sowie der Ausbreitung der elektrischen Aktivität in den Zellen der Kammermuskulatur, die auch als Arbeitsmyokard benannt wird. Da die kardialen Myozyten selbsterregend sind, werden sie als autorhythmisch bezeichnet. Erreicht ein Aktionspotential das Arbeitsmyokard, kontrahiert dieses. Nach Relaxation des Muskels und einer Refraktärzeit können die Zellen erneut auf ein weiteres Aktionspotential reagieren. Die Induktion von Aktionspotentialen und die zeitliche Abfolge der Erregungsleitung in den distinkten Regionen des Herzens bzw. in den verschiedenen Elementen des Reizleitungssystems können durch das Elektrokardiogramm (EKG) dargestellt werden.

Für die Ausbildung eines Aktionspotentials sind verschiedene Ionenströme verantwortlich, die in den verschiedenen Regionen des Herzens ein distinktes Vorkommen aufweisen und eine regionenspezifische Verlaufsform des Aktionspotentials generieren. Die Ausbreitung der elektrischen Aktivität und die Koordinierung der elektromechanischen Funktionalität im Arbeitsmyokard hängen auch von der elektrischen Kopplung zwischen den Zellen ab, was von den Gap Junctions übernommen wird, d.h. wird eine Zelle erregt, breitet sich die Erregung auf die anderen kardialen Myozyten aus. Die Zellen bilden ein sogenanntes funktionelles Synzytium.

Anmerkung zur Nomenklatur von Genen und Proteinen

In dieser Arbeit wird die Nomenklatur von Alberts aus „A Note to the Reader“ (Alberts et al., 2007) übernommen: Gene werden kursiv und mit dem ersten Buchstaben groß und mit den nachfolgenden Buchstaben klein geschrieben. Um Gene unterscheiden zu können, die funktionell bzw. evolutionär miteinander verwandt sind, werden die dazugehörigen angefügten Buchstaben groß geschrieben z.B. *LacZ*. Es werden keine Bindestriche zum Separieren angefügter Buchstaben oder Zahlen verwendet. Die Nomenklatur der Proteine wird ähnlich behandelt, nur dass das Protein in römischen Buchstaben geschrieben wird. Akronyme werden weiterhin mit Großbuchstaben aufgezeichnet z.B. GFP für „green fluorescent protein“.

2.1.2 Aufbau und Funktion des kardialen Reizleitungssystems

Das kardiale Reizleitungssystem ist ein spezialisiertes Gewebenetzwerk, das den rhythmischen Herzschlag initiiert und aufrechterhält. Es wird benötigt, um einen gerichteten Blutfluss zu garantieren und besteht aus verschiedenen Komponenten, die jede eine spezifische Funktion für die Koordination der Herzrhythmik besitzen. Zu diesen Komponenten zählt der Sinuatriale Knoten, auch Sinusknoten (SAN) genannt, der Atrioventrikularknoten (AVN), das His-Bündel, die Bündelverzweigungen, auch Tawara-Schenkel genannt, und die Purkinje-Fasern.

Der SAN ist der Schrittmacher des Herzens und liegt an der Verbindung zwischen der Vena cava superior (SVC) und dem rechtem Atrium und generiert einen elektrischen Impuls, der sich über das atriale Myokard ausbreitet und die Kontraktion der Atrien initiiert. Die Zellen des SAN weisen einen verlängerten Zellkern, moderate Mengen an Myofibrillen und viel Glykogen auf. Die Zellen sind kleiner als im Arbeitsmyokard, sind spindelförmig und bilden Bündel entlang der Christa terminalis (Shimada et al., 2004). Ein weiteres Merkmal des Sinusknoten ist sein hoher Anteil an Bindegewebe (De Maziere et al., 1992). Im Zentrum des Sinusknoten befinden sich die sogenannten nodalen Zellen. Es wird vermutet, dass es sich bei diesen Zellen um die eigentlichen Schrittmacherzellen handelt. Diese Zellen sind nicht nur schmal, sie enthalten auch nur wenige Myofilamente, die nicht in Myofibrillen organisiert sind. Auch geringe Mengen von Mitochondrien und Sarkoplasmatisches Retikulum sind in diesen nodalen Zellen vorhanden. Es werden aber mehr Caveolae beobachtet. Vom Zentrum des Sinusknoten bis zur Peripherie verändern sich die Formen der Sinusknotenzellen graduell. In der transitionellen Zone sind Zellen mit steigender Zahl an Myofibrillen und Mitochondrien vorhanden. Der Übergang zwischen Sinusknoten und atrialem Myokard ist nicht genau festzulegen (Bleeker et al., 1980; Boyett et al., 2000; James et al., 1966; Oosthoek et al., 1993).

Der Atrioventrikularknoten (AVN) liegt an der Basis des atrialen Septums an der Verbindung der Atrien mit den Ventrikeln und ist somit der einzige Erregungsleitungsweg zwischen diesen. Der AVN weist ein kompaktes Cluster nodaler Zellen auf, welche ein retikuläres Netzwerk bilden. Sie sind lose organisiert und scheinen sich mit atrialen Myozyten in höheren, atrialen Bereichen zu vermischen. Der Organisationsgrad steigt, wenn die nodalen Zellen sich mit dem AV-Bündel verbinden. Die Zellen sind schmaler als Arbeitsmyokardzellen, stark verzweigt, haben wenige Myofibrillen und größere Mengen an

Glykogen. Der AVN ist von Bindegewebe umgeben (Kirby, 2007; Shimada et al., 2004). Die Hauptfunktion des AV-Knotens ist die Impulsverzögerung zwischen atrialem und ventrikulärem Myokard, so dass die Atrien kontrahieren bevor die Ventrikel angeregt werden. Nach dieser Verzögerung propagiert der elektrische Impuls über das His-Bündel, welches auf dem ventrikulären Septum sitzt, zu den Bündelverzweigungen, die links und rechts vom Septum verlaufen und in einem Netzwerk der Purkinje-Fasern enden, welche beide Ventrikel durch eine schnelle Impulspropagation simultan aktivieren. Die Myozyten des His-Bündels, der Bündelverzweigungen und der Purkinje-Fasern sind größer als im AV-Knoten und als im Arbeitsmyokard. Sie sind oval und reich an Glykogen. Sie weisen nur wenige, periphere Myofibrillen auf. Purkinje-Fasern sind elektrisch über Gap Junctions gekoppelt. Der große Faserdurchmesser und die Kopplung dieser mit Gap Junctions, ermöglichen die oben erwähnte schnelle Impulswanderung. Weiterhin sind die Purkinje-Fasern elektrisch mit Muskelzellen über Gap Junctions gekoppelt (Kirby, 2007; Shimada et al., 2004).

2.1.3 Das Elektrokardiogramm (EKG)

Das EKG stellt eine grafische Aufzeichnung der elektrischen Aktivität des Herzens über die Zeit dar. Es erlaubt die Analyse der Erzeugung, Ausbreitung und Rückbildung kardialer Erregung sowie des Herzrhythmus. Mit dem EKG können deshalb Herzrhythmusstörungen festgestellt werden, da jeder Abschnitt des EKGs charakteristische Eigenschaften hat, die sich im gesunden und im kranken Herzen unterscheiden. Das EKG ist in verschiedene Abschnitte unterteilt. Die P-Welle zeigt die Initiierung des elektrischen Impulses im Sinusknoten bis zur Erregung der Atrien auf. Die PQ-Strecke ist eine isoelektrische Linie, da in dieser Zeit keine Änderung des Erregungszustandes stattfindet. In dieser Zeit durchläuft die Erregung den AV-Knoten und das His-Bündel. Durch Übergreifen der Erregung auf das Septum entsteht die Q-Zacke. Der QRS-Komplex entspricht der Erregung des Ventrikels. Weil die Muskelmasse der Ventrikel größer als die der Atrien ist, ist der QRS-Komplex größer als die P-Welle. Weiterhin ist der QRS-Komplex nicht wie die P-Welle abgerundet sondern spitzenartig ausgeprägt. Das His/Purkinje-System, welches die Erregungsgeschwindigkeit erhöht, koordiniert diesen Komplex. Während der ST-Strecke sind die Ventrikel vollständig erregt. Sie ist daher isoelektrisch. Die T-Welle kennzeichnet die Erregungsrückbildung im Ventrikel. Gelegentlich kann nach der T-Welle noch eine U-Welle beobachtet werden, die der späten Repolarisation in den Purkinje-Fasern zugeschrieben wird. Das PQ-Intervall wird auch als Erregungsüberleitungszeit bezeichnet. Diese beinhaltet die Zeit zwischen dem Beginn der

2. Einleitung

Erregung der Atrien und der Ventrikel. Das QT-Intervall zeichnet die Erregung der Ventrikel auf (Huppelsberg and Walter, 2005; Schmidt et al., 2005).

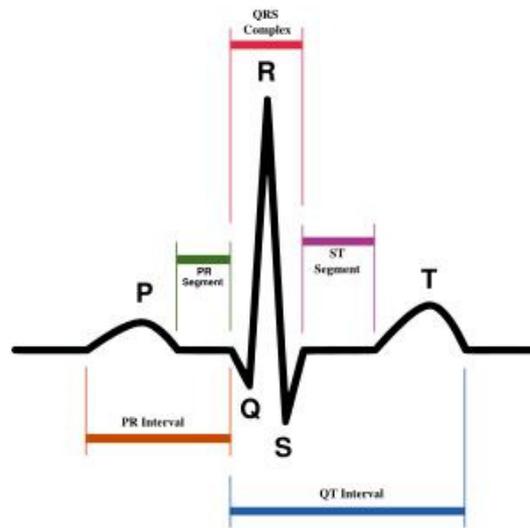


Abb. 2-1: Das Elektrokardiogramm

Die schematische Darstellung zeigt die verschiedenen Abschnitte (P, Q, R, S und T) eines typischen Elektrokardiogramms (entnommen aus Wikipedia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Electrocardiogram>).

2.1.4 Aktionspotentiale im Herzen

Das kardiale Aktionspotential ist der Schlüssel für die elektrische Aktivität im Herzen. Die Form des Aktionspotentials wird durch verschiedenen Ionenströme und Ionentransportsysteme bestimmt. Es ist in mehrere Phasen aufgeteilt, die mit Phase 0, dem Beginn der initialen Depolarisierung, bis Phase 4, dem Ruhezustand, bezeichnet sind.

In der Phase 0, der Aufstrichphase, erfolgt in den ventrikulären und atrialen Myozyten sowie in den Purkinje-Fasern die Depolarisation durch den schnellen Eintritt von Na^+ -Ionen durch Natriumkanäle (Nav-Kanäle), die den nach innen strömenden Na^+ -Strom (I_{Na}) generieren. Der Phase 0 folgt eine transiente Repolarisationsphase (Phase 1), in der die Natriumkanäle inaktiviert und der schnelle transiente spannungsabhängige nach außen gerichtete K^+ -Strom (I_{to}) aktiviert werden. Diese kurze Repolarisationsphase beeinflusst die Höhe und Dauer des Aktionspotentialplateaus (Phase 2). Diese Plateauphase ist gekennzeichnet durch eine Balance zwischen dem nach innen gerichteten und spannungsabhängigen Strom durch L-Typ Ca^{2+} -Ströme (I_{CaL}) und den nach außen gerichteten repolarisierenden K^+ -Strom. Während dieser Phase erfolgt eine progressive zeitabhängige Aktivierung des verzögerten Auswärtsgerichteterstroms I_{k} , der in die Ströme I_{Ks} , I_{Kr} und I_{Kur} unterteilt werden kann, welche letztendlich das Aktionspotential mit einer Verzögerung in der Phase 3 terminieren

2. Einleitung

und die Spannung auf das Ruhepotential zurückführen. Dieses wird durch den nach innen-gerichteten Strom (I_{K1}) bestimmt, der auch das K^+ -Gleichgewichtspotential auf -80 bis -90 mV während des Ruhepotentials in der Phase 4 setzt. Die in Phase 2 aktivierten L-Typ Ca^{2+} -Kanäle triggern die Erregungs-Kontraktionskopplung im Arbeitsmyokard (Nattel et al., 2007; Nerbonne and Kass, 2005).

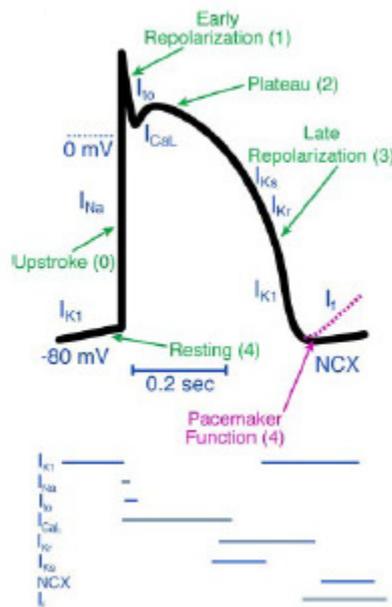


Abb. 2-2: Schematische Darstellung eines kardialen Aktionspotentials (Nattel et al., 2007)

Das kardiale Aktionspotential ist in die Phasen 0 bis 4 (türkische Schrift) unterteilt. Am Aktionspotential sind verschiedene Ströme beteiligt, die hier in blau dargestellt werden. Unterhalb der Aktionspotentialabbildung zeigen die Linien, in welcher Phase und wie lange die Ströme während des Aktionspotentials involviert sind.

Die Aktionspotentiale in Schrittmacherzellen weisen ein anderes Profil auf, da sie kein stabiles Ruhepotential besitzen. Sie repolarisieren nach einer Erregung, erreichen aber nur ein Potential von -60 mV. Durch einen unselektiven Einstrom von Kationen erfolgt eine erneute Depolarisation. Der dazugehörige Strom wird als „funny current“ (I_f) bezeichnet und spielt eine wichtige Rolle bei der Schrittmacherfunktion im Herzen. Wenn die Spontandepolarisation einen Schwellenwert von -40 mV erreicht, werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle geöffnet, was zur Auslösung eines Aktionspotentials führt. Das Ca^{2+} -System ist langsamer als das Na^+ -System, so dass die Aufstrichphase langsamer und flacher ist als bei Zellen des Arbeitsmyokards. Zur Repolarisation werden auch hier K^+ -Kanäle aktiviert (Huppelsberg and Walter, 2005).

2. Einleitung

Die für die Erregung verantwortlichen Ströme und die dazugehörigen Ionenkanäle sowie deren Verteilung in den verschiedenen Regionen des Herzens sind in Abb. 2-3 wiedergegeben.

Subunit	Corresponding Current	Primary Function	Demonstrated Localization
HCN	I_f (pacemaking)	Diastolic depolarization	SAN>>PF>A-V
Kir2.1	I_{K1}	Resting potential, terminal repolarization	V>A>>SAN
Kir3.1/3.4	I_{KACh}	Mediates acetylcholine effects	SAN-A>>V
ERG	I_{Kr} (α -subunit)	Phase-3 repolarization	Present in all tissues. LA>RA; ?V>PF
MiRP1	Modulates I_{Kr} , I_f , I_{to}	?	SAN>>A>V
KvLQT1	I_{Ks} (α -subunit)	Phase-3 repolarization (esp. with β -adrenergic stimulation, I_{Kr} inhibition)	Abundant in A and V. ?V>PF. ?Dominant-negative isoform in M-cells-epi or endo
minK	I_{Ks} (β -subunit)	Necessary to form I_{Ks} with KvLQT1.	SAN>>A-V
Kv4.2/4.3	I_{to} (α -subunit)	Early (phase-1) repolarization	Present in A and V. Species-specific. ?V>PF.
Kv1.4	I_{to} (α -subunit)	Early (phase-1) repolarization	Important in some species (rabbit). ?Endo dominance (ferret).
KChIP2	I_{to} (β -subunit)	Necessary to form I_{to} .	Epi>endo in man and dog.
Kv1.5/3.1	I_{Kur}	Phase 1-2 repolarization.	Atrial-specific. (Kv1.5 man; Kv3.1 dog).
$Ca_v1.2$	I_{CaL} (α -subunit)	Maintenance of plateau. Electromechanical coupling. Automaticity, conduction SAN, AVN	SAN>A. ?V>PF.
$Ca_v1.3$	I_{CaL} component	Role in SAN function in mice.	?Weakly expressed in SAN, A.
$Ca_v3.1-3.3$	I_{CaT}	?Role in pacemaking	SAN>>A. ?PF>V.
$Na_v1.5$	I_{Na}	Conduction A, V, PF	Strong in A, V. Absent in compact AVN.
Cx40,43,45	I_{GJ}	Intercellular conduction	Cx43 strong in A, V, PF; absent in central SAN, AVN. Cx40 strong in central SAN, also present in A. Cx45 in peripheral SAN, central AVN, PF.

Abb. 2-3: Die beteiligten Ionenkanäle in der Erregungsleitung (Schram et al., 2002)

Dargestellt sind die in der Erregungsleitung beteiligten Ionenkanäle, deren Ströme sowie deren Distribution im Herzen und Funktion im Aktionspotential. Abkürzungen: **Untereinheiten:** HCN=hyperpolarization-activated, cyclic-nucleotide; Kir=inward-rectifier K^+ -channel; ERG=ether-a-go-go related channel; MiRP1=minK-related channel 1; KvLQT1=Long-QT Syndrome-1 related channel; minK=minimal K^+ -channel; Kv=voltage-gated K^+ -channel; KChIP2=Kv-channel interacting Untereinheit2; Ca_v =voltage-gated Ca^{2+} -channel; Na_v =voltage-gated Na^+ -channel; Cx=connexin hemichannel. **Ströme:** I_f =funny current; I_{K1} =inward-rectifier K^+ -current; I_{KACh} =acetylcholine-dependent current; I_{Kr} =rapid component of delayed-rectifier current (I_K); I_{Ks} =slow component of delayed-rectifier current (I_K); I_{to} =transient outward K^+ current; I_{Kur} =ultra rapid I_K ; I_{CaL} =L-type Ca^{2+} -current; I_{CaT} =T-type Ca^{2+} -current; I_{Na} = Na^+ -current; I_{GJ} =gap-junctional current. **Gewebe:** V=Ventrikel; A=Atrium; PF=Purkinje-Faser; LA=linkes Atrium; RA=Atrium; epi=Epikard; endo=Endokard

2.2 Ionenkanäle im Herzen

2.2.1 Kaliumkanäle im Reizleitungssystem

Im kardialen Reizleitungssystem gibt es zwei Kaliumkanalproteine, die dort stärker exprimiert werden als im restlichen Myokard. Es sind MinK und TASK1 (Kirby, 2007).

Bei MinK handelt es sich um eine Untereinheit, welche die elektrischen Ströme im Herzen modifiziert, die aus der Expression von *HERG* (human ether-a-go-go-related gene) und *KvLQT1* resultieren. *MinK*-defiziente Mäuse, dessen *MinK*-kodierende Region durch ein *LacZ*-Reporter gen ausgetauscht wurde, zeigen eine prädominante *LacZ*-Expression im Sinusknoten, in der kaudalen Hälfte des rechten atrialen Septums und in der subaortischen Region des linken atrialen Septums, in der Region des AV-Knotens und im proximalen Reizleitungssystem, dem His-Bündel und den Bündelverzweigungen (Kupershmids et al., 1999).

TASK1 gehört zu den Zwei-Poren-Domänen-Kaliumkanälen, die spannungsunabhängig sind und eine Aktivität bei jedem Membranpotential aufweisen. Sie sind für die Hintergrundströme verantwortlich und scheinen wichtig für die Aufrechterhaltung des Ruhepotential zu sein (Lesage and Lazdunski, 2000). Im frühen Herzschlauch ist TASK1 in der Maus sowie im Huhn ubiquitär exprimiert. Aber während der weiteren Kardiogenese wird die ventrikuläre TASK1-Expression auf das His-Bündel, auf die Bündelverzweigungen und auf die Purkinje-Fasern des maturierten Reizleitungssystems begrenzt (Graham et al., 2006).

Weitere Kalium-Kanalproteine, die im Sinusknoten exprimiert werden, sind die Untereinheiten Kir3.1 und Kir3.4 des nach innen gerichteten Kalium-Kanals (Dobrzynski et al., 2001).

2.2.2 Calciumkanäle im Reizleitungssystem

Die mRNAs der spannungsabhängigen Calciumkanäle $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ und $Ca_v1.2$ weisen im Sinusknoten gegenüber den Atrien eine erhöhte Expression auf (Bohn et al., 2000). Obwohl die Expression von $Ca_v1.3$ im Sinusknoten und im Atrium gering ist (Bohn et al., 2000), zeigen $Ca_v1.3$ Knockout-Mäuse eine Sinusknotendysfunktion (Zhang et al., 2002). Auch in den Purkinje-Fasern ist die Expression von einigen spannungsabhängigen Calciumkanälen gegenüber des Ventrikels erhöht, wie z.B. die von $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ und $Ca_v3.3$ (Han et al., 2002).

2.2.3 Die HCN (Hyperpolarization-Activated Nucleotide-Gated Cation) Kanalfamilie

Vier Gene, die für die HCN-Kanäle kodieren, wurden identifiziert. Sie wurden mit *HCN1-4* bezeichnet und sind für den nach innen gerichteten, depolarisierenden Natrium-/ Kaliumstrom (I_f) verantwortlich. Diese Kanäle werden durch Hyperpolarisation des Membranpotentials aktiviert. Weiterhin ist die Aktivität dieser Kanäle von der intrazellulären cAMP-Konzentration abhängig (DiFrancesco et al., 1986; DiFrancesco and Tromba, 1988a; DiFrancesco and Tromba, 1988b). Während auf der mRNA-Ebene durch *in situ* Hybridisierung *HCN1*, *HCN2* und *HCN4*, aber nicht *HCN3* nachgewiesen (Moosmang et al., 2001) und bei quantitative PCR-Analysen alle vier *HCN*-Transkripte im Sinusknoten dokumentiert wurden (Marionneau et al., 2005), konnte auf Proteinebene nur HCN4 im Sinusknoten detektiert werden (Liu et al., 2007). Bis vor kurzem wurde davon ausgegangen, dass die Schrittmacherfunktion durch die cAMP-vermittelte Verstärkung der HCN4-Kanalaktivität reguliert wird. Es zeigte sich aber, dass die Deletion von HCN4 in adulten Mäusen keine Beeinträchtigung auf die Herzrate nach β -adrenerger Stimulation hat. Die Deletion bewirkte aber eine Eliminierung des I_f -Stroms im Sinusknoten und führte zu kardialen Arrhythmien mit periodisch auftretenden Sinuspausen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der HCN4-Kanal für die Beibehaltung des stabilen kardialen Rhythmus' verantwortlich ist (Herrmann et al., 2007).

HCN1- und *HCN4*- Transkripte werden in den Purkinje-Fasern der Ratte und des Kaninchen exprimiert. Diese Expression ist zwar geringer als im Sinusknoten, aber höher als in den Ventrikeln (Shi et al., 1999).

2.2.4 Natriumkanäle im Reizleitungssystem

Zum Na^+ -Strom (I_{Na}) in der Erregungsleitung tragen die spannungsabhängige Natriumkanäle bei. Es sind $\text{Na}_v1.5$, von dem bis vor kurzem noch geglaubt wurde, er sei die einzige Isoform, die zum kardialen Natriumstrom beiträgt, sowie die TTX (Tetrodotoxin)-sensitiven neuronalen und Skelettmuskel-spezifischen Natriumkanalisformen TNa_v 1.1-1.4, 1.6, 1.7 (Haufe et al., 2007). Diese TTX-sensitiven Natriumkanäle beteiligen sich nicht nur an der ventrikulären Funktion sondern sind auch dominant in einigen Bereichen des Reizleitungssystems. Spannungsabhängige Natriumkanäle bestehen aus einer Poren-bildenden α -Untereinheit und einer akzessorischen β -Untereinheit (Catterall, 2000; Isom, 2001; Maier et al., 2004).

Die α -Untereinheit $\text{Na}_v1.5$ des spannungsabhängigen Natriumkanals wird von *SCN5a* kodiert und in den peripheren Zellen des Sinusknoten sowie im Übergangsbereich von Sinusknoten

zum Atrium und im Atrium exprimiert (Lei et al., 2004; Maier et al., 2003; Tellez et al., 2006). Homozygote *SCN5a*-Mäuse sind embryonal letal. Heterozygote Mäuse sind lebensfähig, zeigen aber Defekte, die auf eine veränderte Natriumkanalfunktion zurückzuführen sind. Dies beinhaltet eine beeinträchtigte atrioventrikuläre sowie eine verzögerte intramyokardiale Reizleitung und eine ventrikuläre Tachykardie (Papadatos et al., 2002). Des Weiteren wurde gezeigt, dass es bei diesen Mäusen zu gelegentlichen sino-atrialen Blockaden, Sinusbradykardien und langsamer Reizleitung kommt. Das Protein ist in der Peripherie des Sinusknotens lokalisiert (Lei et al., 2005).

Die Immunhistochemie zeigt, dass die Natriumkanäle $Na_v1.1$, 1.3 und 1.6 verstärkt im Sinusknoten der Maus vorhanden sind (Maier et al., 2003). In der Ratte ist gezeigt, dass $Na_v1.1$ und $Na_v1.5$ in der Peripherie des AV-Knotens und $Na_v1.3$ im gesamten AV-Knoten in den Neuronen lokalisiert ist (Yoo et al., 2006). Außerdem ist gezeigt, dass $Na_v1.1$ und 1.2 verstärkt in den His-Bündeln exprimiert sind als im umgebenden Gewebe (Haufe et al., 2005).

2.2.5 TREK1

TREK1 (von TWIK- Related K^+ -Kanal) gehört wie TASK1 (siehe 2.2.1) zu der Familie der Zwei-Poren-Domänen-Kaliumkanäle (K_{2P} -Kanäle). Diese Hintergrundkaliumkanäle sind K^+ -selektive Ionenporen mit 4 Transmembran- sowie 2 Porendomänen und einen kurzen N- und einen langen C-Terminus, die beide zytoplasmatisch liegen. Zwei Untereinheiten formen einen funktionellen Kanal. Dieser ist spannungsunabhängig und weist eine Aktivität bei jedem Membranpotential auf. Die K_{2P} -Kanäle sind für die Hintergrundströme verantwortlich und scheinen wichtig für die Aufrechterhaltung des Ruhepotentials zu sein (Lesage and Lazdunski, 2000). Diese Aktivität der K_{2P} -Kanäle im Ruhezustand bringt das Membranpotential näher zum K^+ -Gleichgewichtspotential und reduziert daher die Erregbarkeit der Zelle.

TREK1 wird stark in vielen Teilen des Gehirns und im Rückenmark sowie in den dorsalen Wurzelganglien exprimiert und ist mit den GABAergen Interneuronen kolokalisiert (Hervieu et al., 2001; Medhurst et al., 2001). Aber auch in anderen Geweben wie dem Herzen, den Skelettmuskeln, der Lunge, der Niere und dem Gastrointestinaltrakt konnte *TREK1* detektiert werden (Fink et al., 1996; Medhurst et al., 2001; Talley et al., 2001). Real-time RT-PCR-Daten von Glattmuskelzellen verschiedener Regionen des Gastrointestinaltrakts sowie von Blutgefäßen demonstrierten eine dortige Expression von *TREK1* (Koh et al., 2001). Weiterhin konnte die Expression von *TREK1* in der Ratte mittels Real-time PCR im Herzen mit einer

2. Einleitung

Dominanz im rechten Ventrikel detektiert werden. Die Expressionsstärke ist im adulten höher als im embryonalen Herzen (Liu and Saint, 2004). Ähnliche Expressionsergebnisse sind von Terrenoire et al. mittels RT-PCR im adulten Rattenherz gezeigt worden (Terrenoire et al., 2001). Zusätzlich konnten sie das Protein in atrialen und ventrikulären Mikrosomen mittels Western Blot detektieren und in atrialen Kardiomyozyten lokalisieren. Eine Lokalisation von TREK1 in ventrikulären Myozyten konnte auch dargestellt werden (Li and Wang, 2006; Xian Tao et al., 2006).

TREK1 kann durch verschiedene physikalische Stimuli aktiviert werden. Es sind die mechanische Stimulation (Streckung) (Li and Wang, 2006; Maingret et al., 1999; Patel et al., 1998), der intrazelluläre pH-Wert (Maingret et al., 1999), erhöhte Temperaturen (Maingret et al., 2000) und die Spannung (Maingret et al., 2002). Weiterhin aktivieren chemische Stimuli wie z.B. die Anästhetika Chloroform, Halothan, Diethylether und Isofluran und mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Arachidonsäure, Docosahexaenoat und Oleat (Patel et al., 1999; Patel et al., 1998) den Kanal. Eine Inhibierung von TREK1 erfolgt durch den cAMP/PKA- sowie über den Diacylglycerol/PKC-Signalweg (Fink et al., 1996). Außerdem wird TREK1 durch Stickstoffmonoxid und cGMP/PKG aktiviert (Koh et al., 2001).

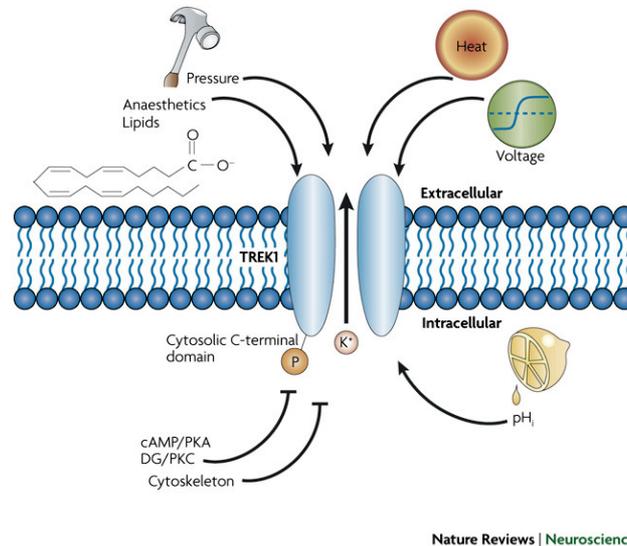


Abb. 2-4: Die Aktivierung und Inaktivierung von TREK1

TREK1 wird durch Dehnung, Hitze, Erhöhung des intrazellulären pH-Werts, Depolarisation, Lipide und flüchtige Anästhetika geöffnet und durch den PKA- und PKC-Phosphorylierungssignalweg durch Phosphorylierung am C-Terminus geschlossen. TREK1 wird tonisch durch das Zytoskelett inhibiert nach (Honoré, 2007).

TREK1-defiziente Mäuse sind gesund, fertil und zeigen keine augenfälligen morphologischen Veränderungen. Auch die Morphologie des Gehirns erscheint normal. Diese Mäuse weisen aber eine erhöhte Sensitivität gegenüber Ischämie im Gehirn und im Rückenmark sowie

Epilepsie auf. Des Weiteren sind sie resistent gegenüber flüchtigen Anästhetika, u. a. auch solche, die bei klinischen Zwecken verabreicht werden. Eine Neuroprotektion durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die bei Wildtypmäusen stark ausgeprägt ist, wird bei TREK1^{-/-}-Mäusen nicht festgestellt. Eine Autopsie von TREK1^{-/-}-Mäusen zeigt keine schweren Veränderungen in Herz, Lunge und großen Gefäßen (Heurteaux et al., 2004).

2.2.6 Connexine im Reizleitungssystem

Gap Junctions werden für die elektrische Kopplung von Myozyten benötigt. Sie bestehen aus zwei Halbkanälen, den Connexonen, welche wiederum aus 6 Untereinheiten, den Connexinen bestehen. Sind die beiden Connexone aus identischen Connexinen aufgebaut, werden sie als homotypische Kanäle bezeichnet. Wenn sie aus verschiedenen Connexinen aufgebaut sind, werden sie heterotypische Kanäle genannt. Folgende Connexine werden im Herzen exprimiert: *Cx43*, *Cx40*, *Cx45* und *Cx30.2*. Diese vier Connexine haben verschiedene Erregungsleitungseigenschaften. *Cx43* wird im Arbeitsmyokard von Atrium und Ventrikel exprimiert (Coppen et al., 1998; Davis et al., 1995b). Die Deletion von *Cx43* resultiert in einem postnatalen Tod, aufgrund einer Missbildung des rechtsventrikulären Ausflusstraktes (Reaume et al., 1995).

Cx40 besitzt die größte Erregungsleitung und ist im Atrium, in den Bündelverzweigungen und im His-Purkinje-System exprimiert (Delorme et al., 1995; Gros and Jongma, 1996). Es wurde aber auch gezeigt, dass *Cx40* im Sinusknoten des Kaninchens (Coppen et al., 1999a) und des Menschen (Davis et al., 1995a) exprimiert wird. *Cx40*-defiziente Mäuse zeigen eine verlangsamte Erregungsleitung im AV-Knoten und den Atrien sowie eine beeinträchtigte Erregung in den Bündelverzweigungen (Hagendorff et al., 1999; Kirchhoff et al., 1998; van Rijen et al., 2001).

Cx45 ist im primären Myokard des Herzschauches sowie später im adulten Herzen im SA- und AV-Knoten exprimiert (Alcolea et al., 1999; Coppen et al., 1999b; Kumai et al., 2000). *Cx45* Knock-out-Mäuse zeigen einen Erregungsleitungsblock und sterben auf Grund eines Endokardkissendefektes und beeinträchtigter Vaskularisierung (Krüger et al., 2000; Kumai et al., 2000; Nishii et al., 2003).

Cx30.2 wird im Reizleitungsgewebe, hauptsächlich im Sinus- und im AV-Knoten sowie im His-Bündel exprimiert (Kreuzberg et al., 2005). Es bildet Gap Junctions mit einer langsamen Erregungsleitung und ist vermutlich für die Verzögerung der atrioventrikulären Impulsüberleitung verantwortlich. *Cx30.2*-defiziente Mäuse zeigen keine augenfälligen Herzabnormalitäten, sie weisen aber eine Änderung der Erregungsleitung im kardialen

Reizleitungssystems auf. Es kommt zu einer beschleunigten Erregungsleitung im AV-Knoten (Kreuzberg et al., 2006).

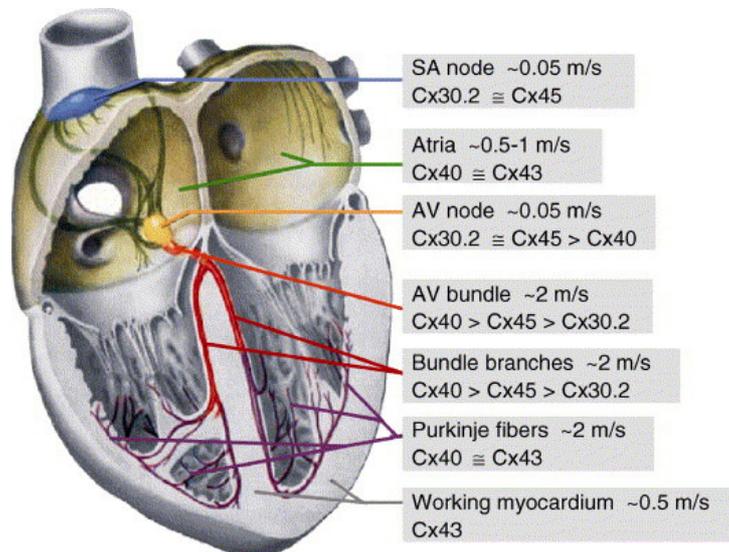


Abb. 2-5: Das Connexinexpressionsmuster im Herzen

Connexine haben im Herzen regionsspezifische Expressionsstärken. Durch die Kombination verschiedener Connexine und deren Expressionshöhe kommt es zu divergierenden Reizleitungsgeschwindigkeiten im Reizleitungssystem. Im Sinusknoten ist die Zell-Zell-Kopplung durch Cx30.2 und Cx40 vermittelt, welche eine geringe Konduktivität aufweisen. Im Gegensatz dazu exprimiert das Arbeitsmyokard der Atrien und Ventrikel die Connexine Cx40 und Cx43 bzw. nur Cx43, welche eine hohe Konduktivität aufweisen und so zu einer effizienten mechanischen Kontraktion der Atrien und Ventrikel führt. Im AV-Knoten werden Cx30.2, Cx45 und Cx40 exprimiert, wobei Cx40 schwächer exprimiert ist als die anderen beiden Connexine. In den Bündelverzweigungen sowie in den Purkinje-Fasern werden hauptsächlich Cx40 und Cx43 exprimiert, welche eine schnelle Reizleitung gewährleisten nach (Kreuzberg et al., 2006).

2.3 Die Schrittmacherfunktion des Sinusknotens

Wie oben schon erwähnt ist der Sinusknoten der Schrittmacher des Herzens (siehe 2.1.2). Die Schrittmacherzellen des Herzens generieren spontane rhythmische Veränderungen ihres Membranpotentials, so dass periodisch spontane Aktionspotentiale ausgelöst werden und das Herz rhythmisch schlägt. Dies wird beherrscht durch die enge Integration zweier sogenannter Uhren, der intrazellulären „Ca²⁺-Uhr“ und der „Membranuhr“. In Schrittmacherzellen ist die Ca²⁺-Uhr durch spontane, rhythmische, submembranäre Ca²⁺-Freisetzung vom Sarkoplasmatischen Retikulum manifestiert und durch eine PKA-abhängige Phosphorylierung kontrolliert. Diese Ca²⁺-Freisetzung aktiviert rhythmisch den nach innen gerichteten NCX-Strom, welcher in Sinusknotenzellen (anders als in Arbeitsmyokardzellen in denen der Na⁺-Kanal *SCN5A* diese Aufgabe übernimmt) das Aktionspotential auslöst. Die Form und die

2. Einleitung

Ionenflüsse des Aktionspotentials werden von der Membranuhr abgestimmt, welche wiederum die Arbeitsweise der Ca^{2+} -Uhr aufrechterhält (Maltsev et al., 2006).

Schrittmacherzellen im Herzen besitzen Uhren mit der kürzesten rhythmischen Periode, so dass sie andere erregbare Zellen triggern können. Die Sinusknotenschrittmacherzellen sind die dominanten Schrittmacherzellen. Sie weisen kürzere Perioden zwischen den spontanen Aktionspotentialen auf als AV-Knoten- und His-Purkinjezellen. So initiieren sie den kardialen Impuls durch die Generierung spontaner Aktionspotentiale, die zu den Ventrikeln geleitet werden und dort in den Zellen Aktionspotentiale auslösen (Maltsev et al., 2006).

Die Aktionspotentiale in Schrittmacherzellen weisen ein anderes Profil auf, da sie kein stabiles Ruhepotential besitzen und der Aktionspotentialaufstrich der Schrittmacherzellen hauptsächlich durch L-Typ Ca^{2+} -Kanäle gestaltet wird. Diese besitzen eine relative geringe Aktivierungsschwelle von ca. -50mV . Das Ca^{2+} -Aufstrichsystem ist langsamer als das Na^+ -Aufstrichsystem, so dass die Aufstrichphase langsamer und flacher ist als beim Arbeitsmyokard (Huppelsberg and Walter, 2005).

Die Depolarisation bewirkt die Aktivierung von nach außen gerichteten K^+ -Strömen, die die Membran zu ihrem niedrigsten Level im Aktionspotentialzyklus, dem maximalen diastolischen Potential (MDP), auf ca. -65mV repolarisieren. Nachdem das MDP erreicht wurde, nimmt die Konduktivität des verzögerten K^+ -Strom ab, da die K^+ -Kanäle nach ihrer Aktivierung während des Aktionspotentials wieder inaktivieren. Dies führt zu einer Nachpolarisation bzw. zu einer Hyperpolarisation. Die Repolarisation in der späteren Phase des Aktionspotentials aktiviert auch den hyperpolarisationsaktivierten „funny“-Strom (I_f) (Maltsev and Lakatta, 2008), der ein weiteres Aktionspotential auslöst.

In Sinusknotenzellen kontrolliert die hohe basale cAMP-Konzentration vermittelt über die PKA-abhängige Phosphorylierung die interne Ca^{2+} -Periodik, d.h. das Pumpen von Ca^{2+} in das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) über SERCA (die SR Ca^{2+} -ATPase) und die lokale Ca^{2+} -Freisetzung via Ryanodin-Rezeptoren (RyR), aber auch den Ca^{2+} -Influx über den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal. Weiterhin beeinflusst cAMP bzw. die cAMP-vermittelte, PKA-abhängige Phosphorylierung von Ionenkanälen die Charakteristika der Aktionspotentiale, so dass diese entsprechend mit einer gegebenen rhythmischen Auslösungsrate abgefeuert werden, welche von der rhythmischen Ca^{2+} -Uhr kommandiert wird (siehe Abb. 2-6) (Bers, 2001; Maltsev et al., 2006; Maltsev and Lakatta, 2008).

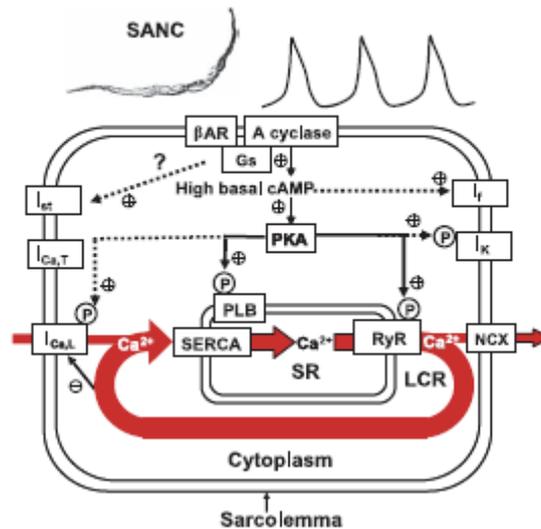


Abb. 2-6: Ca²⁺-Kontrolle im Arbeitszyklus von Sinusknotenzellen (Maltsev and Lakatta, 2008)

Eine Sinusknotenzelle sowie Aktionspotentiale von Sinusknotenzellen sind zusammen mit dem Arbeitszyklus der Sinusknotenzellen dargestellt. Die dicke rote Linie stellt den Ca²⁺-Zyklus dar, während die cAMP bzw. die cAMP-vermittelte PKA-abhängige Phosphorylierung von Ionenkanälen durch gestrichelter schwarzer bzw. durchgehender schwarzer Linie angedeutet werden

2.4 T-Tubuli und die Kopplung von Erregung und Kontraktion

2.4.1 Die Kopplung von Erregung und Kontraktion

Die kardiale Erregungs-Kontraktions-Kopplung bezeichnet den Prozess von der elektrischen Erregung der Myozyte bis zur Kontraktion des Herzens. Daran ist der sekundäre Botenstoff Ca²⁺ beteiligt, der wichtig für die kardiale elektrische Aktivität und ein direkter Aktivator der Myofilamente ist, welche die Kontraktion der Myozyten bzw. des Herzmuskels verursachen.

Während des elektrischen Impulses gelangt Ca²⁺ durch depolarisationsaktivierte Ca²⁺-Kanäle (LTCCs: L-Typ Ca²⁺-Kanäle) in die Zelle und veranlasst dort eine Ca²⁺-Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über den Ryanodinrezeptor (RyR). Diese Kombination aus Ca²⁺-Influx und Freisetzung erhöht die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration, so dass Ca²⁺ an das Myofilamentprotein Troponin C bindet, welches die Kontraktion veranlasst. Für die Relaxation muss die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration wieder verringert werden, so dass das Ca²⁺ wieder von Troponin C dissoziieren kann. Dazu muss Ca²⁺ wieder aus dem Zytosol der Zelle transportiert werden. An diesem Prozess beteiligt sind verschiedene Ca²⁺-Transportsysteme wie SERCA (die SR Ca²⁺-ATPase), NCX (der Na⁺/Ca²⁺-Austauscher), die Ca²⁺-ATPase und der mitochondriale Ca²⁺-Uniport (Bers, 2002). Viele dieser Schlüsselproteine, die an der kardialen Erregungs-Kontraktions-Kopplung beteiligt sind, sind in den transversen Tubuli (T-Tubuli), dem Sarkoplasmatischen Retikulum und dem

2. Einleitung

Sarkolemma lokalisiert. Wichtig hierbei ist die lokale Aufteilung der Signalprozesse in (Mikro-) Domänen.

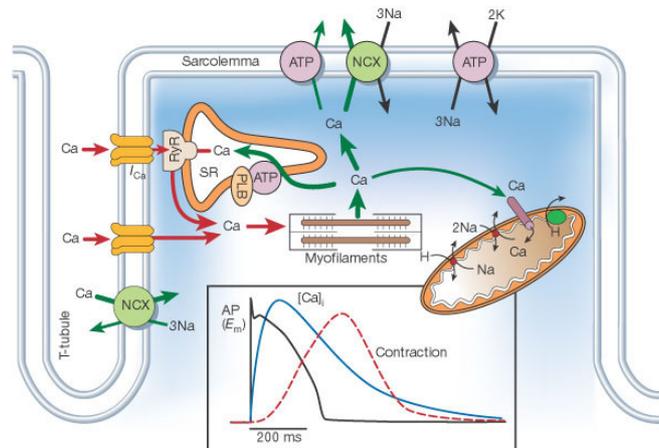


Abb. 2-7: Der Ca²⁺-Transport in ventrikulären Myozyten (Bers, 2002)

Der Einschub zeigt den Zeitverlauf eines Aktionspotentials, die Ca²⁺-Schwankung und die Kontraktion gemessen im Kaninchen.

Ca²⁺ gelangt durch depolarisationsaktivierte Ca²⁺-Kanäle in die Zelle und veranlasst dort eine Ca²⁺-Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über den Ryanidonrezeptor (RyR). Ca²⁺ bindet an die Myofilamente und veranlasst so die Muskelkontraktion. Ca²⁺ wird mittels der SR Ca²⁺-ATPase, der Ca²⁺-ATPase, NCX und des mitochondrialen Ca²⁺-Uniports wieder aus der Zelle transportiert, so dass der Muskel wieder relaxieren kann.

2.4.2 Struktur und Funktion der kardialen T-Tubuli.

T-Tubuli (transverse Tubuli) im kardialen Gewebe kommen hauptsächlich in den ventrikulären Myozyten vor und fehlen in den Zellen des Reizleitungssystems und in den meisten atrialen Myozyten (Ayetty and Navaratnam, 1978; Cordeiro et al., 2001). Sie kommen bei Säugetieren wie Mensch (Wong et al., 2002), Nager (Forbes and van Neil, 1988; Haddock et al., 1999; He et al., 2001; Soeller and Cannell, 1999) und Schweinen (Heinzel et al., 2002) aber nicht bei Vögeln, Amphibien und Reptilien (Bossen and Sommer, 1984; Bossen et al., 1978) vor. T-Tubuli sind Invaginationen der Oberflächenmembran, die in ca. 1,8µm Intervallen an den Z-Linien auftreten, aber zugleich in den Zellen verzweigen, so dass ein Netzwerk aus transversen und longitudinalen Elementen entsteht. Der Durchmesser der kardialen T-Tubuli beträgt 100 bis 300 nm (Brette and Orchard, 2007). Diese Anordnung bewirkt eine synchrone Ca²⁺-Freisetzung in der Zelle. Die T-Tubuli gehen in den so genannten Dyaden eine enge räumliche Nähe mit dem Sarkoplasmatischen Retikulum ein. Hier erfolgt die Ca²⁺-Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum über den Ryanidonrezeptor.

Die Hauptaufgaben der T-Tubuli ist die oben schon erwähnte Vergrößerung des Oberflächen/Volumen-Verhältnisses durch die Ausbildung eines Netzwerkes, was den

Kontakt zwischen dem Zellinnern und der interstitiellen Flüssigkeit vervielfältigt. Dies erleichtert den zellulären Austausch von Ionen und Metaboliten. Zudem bringt es den elektrischen Impuls schnell ins Zellinnere, um die Aktivierung in der Myozyte zu synchronisieren (Cheng et al., 1994; Nelson and Benson, 1963). Des Weiteren wurde vor kurzem vorgeschlagen, dass Caveolae mit dem T-Tubuli-System assoziieren und somit Bereiche makromolekularer Signalkomplexe bilden (Balijepalli et al., 2006). Caveolae sind Invaginationen des Plasmalemmas und werden mit einer Vielzahl von Funktionen wie Exocytose, Wassertransport, Cholesterinhomeostase und Signaltransduktionen in Verbindung gebracht (Razani et al., 2002). In kardialen Myozyten befinden sich die Caveolae sowohl in der Plasmamembran als auch in den T-Tubuli (Hagiwara et al., 2002).

2.4.3 Ca^{2+} -und Na^{+} -Kanäle in den T-Tubuli

Der L-Typ Ca^{2+} -Kanal (LTCC), der auch DHPRs (Dihydropyridin Rezeptor) genannt wird, zeigt eine dominante Lokalisation in den T-Tubuli in der Region der Dyade (Scriven et al., 2000) und auch eine Lokalisation im Sarkolemma (Takagishi et al., 2000). Vor kurzem wurde gezeigt, dass die $\text{Ca}_v1.2$ -Untereinheit des Rezeptors zum Teil mit Caveolae verbunden ist und diese wiederum mit dem T-Tubuli-System assoziieren (Balijepalli et al., 2006). Eine Regulation der $\text{Ca}_v1.2$ -Kanäle erfolgt z.B. durch die Aktivierung β -adrenerger Rezeptoren und der damit einhergehenden Phosphorylierung des $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals bzw. der assoziierten Proteine durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA). Diese bildet zusammen mit AKAP15 (A-kinase-anchoring protein) einen Komplex, der mit $\text{Ca}_v1.2$ kolokalisiert ist. Die direkte Interaktion von $\text{Ca}_v1.2$ mit dem AKAP15-PKA-Komplex gewährleistet eine schnelle und effiziente Regulation des Kanals als Antwort auf β -adrenerge Stimulation und lokalen Anstieg der cAMP-Konzentration (Hulme et al., 2003).

Der $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) befindet sich in den T-Tubuli und dem Sarkolemma. Anders als DHPR ist dieser Ionenkanal nicht in den Dyaden lokalisiert, sondern wird von diesen ausgeschlossen. NCX1 bildet zusammen mit der $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase und dem InsP_3 -Rezeptor einen auf Ankyrin B-basierenden Komplex in einer weiteren Mikrodomäne der T-Tubuli (Mohler et al., 2005). NCX1 findet sich in den transversalen und axialen Elementen der T-Tubuli. Auch der spannungsabhängige Na^{+} -Kanal ist dort lokalisiert aber nicht mit NCX1 kolokalisiert (Scriven et al., 2000). Weiterhin sind beide Kanäle im Sarkolemma lokalisiert (Cohen and Levitt, 1993; Frank et al., 1992; Kieval et al., 1992). Die verschiedenen Isoformen des Na^{+} -Kanals scheinen unterschiedlich lokalisiert zu sein. So wird $\text{Na}_v1.5$

hauptsächlich in den Glanzstreifen gefunden, während die $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.3$ und $\text{Na}_v1.6$ überwiegend in den T-Tubuli lokalisiert sind (Maier et al., 2002).

2.4.4 K^+ -Kanäle in den T-Tubuli

Die K^+ -Kanäle $\text{K}_v4.2$, der dem transienten nach außen gerichteten Strom I_{to} unterliegt (Takeuchi et al., 2000), TASK1 (siehe auch 2.2.5.) (Jones et al., 2002) sowie $\text{K}_{ir}2.1$, der für den nach innen gerichteten Strom verantwortlich ist (Clark et al., 2001), werden vorwiegend in den T-Tubuli der ventrikulären Myozyten lokalisiert.

2.4.5 Anionenaustauscherproteine in den T-Tubuli

Neben dem Na^+/H^+ -Austauscher wurde das andere pH-regulierende Protein der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher in den T-Tubuli gefunden (Pucéat et al., 1995).

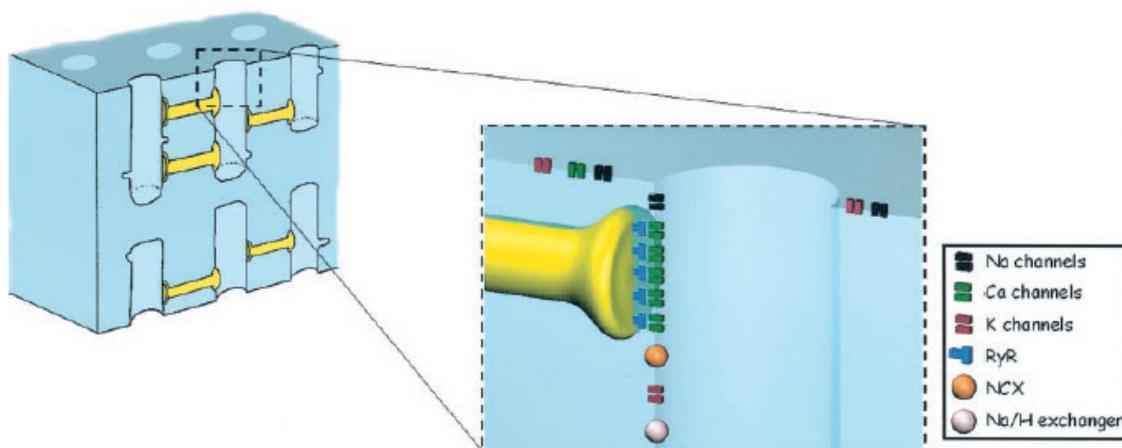


Abb. 2-8: Verteilung von Ionenkanälen zwischen T-Tubuli und Sarkolemma (Brette and Orchard, 2003)

In den T-Tubuli, im Sarkolemma und im Sarkoplasmatischen Retikulum (gelbe Struktur) liegen verschiedene Ionenkanäle in unterschiedlicher Konzentration vor. So befinden sich in den Dyaden, die Orte der räumlichen Nähe von Sarkoplasmatischem Retikulum und T-Tubuli, in hoher Konzentration die Ca^{2+} -Kanäle in den T-Tubuli und denen gegenüber im Sarkoplasmatischen Retikulum gelegene Ryanidon-Rezeptoren. NCX sowie die Na^+ -Kanäle sind in anliegenden Domänen der Dyaden gelegen und auch zum Teil im Sarkolemma.

2.4.6 Entwicklung der T-Tubuli in kardialen Myozyten.

Ein Netzwerk von T-Tubuli fehlt in embryonalen und neonatalen kardialen Myozyten (Haddock et al., 1999; Smolich, 1995). Erst in den ersten Wochen nach der Geburt entwickelt es sich. Diese Entwicklungszeit ist speziesspezifisch (Brette and Orchard, 2003). Die Entwicklung des T-Tubuli-Netzwerks in Mäusen ist nach 10 bis 14 Tagen abgeschlossen. Mit diesem Alter ist ihre Ultrastruktur identisch zu der von adulten Mäusen (Forbes et al., 1984).

Die initiale Entwicklung der T-Tubuli findet an Zellecken parallel zur Proliferation von Caveolae und deren Bildung zu multiplen caveolären Komplexen, mit denen die T-Tubuli verbunden sind, statt (Ezerman and Ishikawa, 1967). Dies scheint ein wichtiger Schritt im Invaginationsprozess der T-Tubuli zu sein. Dabei spielt Caveolin3 eine essentielle Rolle (Parton et al., 1997).

Während der ersten zwei Wochen der postnatalen Entwicklung verlagern sich die Dyaden zunehmend ins Innere der Myozyten. Es wurde vorgeschlagen, dass die T-Tubuli sich durch Invaginationen der Plasmamembran bilden, welche mit Hilfe von Membranlipiden und spezifischen Proteinen nach innen penetrieren (Di Maio et al., 2007). Dies geschieht in dem sogenannten Hybridmodell auf duale Weise: durch den unabhängigen Fluss von SR- und T-Tubuli-Proteinen in zwei separaten Membranen oder durch Fusion von vorgeformten Tandemvesikeln aus zuvor Ryanidonrezeptoren- bzw. DHPR-Vesikeln.

2.5 Zyklische Nukleotide

2.5.1 Zyklische Nukleotide und deren Bindungsproteine

Die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP sind Schlüsselmoleküle, die zelluläre Antworten auf Hormone und viele andere Stimuli vermitteln. Zu den Rezeptoren dieser zyklischen Nukleotide gehören bei den Eukaryoten Proteinkinase A (PKA), welche von cAMP aktiviert wird, Proteinkinase G, die von cGMP aktiviert wird, die von cAMP aktivierten Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren EPAC1 und 2, sowie die durch zyklische Nukleotide regulierten Ionenkanäle, wie der oben erwähnte HCN4-Kanal (siehe 2.2.3) und der CNG-Kanal. All diesen Proteinen gemein ist die zyklische Nukleotidbindungsdomäne (CNB domain: cyclic nucleotide binding domain), welche cAMP bzw. cGMP bindet und die Aktivität der Proteine moduliert (Rehmann et al., 2007). Solche CNB-Domänen kommen auch bei Prokaryoten vor. Die erste charakterisierte Familie dort ist die CAP- (catabolite gene activator protein) Familie von transkriptionalen Regulatoren (Weber et al., 1982), die ein DNA-helix-turn-helix-Bindungsmotiv tragen, welches kovalent an die CNB-Domäne knüpft (McKay and Steitz, 1981). Weitere CNB-Domäne-haltigen prokaryotischen Proteine sind die CPR-Proteine, die auch eine kovalent an die CNB-Domäne gebundene DNA-Bindungsdomäne enthalten sowie eine distinkte Klasse von DNA-Bindungsproteinen wie z.B. NnR und ArcR, die durch Zweitbotenstoffe wie Stickstoffmonoxyd, Sauerstoff und Häm aktiviert werden (Korner et al., 2003). In einer globalen Analyse von CNB-Domänen-enthaltenen Sequenzen in öffentlichen und globalen Ozeanprobendaten wurden zusätzliche neue prokaryotische CNB-Domäne enthaltende Proteine identifiziert. Diese enthalten eine CNB-Domäne, ihnen fehlt aber eine

DNA-Bindungsdomäne. Dafür weisen sie aber zum Teil andere Domänen wie eine Histidinkinase-, eine CBS (cystathione beta synthase)- oder AAA-ATPase-Domäne auf. Insgesamt wurden in dieser Analyse 7696 CNB-Domänen enthaltene Sequenzen gefunden, die in 30 verschiedene Familien mit prokaryotischen und eukaryotischen Hintergrund klassifiziert werden konnten (Kannan et al., 2007)

2.5.2 Der Aufbau der Bindungsdomäne

Die ca. 120 Aminosäuren lange zyklische Nukleotidbindungsdomäne besteht aus einem β -Sandwich, welches aus 8 β -Faltblättern besteht, und flankierenden α -Helices. Innerhalb der β -Faltblattdomäne liegt die sogenannte Phosphatbindungskassette (PBC: phosphate binding cassette), die mit dem Zuckerrest des zyklische Nukleotids interagiert und dieses vor Abbau durch Phosphodiesterasen schützt (Diller et al., 2001). Die PBC beinhaltet die β -Faltblätter 6 und 7, die durch eine kurze α -Helix separiert sind, und ist der Fingerabdruck der CNB-Domäne. Auf der einen Seite definiert sie ein gemeinsames Element der CNB-Domäne, sie zeigt aber auch Variationen zwischen den verschiedenen Gruppen der zyklischen Nukleotid-regulierten Proteinen: So ist die Sequenz in PKA FGE[L,I,V]AL[L,I,M,V]X₃[P,V]R[A,N,Q,V]A (Canaves and Taylor, 2002), während die CNB-Domäne von PKG und den zyklischen Nukleotid-regulierten Ionenkanälen, die präferentiell cGMP binden, durch eine PBC charakterisiert, die mit PR[S,T]A endet und nicht mit PRAA (Shabb and Corbin, 1992; Weber et al., 1989). Bei Epac divergiert die Consensussequenz zu FG[Q,K]LALX₄PRAA. Hier ist das Glutamat nicht konserviert (Enserink et al., 2002; Rehmann et al., 2003b). Neben diesen kanonischen PBCs konnten aber auch nicht-kanonische PBCs identifiziert werden, wie z.B. in den eukaryotischen PDZ-GEF- und HCN-Proteinen und den prokaryotischen Transkriptionsregulatoren FixK, FnR, ArcR, NnR und ARSR (Kannan et al., 2007).

Die C-terminale α -Helix dient als Scharnier. Sie ist in allen CNB-Domänen konserviert, variiert aber in der Länge (Rehmann et al., 2003a). Hinter der Scharnierregion schließt sich der Deckel an, der große Variabilität zwischen den individuellen CNB-Domänen zeigt aber eine konservierte Funktion aufweist, die durch die Interaktion mit der Base des gebundenen Nukleotids charakterisiert ist. Dadurch ist das zyklische Nukleotid stabilisiert. Der Deckel ist weder in der Sequenz noch in der Struktur konserviert. Die N-terminalen α -Helices werden als N-terminales helikales Bündel zusammengefasst und dienen als Schnittstelle zwischen CNB-Domäne und der katalytischen Region des Proteins (Berman et al., 2005; Rehmann et al., 2007).

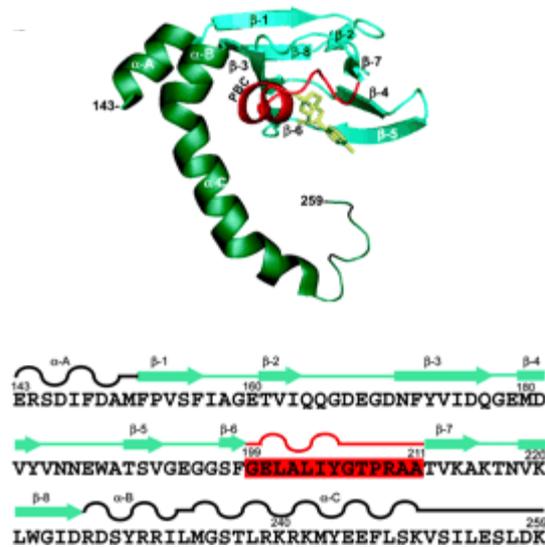


Abb. 2-9: Die CNB der RI α (A)-Untereinheit der PKA aus (Berman et al., 2005)

Dargestellt ist die Tertiär- sowie Sekundärstruktur der CNB-Domäne der RI α (A)-Untereinheit der PKA. Die flankierenden α -Helices (grün) umfassen die 8 β -Faltblätter (türkis), welche zu einem β -Sandwich angeordnet sind und die PBC (rot) enthält.

2.6 Die *Popeye domain containing*-Genfamilie

2.6.1 Die Isolierung der *Popeye domain containing*-Genfamilie

Das erste Mitglied der *Popeye domain containing*-Genfamilie - Huhn *Popeye domain containing* (*Popdc*) 1 bzw. *Bves* (blood/vessel epicardial substance) - wurde mittels einer PCR-basierten subtraktiven Hybridisierung zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene im Herzen unabhängig von zwei Arbeitsgruppen isoliert (Andrée et al., 2000; Reese et al., 1999). Bei *Popdc1* und *Bves* handelt es sich um das gleiche Gen, so dass im nachfolgenden Text nur noch mit der Bezeichnung *Popdc1* gearbeitet wird. Nachfolgend wurden weitere Orthologe in Mensch und Maus (Andrée et al., 2000), in *Xenopus* (Hitz et al., 2002; Ripley et al., 2006) und Zebrafisch (Ripley et al., 2004) sowie in niederen Chordaten wie in *Branchiostoma*, *Ciona intestinalis* und *Boltenia vilosa* (Davidson and Levine, 2003) identifiziert. Auch in Invertebraten wie *Drosophila*, Bienen und Moskitos wurden *Popdc*-Gene identifiziert (Lin et al., 2002). Während in Invertebraten nur ein Gen existiert, wobei die Biene eine Ausnahme mit 2 Genen ist, besitzen niedere Chordaten zwei *Popdc*-Gene – *Popdc1* und *Popdc3*. Diese liegen zusammen auf einem Chromosom. In Vertebraten existieren drei *Popdc*-Gene – *Popdc1*, *Popdc2* und *Popdc3*. Auch hier befindet sich *Popdc1* mit *Popdc3* als Tandem organisiert auf demselben Chromosom (Chromosom 6q21 im Menschen, Chromosom 10 in der Maus und Chromosom 3 im Hühnchen). Die proximale Nähe von *Popdc1* zu *Popdc3* lässt vermuten, dass diese beiden Gene während der Evolution

durch Duplikation entstanden sind. *Popdc2* liegt beim Menschen auf Chromosom 3, bei der Maus auf Chromosom 16 und im Hühnchen auf Chromosom 1.

2.6.2 Die Expressionsdomänen der *Popdc*-Genfamilie

Das Expressionsmuster der *Popdc*-Genfamilie ist stark konserviert. *In situ* Hybridisierungen von Maus- und Hühnerembryonen zeigten eine präferentielle Expression der *Popdc*-Gene im Herzen und im Myotom (Andrée et al., 2000; Breher et al., 2004). Diese Expressionsdomänen werden durch die LacZ-Expression der *Popdc1-LacZ*-Maus bestätigt. Zudem wird *Popdc1-LacZ* in den Glattmuskelzellen diverser Organe aber nicht im Endo- oder Epikard exprimiert (Andrée et al., 2002). Die *Popdc2-LacZ*-Expression zeigt überlappende Expressionsdomänen mit *Popdc1-LacZ* in den Herz- und Skelettmuskeln sowie in den Glattmuskelzellen des Verdauungskanals aber auch abweichende Expressionsdomänen. So ist *Popdc2-LacZ* nicht wie *Popdc1-LacZ* im Gehirn exprimiert (Froese and Brand, 2008). Im Herzen zeigte sich, dass die *Popdc2-LacZ*-Expression im Reizleitungsgewebe erhöht ist (Froese et al., eingereicht).

Die präferentielle Expression der *Popdc*-Gene im Herz- und im Skelettmuskelgewebe ist auch in *Xenopus*, der adulten Maus und des adulten Menschen sowie in der Ratte gezeigt (Andrée et al., 2000; Hitz et al., 2002; Parnes et al., 2007). Weitere *Popdc1*-Transkripte werden im Magen, im Darm, im Gehirn, in der Niere, in der Lunge und in der Milz des Huhns detektiert (Andrée et al., 2000). Außerdem werden in „expressed sequence tag“ (EST) und „serial analysis of gene expression“ (SAGE) Datenbankenanalysen weitere Expressionsdomänen gefunden wie z.B. im embryonalen Pankreas und in Melanozyten (Brand, 2005).

Zusätzlich zu den oben genannten Expressionsdomänen von *Popdc1* wird eine Expression von *Popdc1* in diversen epithelialen Zelltypen detektiert (Lin et al., 2007; Osler et al., 2005; Ripley et al., 2004; Ripley et al., 2006; Wada et al., 2001). Kontroverse Meinungen gibt es zu der Expression von *Popdc*-Genen im Epikard. Während Reese et al., 1999 eine Expression von *Popdc1* mit einem Antikörper im proepikardialen Organ, im Epikard sowie in Glattmuskelzellen der Koronararterien des Hühnerembryos detektieren, wird mit einem anderen Antikörper eine Expression von *Popdc1* nur in den Myozyten der Kompaktschicht festgestellt. Dieser Antikörper zeigt eine Expression von *Popdc1* ausschließlich in kardialen Zellen sowie Skelettmuskelzellen und nicht im Epikard oder den Koronararterien (DiAngelo et al., 2001; Torlopp et al., 2006; Vasavada et al., 2004). Außerdem zeigen RT-PCR-Daten mit HH17 Hühner-mRNA verschiedener Herzgewebe keine Expression von *Popdc1-3* im proepikardialen Organ, sondern nur im Ausflusstrakt, im Atrium sowie im Ventrikel (Breher

et al., 2004). Da auch das Popdc1-LacZ-Muster keine Expression von Popdc1 im Epikard zeigt (Andrée et al., 2002), gehen wir davon aus, dass der Epikard-detektierende Popdc1-Antikörper nicht Popdc1 detektiert sondern kreuzreagiert mit einem anderen Protein.

Ein weiterer Antikörper erkennt wiederum Popdc1 in Herz-, Skelett und Glattmuskelzellen, unter anderem aber auch in den Glattmuskelzellen der Koronararterien sowie in den epithelialen Derivaten der drei Keimblätter (Smith and Bader, 2006). Diese Diskrepanzen könnten eventuell mit den verschiedenen Spleißisoformen, die die *Popdc*-Gene generieren bzw. mit Dimerisierung und posttranslationalen Modifikationen erklärt werden, welche einen Effekt auf die Detektion der Popdc-Proteine haben können (Brand, 2005), aber auch wie oben schon erwähnt auf Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen zurückzuführen sein.

2.6.3 Der Aufbau von Popdc-Proteinen

Die *Popdc*-Gene kodieren für Proteine von 300 bis 350 Aminosäuren, die keinerlei Homologien zu anderen Proteindomänen aufweisen. Auffällig für Popdc-Proteine ist eine 150 Aminosäure lange, konservierte Domäne, die jedes Popdc-Protein aufweist. Diese wurde als *Popeye*-Domäne bezeichnet.

Des Weiteren zeichnen sich die Proteine durch eine 70 Aminosäuren lange hydrophobe Domäne aus, die zwischen dem N-Terminus und der *Popeye*-Domäne gelegen ist. Computerbasierende Analysen weisen diese Domäne als Transmembrandomäne mit drei transmembranen Helices aus. Für den extrazellulären N-Terminus von Popdc1 ist gezeigt, dass die beiden N-Glykosylierungsstellen funktionell sind und der C-Terminus mit der *Popeye*-Domäne intrazellulär liegt (Knight et al., 2003). Western Blot-Analysen des Popdc1-Proteins in An- und Abwesenheit von reduzierenden Agenzien zeigen, dass Popdc1 bei 58 bzw. bei 120 kDa wandert, was auf eine Homodimerisierung schließen lässt (Knight et al., 2003; Vasavada et al., 2004). Ein Dimerisierungsmotiv für Popdc1 wurde in der *Popeye*-Domäne entdeckt (Aminosäuren 268 bis 274) und die Homodimerisierung von Popdc1 ist mit einem GST pull-down assay sowie Protein Mapping gezeigt worden (Kawaguchi et al., 2008; Ripley et al., 2004). Das Dimerisierungsmotiv zeigt nur eine geringe Konservierung zwischen Popdc1 und Popdc2 bzw. 3, so dass die Popdc-Proteine wohl nicht heterodimerisieren können. Zusammenfassend wird in Abb. 2-10 das Popdc1-Proteinmodell dargestellt (Brand, 2005).

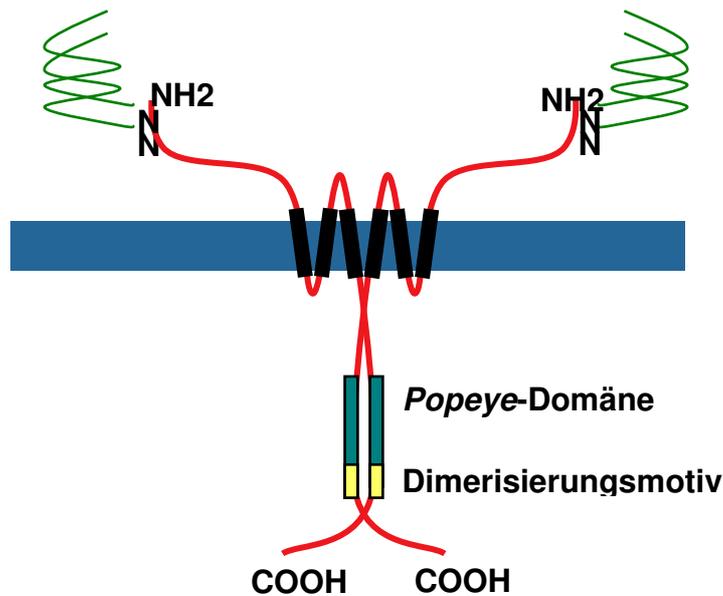


Abb. 2-10: Proteinmodell von Popdc1 nach Brand, 2005

Popdc1 ist als Homodimer in der Membran lokalisiert. Der N-Terminus (NH₂) ist extrazellulär und trägt zwei N-Glykosylierungsstellen (N). Drei Transmembrandomänen durchspannen die Membran, so dass der C-Terminus, der die konservierte *Popeye*-Domäne beinhaltet, zytoplasmatisch orientiert ist. In der *Popeye*-Domäne befindet sich das Dimerisierungsmotiv.

2.6.4 Die Funktion von Popdc-Proteinen

Über die Funktion der Popdc-Proteine ist noch nicht viel bekannt. Es wurde postuliert, dass es sich bei Popdc1 um ein Zelladhäsionsprotein handelt, da gezeigt wurde, dass Popdc1 in epikardialen Zellen an Stellen von Zell-Zell-Kontakten noch vor N-Cadherin rekrutiert wird und dort auch akkumuliert, sowie dass die Überexpression von Popdc1 zu einer Adhäsion von L-Zellen führt (Reese et al., 1999; Wada et al., 2001). Allerdings wurde bei dieser Arbeit noch von einer umgekehrten Membrantopologie des Popdc1 Proteins ausgegangen, d.h. von einem extrazellulären C-Terminus und einem intrazellulären N-Terminus (Wada et al., 2001). Mit der oben erwähnten Diskrepanz der Antikörpererkennung des Popdc1-Proteins sowie der falschen Orientierung des Popdc1-Proteins, müssten diese Daten nochmals überprüft werden. Trotzdem ist in Kardiomyozyten eine Akkumulierung von Popdc1 an den Zellkontakten vorzufinden (Breher, Diplomarbeit, 2003). Ferner ist gezeigt, dass Popdc1 direkt mit dem Gerüstprotein ZO1 im „GST pull down assay“ interagiert und mit diesem Protein sowie dem Tight Junction Protein Occludin kolokalisiert ist (Osler et al., 2005). In der gleichen Studie wurde auch gezeigt, dass ein *Popdc1* Knock-down in kultivierten Zellen zu einem Abfall des transepithelialen Widerstands, zu einer Zerstörung der epithelialen Zellschicht und zu einem Verlust der Membranlokalisation von ZO1 führt, was darauf deutet, dass Popdc1 eine wichtige Rolle in der epithelialen Integrität hat. An einem *in vitro* Modell mit kornealen

Zellen wurde demonstriert, dass *Popdc1* an der Wundheilung beteiligt ist und erst bei Ausbildung von Zell-Zellkontakten wieder detektiert werden kann (Ripley et al., 2004). Zudem zeigen *Popdc1*-Nullmutanten eine verzögerte Regeneration des Skelettmuskels nach Kardiotoxininjektion (Andrée et al., 2002). Ein muskulärer Phänotyp konnte auch bei *Popdc2*-Morpholino-injizierten Zebrafischembryonen gezeigt werden. Diese Fische weisen Defekte in der Schwanzmuskulaturbildung auf. Zusätzlich bekommen diese Fische ein massives perikardiales Ödem, was auf eine embryonale Herzinsuffizienz hinweist (Froese et al., eingereicht). Ansonsten scheint die frühe Entwicklung nicht beeinträchtigt zu sein. Überdies zeigt ein *Popdc1* Knock-down mittels Antisense-RNA, dass die Wanderung von Polzellen von posterior zur antero-dorsalen Seite des Embryos in der Oogenese von *Drosophila* beeinträchtigt ist, was zu einer reduzierten Lebensfähigkeit führt (Lin et al., 2007). Zudem konnte demonstriert werden, dass nach einer Inhibierung von *Popdc1* in *Xenopus* durch Morpholino-Injektion in beide Zellen des Zwei-Zell-Stadiums, die epithelialen Bewegungen bei der Epibolie sowie der Involution inhibiert werden, was zu einem Stillstand der Embryoentwicklung führt (Ripley et al., 2006). Dies steht im Gegensatz zur *Popdc1*-Mausmutante, die lebensfähig ist und keinen augenfälligen Phänotyp während der Entwicklung aufweist (Andrée et al., 2002). Auch ein Knockdown von *Popdc1* in Zebrafisch zeigt keine frühen Entwicklungsdefizite (Beobachtung von Franziska Günthner). Die oben genannten Phänotypen können eventuell mit einer Interaktion von *Popdc1* mit GEFT, ein GEF für die Rho-Familie von GTPasen, erklärt werden (Smith et al., 2008). Es wurde gezeigt, dass *Popdc1* direkt mit GEFT kolokalisiert und interagiert, und eine exogene Expression von *Popdc1 in vitro* zu einer reduzierten Aktivität von Rac1 und Cdc42 führt, womit eine Veränderung der Geschwindigkeit der Zellbewegung und der Abrundung von Zellen einhergeht.

2.6.5 *Popdc* in der Erregungsleitung

Nullmutationen für *Popdc1* bzw. *Popdc2* wurden in Mäusen generiert, indem das erste kodierende Exon durch ein *LacZ*-Reportergen ersetzt wurde (Andrée et al., 2002; Froese et al., eingereicht). *Popdc1*- bzw. *Popdc2*-Nullmutanten sind lebensfähig und zeigen keinen offensichtlichen embryonalen und postnatalen Phänotyp. Wie oben schon erwähnt zeigt die *Popdc2*-Maus eine erhöhte *LacZ*-Expression im Erregungssystem, so dass ein Augenmerk auf das Reizleitungssystem von *Popdc2*-Mäusen geworfen wurde.

Langzeit-EKGs von 8 Monaten alten *Popdc2*- und Wildtypmäusen zeigen, dass die *Popdc2*-Mäuse stressinduzierte Sinusbradykardien aufweisen, die auf eine erhöhte Anzahl von

Sinuspausen zurückzuführen sind (Froese et al., eingereicht). Dieser Rhythmusphänotyp ist altersabhängig. Bei 3 Monate alten Mäusen ist dieser Rhythmusphänotyp noch nicht erkennbar, er wird erst ab ca. 5½ Monaten feststellbar und zeigt sich offensichtlich mit 8 Monaten. Volumenmessungen des Sinusknoten 8 Monate alter *Popdc2*-Mäuse ergab eine 30%ige Reduktion im Vergleich zu Wildtypmäusen (Froese et al., eingereicht). Rhythmusstörungen wurden auch in einem *Popdc2* Antisense-Morpholinoansatz in Zebrafischen detektiert. Die *Popdc2*-Morphanten zeigten am Tag 5 dpf irreguläre ventrikuläre Kontraktionen mit 2:1 und 3:1 ventrikulären Pausen, die auf eine Blockade des AV-Knoten hinweisen. Mit 7 dpf haben die Morphanten extensive Pausen in der atrialen und ventrikulären Kontraktion einhergehend mit abnormaler kardialer Reizleitung und defekter Sinusknotenfunktion (Froese et al., eingereicht). Jüngste Befunde alter *Popdc2*-Mäuse weisen auf einen stressinduzierten AV-Block und ventrikuläre Fibrillation hin.

2.7 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollte der Phänotyp der *Popdc1*-Maus näher charakterisiert werden. Dazu wurden die Mäuse elektrophysiologisch untersucht und die Verteilung von *Popdc1* im Herzen auf dem Proteinniveau dokumentiert. Es zeigte sich, dass *Popdc1* erhöht im kardialen Reizleitungsgewebe exprimiert wird und die Stressadaptation bei älteren *Popdc1*-Mäusen dysfunktional ist. Eine strukturelle Veränderung des Sinusknotens wurde beobachtet.

Außerdem sollte die Bindungsfähigkeit der *Popeye*-Domäne der *Popdc*-Proteine an zyklische Nukleotide charakterisiert werden. Dazu wurde ein 3-D Modell für die *Popeye*-Domäne von *Popdc1* erzeugt und verschiedene cAMP-Präzipitationsanalysen durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigten, dass die *Popeye*-Domäne eine nicht-kanonische zyklische Nukleotidbindungsdomäne trägt, die cAMP und cGMP binden kann. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass die *Popdc*-Proteinfamilie in die Signaltransduktion von cAMP und cGMP involviert ist.

Weiterhin wurde die Proteindistribution von *Popdc1* in Beziehung zu anderen kardialen Membranproteinen untersucht. Eine Lokalisation von *Popdc1* konnte in den lateralen Membranen, den T-Tubuli und in den Glanzstreifen von Herzmuskelzellen demonstriert werden. In diesen Strukturen ist *Popdc1* mit wichtigen anderen Membranproteinen wie z.B. Caveolin 3, NCX und Ca_v1.2 kolokalisiert.

Ein potentieller Interaktionspartner für *Popdc1* ist der Ionenkanal TREK1. In dieser Arbeit wurde diese Interaktion näher untersucht. Dazu wurden Kolokalisationsstudien, elektrophysiologische Untersuchungen und Koimmunopräzipitationsversuche durchgeführt.

2. Einleitung

Es zeigte sich, dass beide Proteine kolokalisieren und –präzipitieren. Des Weiteren wurde die TREK1-Konduktivität in Anwesenheit von Popdc1 erhöht.

Diese Daten weisen darauf hin, dass Popdc1 eine wichtige Funktion in der Modulation elektrischer Aktivität in Herzmuskelzellen besitzt.

3 Material

3.1 Geräte

Agarosegelkammer	PeqLab Biotechnologies
Analysewaage	Kern
Autoklav	Tecnomara; Integra Biosciences
Bechergläser	Schott
Binokular	Leica MZ FLIII
Blotter	Owl
Brutschränke	Kirsch
Digitalkamera	Polaroid
Eismaschine	Scotsman
Feinwaage	Scaltec
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Gefrierboxen	Hartenstein
Gefrierschneider, Jung Frigocut 2800 E	Leica
Gelkammern für Proteingele	Universitätswerkstätten
Glasflaschen	Schott
Hamiltonspritze	Hamilton Bonaduz AG
Kamera CF8 (für Gelbilder)	Kappa
Kassetten für Röntgenfilme	Dr.Goos Suprema
Konfokales Lasermikroskop	Leica
Kulturkolben	Schott
Magnetrührer	Janke & Kunkel
Mikroskop	Leica DMR-BE
Mikrowelle	Privileg
Mini-Rocker MR-1	lab4you
PCR-Maschine (Primus 25 advanced)	PeqLab
pH-Messgerät	WTW (Wissenschaftlich- Technische Werkstätten)
Photoapparate	Leica Wild MPS 48
Pipetten	Eppendorf
Pipettierhilfe	Tecnomara
Reaktionsgefäßständer	Brand

3. Material

Rollenmischer	Greiner Labortechnik
Schüttler für Bakterienkulturen	B.Braun Biotech International
Sequenzier (ABI Prism™ 310 Analyzer)	Applied Biosystems
Spannungsquellen	Gibco und Dipl. Ing. L. Fischer
Spektralphotometer	Eppendorf
SterilGard Hood	The Baker Company Inc.
Test Tube Rotator	Hartenstein
Thermoschüttler	lab4you
Tischzentrifuge	Heraeus und Hettich
UV-Tisch	Bachofer
Vortex-Labormischer	lab4you
Wasserbad	Kötterman
Zeitwecker	Oregon Scientific
Zellkulturinkubator	Heraeus
Zentrifuge	Du Pont Instruments/ Sorvall
	Centrifuges
Zentrifugengefäß für Midi-Bakterienkultur	Nalgene

3.2 Verbrauchsmaterial

AGFA Röntgenfilm	Hartenstein
Alio Frischhaltefolie	Aldi
Einmalpipetten (5ml; 10ml; 25ml)	Corning
Falcons (15ml; 50ml)	Sarstedt
Glaspasteurpipetten	Roth
Kanülen	Braun
Klebeband	Tesa
Kulturröhrchen	Hartenstein
Küvetten	Eppendorf
Nitrilhandschuhe	Roth
Nitrocellulose	Pall Corporation
Parafilm	Pechiney
Pipettenspitzen	Star Lab
Reaktionsgefäße (1,5ml; 2ml)	Noras
Skalpellklingen	Bruno Bayha

3. Material

Spritzen (1ml)	Dispomed
Spritzen (12ml)	B. Braun
Untersuchungshandschuhe	Asid Bonz; HPC Healthline
Whatmanpapier	Hartenstein
Zellkultureinmalpipetten	Corning
Zellkulturplatten	Corning
Zellschaber	Greiner

3.3 Chemikalien, Reagenzien

6-MB-cAMP	Biolog
Aceton	AppliChem
Acrylamidmix	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose	Roth
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Roth
Ampicillin	Roth
Ampuwa-Wasser	Fresenius Kabi
ATP	Sigma-Aldrich
Bacto™ Yeast Extract	Hartenstein
Bacto™-Tryptone	Hartenstein
Bromphenolblau	AppliChem
cGMP	Biolog
Chloroform	AppliChem
Coomassie	Pierce
Complete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
D (+) – Glucose-Monohydrat	AppliChem
DAB (3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid)	Sigma-Aldrich
Dextran- Blau	Fluka
Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat	AppliChem
Dithiotreitol (DTT)	Roth
DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium)	Gibco
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth
dNTP Mix	Takara Bio Inc.
EDTA (Ethylenediaminetetraaceticacid)	AppliChem

3. Material

EGTA (Ethyleneglycoltetraaceticacid)	AppliChem
Entellan	Sigma-Aldrich
Entwickler	Kodak
Essigsäure	AppliChem
Ethanol, p.A.	AppliChem
Ethidiumbromidlösung (1%)	AppliChem
FCS (fötales Kälberserum)	PAA
Ficoll type 400	Sigma-Aldrich; AppliChem
Fixierer	Kodak
Glukose	Roth
Glutamin	PAA
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich
Glycerin, wasserfrei	AppliChem
Glycin, p.A.	Roth
Harnstoff	Roth
HEPES	Roth
IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthin)	Sigma-Aldrich
Instant-Magermilchpulver	DNG-Deutsche Nährmittelgesellschaft
Isopropanol	Roth
Isopropanol, p.A.	AppliChem
Kaliumacetat	AppliChem
Kaliumchlorid	AppliChem
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem
Kaliumhexacyanoferrat(II)	AppliChem
Kaliumhexacyanoferrat(III)	AppliChem
Kupfersulfat	AppliChem
Lipofectamine	Invitrogen
Magnesiumchlorid	AppliChem
Magnesiumsulfat	Serva
Methanol	AppliChem
Mowiol	Calbiochem
Natriumacetat	AppliChem
Natriumchlorid	AppliChem

3. Material

Natriumcitrat	AppliChem
Natriumdesoxycholat	AppliChem
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Natriumhydroxid	AppliChem
NP-40 = Igepal CA-630	Sigma-Aldrich
OCT- Gefriermedium	Polysciences
Orange G Indikator	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	Merck
PEG ₆₀₀₀ (Polyethylenglycol)	Serva
Penicillin/Streptomycin	PAA
Phenolrot	Sigma-Aldrich
PIERCE ECL Western Blotting Substrate	Pierce
Ponceau-S-Lösung	AppliChem
ProteinaseK	Roth
RNase	AppliChem
Roti-Histokit	Roth
Roti-Histol	Roth
Salzsäure	Riedel-de Haen
TEMED (N´N´N´N´-Tetramethylethylendiamin)	Serva
Tris	Roth
TritonX-100	BIO RAD
Trypsin	Difco
Tween-20	AppliChem
Wasserstoffperoxid	Merck
X-Gal	Roth
Xylol	AppliChem
β-Mercaptoethanol	Fluka

3.4 spezielle Agarosen

8-AET-cGMP-Agarose	Biolog
Adenosine-3',5'-cyclic monophosphate (cAMP)-Agarose	Sigma-Aldrich
Anti-Flag-Agarose	Sigma-Aldrich
Anti-Myc-Agarose	Abcam
Ethanolaminagarose	Biolog

Protein A/G PLUS-Agarose Santa Cruz

3.5 Enzyme und dazu gehörige Puffer

Restriktionsenzyme NEB
Ligase Promega
Finnzymes Phusion High-Fidelity DNA Polymerase NEB

3.6 Antikörper

3.6.1 Primäre Antikörper

Anti-Bves Santa Cruz
Anti-Ca_v1.2 Alomone Labs
Anti-Caveolin3 BD Transduction Laboratories
anti-Cx40 Chemicon
anti-Cx43 BD Transduction Laboratories
Anti-Flag Sigma-Aldrich
Anti-Glattmuskelaktin Sigma-Aldrich
Anti-HCN4 Alomone Labs
anti-Huhn-POP1 3F11 Developmental Studies Hybridoma Bank
Anti-Myc Abcam
Anti-NCX1 Swant
Anti-TREK-1 Santa Cruz
Anti- α -sarkomerisches Aktinin Sigma-Aldrich

3.6.2 Sekundäre Antikörper

Alexa Fluor donkey anti-goat 555 Invitrogen
Alexa Fluor donkey anti-mouse 555 Invitrogen
Alexa Fluor donkey anti-rabbit 488 Invitrogen
Alexa Fluor donkey anti-rat 488 Invitrogen
Anti-goat HRP Vector Laboratories
Anti-mouse Fab FITC Dianova
Anti-mouse HRP Vector Laboratories

3.12 Synthetische Oligonukleotide

Unterstrichene Nukleotide annealen an die Sequenz. Fett-unterlegte Nukleotide heben die Restriktionsschnittstellen hervor.

Primer für Klonierung des C-Terminus von *Popdc1* mit **BamH1/ EcoR1**- Schnittstelle

NNNNNGGATCCGGATTCTTCAAGATGGTCAAGATAGAGAAAGAGCTC (56°C)

→ die nicht unterstrichen Nukleotiden sind 12 Nukleotide der 5' UTR und das Start-Codon von hPopdc1a

NNNNNGAATTCTCAAGGCAGCCGCTGCAG (56°C)

↳ Annealing-Temperatur für PCR: 56°C

Primer für Klonierung von TREK1-flag mit **Kpn1**- Schnittstelle

NNNNNNGGTACCGGGAATTCGATTGAAACCTTG (56°C)

NNNNNNGGTACCTTTGATGTTCTCAATCACAGC (54°C)

↳ Annealing-Temperatur für PCR: 55°C

Primer für die Genotypisierung von *Popdc1*-Mäusen

CGCAAGGACTTTTCAACATG

GTCAAATTCAGACGCCAACG

TAGAGACAACATCACTCTGAGC

↳ Annealing-Temperatur für PCR: 55°C

4 Methoden

4.1 DNA-analytische Methoden

LB-Medium 10g NaCl; 10g Tryptone; 5g Yeast-Extrakt; add. 1000ml
mit bidest. H₂O; (Antibiotikum)

LB-Platten 10g NaCl; 10g Tryptone; 5g Yeast-Extrakt; 15g Agar-Agar;
add. 1000ml mit bidest. H₂O; (Antibiotikum)

4.1.1 Mini-Präparation

GET-Lösung 50mM Glukose; 10mM EDTA; 25mM Tris-HCl pH 8.0,
4mg/ml Lysozym; 10µg/ml RNase

Lysis-Puffer 0,2M NaOH; 1%SDS

Hochsalz-Lösung 60ml 5M Kaliumacetat; 11,5ml Eisessig; 28,5ml bidest. H₂O

Die Mini-Präparation erfolgt nach der Alkalinen Lysis Methode von Birnboim und Doly, modifiziert von D. Ish-Horowicz.

4.1.2 Aufreinigung der Mini-DNA

Die Aufreinigung von Mini-DNA, die mittels der alkalischen Lyse Methode hergestellt wurde, wird mithilfe von QIAGEN-Säulen gereinigt. Dazu wird das fünffache Volumen an PB-Puffer zum einfachen Volumen der DNA-Lösung gegeben und gemischt. Diese Lösung wird dann auf eine QIAGEN-Säule aufgetragen und eine Minute mit höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und die weitere Durchführung erfolgt nach dem Protokoll des QIAGEN Plasmid Purification Handbook.

4.1.3 Midi-Präparation

Die Midi-Präparation erfolgt nach dem QIAGEN Plasmid Purification Handbook.

4.1.4 PCR

Template TREK1	PcDNA3.1-hTREK1c, synthetische Oligonukleotide und Annealing- Temperatur s.o.
Template C-Terminus chPopdc1a	CHEST59k12 synthetische Oligonukleotide und Annealing- Temperatur s.o.

Zur Amplifizierung von PCR-Fragmenten wurde die Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase von NEB verwendet. Die Durchführung der PCR erfolgt laut Protokoll. Als Puffer wird der HF-Puffer verwendet.

4.1.5 Restriktionsverdau

PCR-TREK1-Fragment	Kpn1; Puffer 1; BSA
PcDNA3.1-flag	Kpn1; Puffer 1; BSA
PCR-C-Terminus chPopdc1a	EcoR1; BamH1; EcoR1- Puffer
PcDNA3.1	EcoR1; BamH1; EcoR1- Puffer

Bei der Restriktion sollte darauf geachtet werden, dass die Glycerinkonzentration im Restriktionsansatz nicht höher als 10% ist. Deshalb sollten nicht mehr als 1µl Enzym pro 10µl Ansatz eingesetzt werden, da diese in Glycerin aufbewahrt werden. Die Menge an Enzym ist davon abhängig, wie viel DNA eingesetzt wird. 1 Unit Enzym verdaut 1µg DNA pro Stunde.

4.1.5.1 Standardrestriktionsansatz

x µl DNA

y µl Enzym 1

(z µl Enzym 2)

(1µl 10x BSA)

1µl 10x Restriktionspuffer (NEBuffer)

add. 10µl bidest. H₂O

Bei einem größerem Verdau werden die 10x BSA- und 10x Restriktionspuffermenge dem Ansatz entsprechend erhöht. Für einen Kontrollverdau wird eine Ansatzgröße von 10µl für einen Klonierungsverdau wird ein Ansatz von 50µl verwendet. Der Ansatz wird bei der Restriktionstemperatur des Enzyms bzw. der Enzyme für mindestens eine Stunde bis über Nacht inkubiert. Zur Inaktivierung der Enzyme wird der Ansatz für 20 Minuten je nach Enzym bei 65 oder 80°C inkubiert.

4.1.6 Dephosphorylierung von DNA

Um eine Religation von Vektorfragmenten in einem Ligationsansatz zu verhindern, werden die 5'-Phosphatgruppen des Vektors mittels der alkalischen Phosphatase (CIP) entfernt. Dazu wird 1µl der CIP zu einem 50µl Hitze-inaktivierten Restriktionsverdau hinzugefügt und der Ansatz für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

4.1.7 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgt mit dem QIAEX II Gel Extraktionskit von QIAGEN.

4.1.8 Ligation

Für die Ligation sollte die Konzentration des Vektors kleiner als die des zu klonierenden Fragmentes sein, um eine große Anzahl rekombinanter Klone zu erhalten. Als Insert:Vektor-Verhältnis wird hauptsächlich das Verhältnis 1:1 oder das Verhältnis 3:1 verwendet. Vom Vektor werden entweder 100ng oder 200ng eingesetzt. Die Menge an einzusetzendem Insert berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{ng (Vektor)} \times \text{kb (Insert)/kb-Größe Vektor} \times \text{molares Verhältnis Insert/Vektor} = \text{ng (Insert)}$$

bevor sie auf LB-Platten, die das geeignete Antibiotikum enthalten, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert werden.

4.1.11 Herstellung von Glycerinstocks

300µl 80%iges Glycerin wird mit 650µl Bakterienkultur versetzt, gemischt und bei -80°C eingefroren.

4.2 Genotypisierung von *Podc1*-Mäusen

Lysispuffer 0,1M Tris-HCl, pH 8,5; 5mM EDTA; 0,2%SDS; 0,2M NaCl;
0,1mg/ml ProteinaseK (frisch zugeben)

TE-Puffer 10mM Tris-HCl, pH 8,0; 1mM EDTA; 10µg/ml RNase

Glykogen 35mg/ml in H₂O_{bidest.}

Für die Extraktion von Mausschwanz-DNA wird ein Stück des Schwanzes mit 500µl Lysispuffer versetzt und unter Schütteln bei 56°C über Nacht inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 10 Minuten bei voller Geschwindigkeit wird der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 1µl Glykogen und 500µl Isopropanol versetzt, geschüttelt und für eine Stunde bei -80°C gefällt. Nach Zentrifugation wie oben wird der Überstand verworfen und das Pellet 3x mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wird in 40µl TE-Puffer aufgenommen und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

Zur Amplifizierung der PCR-Fragmenten wird die rTaq von Takara verwendet. Die Durchführung der PCR erfolgt laut Protokoll. Es werden 2µl Mausschwanz-DNA und 50pM von jedem Primer für einen 25µl Ansatz eingesetzt. Die PCR wird mit 35 Zyklen gefahren. Auf dem Gel erscheint die Wildtypbande bei 200bp und die homozygote Bande bei 600bp.

4.3 Zellbiologische Methoden

Zellkulturmedium 10% FCS; 1% L-Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin; DMEM

2x Einfriermedium 20% DMSO, 20% FCS; DMEM

10x PBS 80g NaCl; 2g KCl; 14,4g Na₂HPO₄ x 2 H₂O; 2g KH₂PO₄;
add. 1000ml mit bidest. H₂O

1x PBS: 100ml 1x PBS; 900ml bidest. H₂O

Trypsin

4.3.1 Auftauen von Zellen

Zellkulturzellen werden 1:1 in Zellkulturmedium:2x Einfriermedium in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zellen werden im 37°C-Wasserbad aufgetaut und unter sterilen Bedingungen mit 10ml Zellkulturmedium versetzt. Die Zellen werden durch Zentrifugation bei 1000rpm bei Raumtemperatur pelletiert und der Überstand abgesaugt. Nach Resuspension der Zellen in 2ml Zellkulturmedium, werden diese in insgesamt 10ml Zellkulturmedium auf 10cm Zellkulturplatten ausgesät.

4.3.2 Kultur von Zellen

Die Zellen werden bei 37°C und 10% CO₂ im Zellkulturinkubator kultiviert.

4.3.3 Splitten von Zellen

Die Zellen werden, wenn sie konfluent sind, 1:6 bis 1:8 gesplittet: Dazu wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 1ml Trypsin versehen und bei 37°C im Zellkulturinkubator bis zur Ablösung der Zellen inkubiert. Um das Trypsin zu stoppen, werden 5 bzw. 7 ml Zellkulturmedium hinzugefügt. 1ml Zellsuspension wird auf eine neue 10cm Platte in insgesamt 10ml Zellkulturmedium aufgenommen. Wird auf eine nächst größere Platte ausgesät, muss der Vergrößerungsfaktor von 3 berücksichtigt werden. D.h. auf eine 15cm Zellkulturplatte werden bei einem Splitverhältnis von 1:6 3 ml ausgesät. Das Endvolumen an Zellkulturmedium ist dort 25ml.

4.3.4 Einfrieren von Zellen

Die Zellen werden mit PBS gewaschen und anschließend mit 1ml Trypsin versetzt und bis zur Ablösung der Zellen im 37°C Inkubator inkubiert. Zum Abstoppen des Trypsin werden die Zellen mit 5ml Medium versetzt. Nach einer Zentrifugation bei 1000rpm wird der Überstand verworfen, die Zellen in 2,5ml Medium resuspendiert und anschließend mit 2,5ml 2x Einfriermedium gemischt und à 1ml in Einfrierröhrchen aliquotiert. Nach Abkühlung auf Eis werden die Zellen für 2-3 Stunden bei -20°C und anschließend über Nacht bei -80°C eingefroren. Zur Langzeitlagerung werden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

4.3.5 Transfektion von Zellen

Einen Tag vor der Transfektion wird eine konfluente Zellkulturplatte 1:4 auf nächst kleinere Zellkulturplatten gesplittet. Sollen die Zellen immungefärbt werden, werden in die Zellkulturplatten sterile Deckgläschen gelegt. Die Transfektion erfolgt mit Lipofectamine laut Protokoll. Werden zwei Konstrukte transfiziert, wird die DNA-Menge im Verhältnis 1:1 zwischen den beiden Konstrukten aufgeteilt.

Die Ernte der Zellen und somit die Herstellung von Protein-Totalextrakten wie auch die Immunfärbung der Zellen erfolgt 24 Stunden nach Transfektion.

4.3.6 Isolierung von adulten kardialen Myozyten aus der Maus

Die Isolierung von adulten kardialen Myozyten wurde in Zusammenarbeit mit dem Forschungslabor Elektrophysiologie/AG Maier der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg nach (Maier et al., 2002) durchgeführt. Die Myozyten werden auf den Laminin-beschichteten Chamber Slides mit PFA fixiert.

4.4 Protein-analytische Methoden

4.4.1 Erstellen des 3D-Modells von Popdc1

Das 3D-Modell der humane *Popeye*-Domäne (Reste Ser125 bis ASP266) wurde ausgehend von einem primären Modell von dem Internet-basierenden Werkzeug Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/html/index.html>) hergestellt und von Prof. Dr. Thomas Müller, Botanisches Institut I der Universität Würzburg durchgeführt. Die Phyre-Ergebnisse wurden auf Ähnlichkeiten mit cAMP-Proteinen bzw. Domänen gescreent. Von den 10 Treffern mit bekannten Strukturen zeigten 6 Proteindomänen signifikante Sequenzähnlichkeiten zu Popdc1. Diese gehören zu der Klasse der cAMP-Bindungsproteine. Der repräsentative Eintrag (PDB 2PQQ, die N-terminale Domäne des

Transkriptionsregulators von *Streptomyces coelicolor*) zeigte die höchste Sequenzübereinstimmung mit 20% über 149 Aminosäuren und wurde zur weiteren Modellbildung genutzt. Zuerst wurden dem Modell, welchem mehrere Schleifensegmente fehlten, fehlende Reste mit dem Proteindesignwerkzeug des Softwarepakets Quanta2006 (Accelrys Inc, San Diego) manuell hinzugefügt. Das vervollständigte Modell wurde anschließend einer Energieminimierung unterzogen, so dass schlechte van der Waals Kontakte zwischen den Seitenketten- und den Hauptkettenatome entfernt wurden. Zuerst wurden sterische Abstoßungen zwischen den Seitenketten durch die Suche von Rotameren mit Hilfe des XBuilt Werkzeug der Quanta2006 Software entfernt. Dann wurde die Energieminimierung durchgeführt, indem die 25 Hauptkettenatome fixiert und die Seitenkettenatome mit einem schwachen harmonischen Potential mit der Energiekonstante von $5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ erhalten blieben durch Nutzung geometrischer Energiebedingungen. Nach 500 Schritten steiler Gradientenminimierung wurden die Hauptkettenatome durch schrittweisen Gebrauchs erst eines starken harmonischen Potentials mit einer Energiekonstanten von $50 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ und anschließend mit $5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ auch relaxiert. Dieses Modell wurde dann mit der cAMP-Bindungsdomäne der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA; PDB-Eintrag 1CX4) überlagert. Basierend auf dem strukturellen Alignment wurde die cAMP-Schleife von unserem Popdc1-Modell auf der der Sequenz- und Strukturähnlichkeit von 1CX4 umstrukturiert. Ein cAMP wurde in die vermutete Bindungstasche der *Popeye*-Domäne von Popdc1 platziert. Dazu wurden die vorhanden Kontakte der cAMP-Bindungsdomäne der PKA genutzt. Das verbesserte Modell der *Popeye*-Domäne von Popdc1 wurde noch mal einer Energieminimierung wie oben beschrieben unterworfen. Das endgültige Modell zeigt eine gute Gesamtgeometrie für die Hauptstrang- und Seitenkettengeometrien und weist keine schlechten van der Waals Kontakte auf.

4.4.2 Herstellung von Protein-Totalextrakten

10x Protease-Inhibitor 1 Tablette in 1ml entsprechendem Puffer

1x Protease-Inhibitor 1 Tablette in 10ml entsprechendem Puffer

Die nachfolgenden Lyse-Puffer werden vor Gebrauch mit Protease-Inhibitor versetzt und auf Eis gelagert.

4.4.2.1 von neonatalen Mäuseherzen

RIPA-Puffer	1% Nonidet (NP40); 0,5% Natriumdesoxycholat; 0,1% SDS in PBS
Tris-Puffer für IP	20mM Tris, pH 7,5; 100mM NaCl; 0,5% NP40; 0,5mM EDTA
Lysis-Puffer	50mM Tris, pH 7,5; 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton
PBS-0,5%NP40	
PBS-0,5%Triton	
PBS-0,1%Triton	

6 Herzen werden in 1ml Lyse-Puffer aufgenommen, mittels stößeln und durch 10maliges hochziehen durch eine 24G-Kanüle homogenisiert. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis werden die Proben bei 4°C mit voller Geschwindigkeit für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zur Lagerung werden die Proben mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.4.2.2 von adultem Mäuseherzgewebe

Harnstoffpuffer	0,05M Tris, pH 7; 8M Harnstoff; 1% SDS; 1% β -Mercaptoethanol
-----------------	---

Atrium und Ventrikel werden getrennt in 3ml Harnstoffpuffer pro g Gewebe wie oben homogenisiert. Da sich das atriale Gewebe nicht gut homogenisieren lässt, werden die Pellets nach der Zentrifugation in 2x SDS-Probenpuffer (1 zu 1 Verdünnung des 4x SDS-Probenpuffers siehe 4.4.9.1) aufgenommen. Der Überstand wird eingefroren.

4.4.2.3 von embryonalen Hühnerherzen

Homogenatlysepuffer 20mM Hepes, pH 7,4; 20mM NaCl; 5mM EDTA;
5mM EGTA; 0,5% Triton; 1mM DTT

RIPA- Puffer 1% NP-40; 0,5% Natriumdesoxycholat; 0,1% SDS in PBS

Befruchtete Hühnereier werden bei 36,5 °C in einem Inkubator für 12-14 Tagen bebrütet. Nachdem die Eier vorsichtig geöffnet wurden, werden die Embryonen auf eine Petrischale überführt und die Herzen präpariert. Ein embryonales Hühnerherz wird mit 1ml Puffer versetzt und wie unter 4.4.2.1 beschrieben homogenisiert und zentrifugiert. Der Überstand wird bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

4.4.2.4 von Zellkulturen

Tris-Puffer für IP 20mM Tris, pH 7,5; 100mM NaCl; 0,5% NP40;
0,5mM EDTA

Adhärente Zellen werden 2x mit PBS gewaschen, um Zellkulturmedium zu entfernen. Nach Zugabe von 1ml Lyse-Puffer werden die Zellen mit einem Zellschaber von der Zellkulturplatte gelöst und mit dem Puffer in ein Eppendorfgefäß überführt. Zur Homogenisierung werden die Zellen 10x durch eine 24G-Kanüle gezogen. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis, erfolgt eine 15minütige Zentrifugation bei voller Geschwindigkeit und 4°C. Der Überstand wird bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

4.4.3 Fraktionierung von Proteinen

4.4.3.1 Subzelluläre Fraktionierung in Kerne, Zytosol und Membranen

TSE 10mM Tris, pH 7,5; 300mM Saccharose; 1mM EDTA

CLB 10mM HEPES; 10mM NaCl; 1mM KH₂PO₄; 5mM NaHCO₃;
1mM CaCl₂; 0,5mM MgCl₂

3 befruchtete Hühnereier werden für 10 Tage bei 36,5°C bebrütet. Die Eier werden vorsichtig geöffnet und die Embryonen auf eine Petrischale mit eiskaltem PBS überführt und die Herzen 3x mit eiskaltem PBS gewaschen. Nachdem die Herzen zerschnitten wurden, werden sie in 1ml CLB/5mM EDTA/Protease-Inhibitor aufgenommen und mit einem Stößel sowie durch 10 bis 15maliges ziehen durch eine Kanüle homogenisiert. Nach einer 5minütigen Inkubation auf Eis wird nochmals durch 10 bis 15maliges Ziehen durch eine Kanüle homogenisiert und anschließend bei 7500rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand, der das Zytosol sowie die Membranen enthält, wird für 30 Minuten bei 29000rpm in einem SW40 Rotor bei 4°C zentrifugiert und somit in Zytosol (Überstand) und Membranpellet, welches in 50µl PBS aufgenommen wird, fraktioniert. Das Pellet, welches aus Kernen und Zellresten besteht, wird in 1ml TSE/0,1% NP-40/Protease-Inhibitor aufgenommen und nochmals mittels Ziehen durch die Kanüle homogenisiert. Nach einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 4°C, wird der Überstand verworfen und das Pellet 2x mit TSE/0,1% NP-40/Protease-Inhibitor gewaschen und anschließend in 50µl TSE/0,1% NP-40/Protease-Inhibitor aufgenommen. 50µl der proben werden in 4x reduzierenden SDS-Probenpuffer aufgenommen und 30µg auf ein Proteingel aufgetragen.

4.4.3.2 Subzelluläre Fraktionierung in membranassoziierte und transmembrane Proteine

NaPP	20mM Na ₂ HPO ₄ 20mM NaH ₂ PO ₄ → den basischen Puffer vorlegen und mit dem saueren Puffer auf pH 7,4 bringen
------	---

NaPP/EDTA/NaCl	NaPP; 10mM EDTA; 150mM NaCl oder 500mM NaCl
----------------	---

2 embryonale Hühnerherzen aus Hühnern, die 12 Tage bebrütet wurden, werden 2x mit PBS gewaschen, das überschüssige PBS entfernt und bei -20°C eingefroren. Die Herzen werden in 1ml NaPP aufgenommen und wie unter 4.4.3.1 homogenisiert. Vom Homogenat wird ein Aliquot abgenommen (H) und bei 4°C gelagert. Der Rest wird für 30 Minuten bei 4°C bei 25000rpm zentrifugiert. Der Überstand (ÜS) wird abgenommen und bei 4°C gelagert. Das Pellet (M1) wird zum Dissoziieren schwach assoziierter Proteine in 350µl NaPP/EDTA/150mM NaCl aufgenommen, resuspendiert und ein Aliquot entnommen, das

wie oben gelagert wird. Nach einer weiteren Zentrifugation (s.o.) wird der Überstand (ÜS1), der die schwach assoziierten Proteine enthält, wieder bei 4°C gelagert und das Pellet zum Abwaschen von stark assoziierten Proteinen in 350µl NaPP/EDTA/500mM NaCl resuspendiert und ein Aliquot entnommen und gelagert (s.o.). Nach der 3. Zentrifugation (s.o.) wird der Überstand (ÜS2), der die stark assoziierten Proteine enthält, wieder abgenommen und gelagert und das Pellet (M3), welches jetzt nur noch die integralen Membranproteine enthalten soll, in NaPP/EDTA/500mM NaCl resuspendiert. 40µg werden in 4xSDS-Probenpuffer aufgenommen und auf ein Proteingel aufgetragen.

4.4.4 Deglykosylierung von Popdc1

Natriumphosphatpuffer	1M Na ₂ HPO ₄ 1M NaH ₂ PO ₄ → für 0,1M Natriumphosphatpuffer pH 7,2: 68,4ml Na ₂ HPO ₄ + 31,6ml NaH ₂ PO ₄ add. 1000 ml
Denaturierungslösung	20mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2; 10mM Natriumazid; 60mM EDTA; 0,8% NP-40

Zweimal 30µg Hühnerherzlysate, hergestellt mit RIPA-Puffer (siehe 4.4.2.1), werden mit 10µl 1% SDS pro 10µg Proteinlösung für 2 Minuten gekocht. Danach werden 90µl Denaturierungslösung pro 10µg Protein hinzugefügt und nochmals für 2 Minuten gekocht. Nach Abkühlung der Proben wird eine Probe mit 0,4U N-Glykosidas F pro 10µg Protein versetzt. Die andere Probe dient als Kontrolle und wird nicht mit N-Glykosidas F versetzt. Beiden Proben werden für 15-20 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Proteinfällung (siehe 4.4.6) werden die Proben auf ein Proteingel aufgetragen (siehe 4.4.9).

4.4.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgt nach der Methode von Bradford. Für die Standardreihe werden BSA-Konzentrationen von 0,025; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5 und 2 mg/ml eingesetzt. Für den Nullwert wird Wasser verwendet. Die zu untersuchenden Proben werden 1:10; 1:20; 1:40 und 1:80 verdünnt. Je 20µl der Standardreihe, des Wassers und der Verdünnungen werden mit 1ml Coomassie-Lösung versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Verschiebung des Absorptionsspektrums von 465nm auf

595nm nach Interaktion des Farbstoffes mit den Proteinen wird am Photometer bei 600nm gemessen. Aus der OD₆₀₀ der Standardreihe wird eine Standardkurve erstellt, an der die Konzentration der Proben abgelesen wird.

4.4.6 Methanol-Chloroform-Fällung von Proteinen

Zur Proteinlösung werden 1 Volumen Chloroform und 3 Volumina Methanol hinzugefügt und die Probe gut gemischt. Nach Zugabe von 3 Volumina Wasser wird für eine Minute gemischt und anschließend für 5 Minuten bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Die obere Phase wird verworfen - das Protein befindet sich in der Interphase. Es werden erneut 3 Volumina Methanol hinzugefügt und gemischt. Nach wiederholter Zentrifugation wie oben wird der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und anschließend in reduzierenden SDS-Probenpuffer aufgenommen (siehe 4.4.9.1).

4.4.7 Immunpräzipitation

10x TBS	1,5M NaCl; 0,5M Tris-HCl, pH 7,6
TBS	100ml 10x TBS add. 1000ml
2x SDS-Probenpuffer	125mM Tris, pH 6,8; 4% SDS; 20% Glycerol, eine Spatelspitze Bromphenolblau

Zellen für die Immunpräzipitation werden auf 10cm Platten ausgesät und transfiziert (siehe 4.3.5). Die Lyse der Zellen erfolgt 24 Stunden nach Transfektion mit Tris-Puffer für IP wie oben beschrieben (siehe 4.4.2.4). 45µl des Lysats werden abgenommen und mit 15µl 4x reduzierenden SDS-Probenpuffer versetzt (siehe 4.4.9.1). Das restliche Lysat wird mit 20µl A/G-Plus-Agarose, die vorher 2x mit 0,5ml TBS gewaschen wurde, für eine Stunde unter Rotieren bei 4°C in einem Eppendorfgefäß geklärt. Die Zentrifugation der Agarosen nach jedem Wasch- und Inkubationsschritt erfolgt bei 8000rpm für 30 Sekunden.

Das geklärte Lysat wird nach Zentrifugation auf 40µl Flag-Agarose bzw. 20µl Myc-Agarose, die vorher wie die A/G-Plus-Agarose gewaschen wurden, gegeben und für 2 Stunden bei 4°C unter Rotieren inkubiert, so dass die Fusionsproteine binden können. Nach Zentrifugation der Proben werden die Überstände verworfen. Die Flag-Agarose und die Myc-Agarose werden 3x mit TBS gewaschen, trocken gesaugt und in 40µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Nach

einer Hitzedenaturierung für 3 Minuten bei 95°C werden die Proben auf Eis abgekühlt und anschließend für eine Minute bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Um eine Überführung des Agarosematerials zu verhindern, wird auf eine gelbe Spitze eine weiße Spitze gesetzt, durch das Pellet durchgestochen und der Überstand vorsichtig abpipettiert und in ein neues Eppendorfgesäß überführt. Dieser Schritt wird wiederholt. Anschließend werden 2µl β-Mercaptoethanol hinzugefügt und 20µl auf ein Proteingel aufgetragen. Vom Lysat werden 30µl aufgetragen.

4.4.8 cAMP-Präzipitation

Waschpuffer A 10mM Hepes, pH 7,4; 1,5M MgCl₂; 10mM KCl; 0,5M NaCl;
0,1% NP-40; 1mM DTT

Waschpuffer B 10mM Hepes, pH 7,4; 1,5M MgCl₂; 10mM KCl; 0,1% NP-40;
1mM DTT

Die Puffer werden mit 1x Protease-Inhibitor versetzt.

4.4.8.1 cAMP-Präzipitation und Ethanolamin-Präzipitation

Die embryonalen Hühnerherzen werden mit Homogenatlysepuffer wie unter 4.4.2.3 beschrieben homogenisiert. Das Lysat wird auf 0,0048g cAMP-Agarose bzw. in 50µl Ethanolamin-Agarose gegeben, die vorher 3x mit Homogenatlysepuffer gewaschen wurden, und für 2 Stunden unter Rotieren inkubiert. Nach Zentrifugation werden die Pellets 1x mit Waschpuffer A und 2x mit Waschpuffer B gewaschen und anschließend in 25µl 4x SDS-Probenpuffer (siehe 4.4.9.1) und 25µl Wasser aufgenommen. Die Zentrifugationen erfolgen jeweils mit 2500rpm für 5 Minuten. Alle Schritte werden bei 4°C durchgeführt.

4.4.8.2 cAMP-Präzipitation mit embryonalen Hühnerherzlysat und anschließender Elution

3 bis 4 embryonale Hühnerherzen werden wie unter 4.4.2.3 beschrieben in Homogenatlysepuffer homogenisiert. Alle weiteren Schritte erfolgen bei 4°C. Die weiteren Zentrifugationsschritte erfolgen bei 2500rpm für 5 Minuten. Das Lysat wird mit 500µl 10mM IBMX versetzt und auf 5ml aufgefüllt, so dass die Endkonzentration von IBMX 1mM ist. 5µl werden abgenommen und mit 4x reduzierenden SDS-Probenpuffer versetzt. Je 1ml des Lysats

wird auf ca. 50µl Ethanolamin-Agarose, entweder als Kontrolle oder zum Klären des Lysats, bzw. auf 0,0048g cAMP-Agarose gegeben, die vorher mit Homogenatlysepuffer aufgequellt und insgesamt 3x mit Homogenatlysepuffer gewaschen wurden. Wird die Ethanolamin-Agarose zum Klären des Lysats benutzt, erfolgt eine Inkubation für eine Stunde unter Rotieren, bevor das Lysat auf die cAMP-Agarose gegeben wird. Ansonsten wird das Lysat auf den jeweiligen Agarosen für 2 Stunden unter Rotieren inkubiert. Danach werden die Ethanolamin- und die cAMP-Agarosen 3x mit Waschpuffer B gewaschen und die Pellets vorsichtig trocken gesaugt. Das Ethanolamin-Agarose-Pellet wird mit 25µl 4x reduzierenden SDS-Probenpuffer und 25µl Wasser aufgenommen. Die cAMP-Agarosepellets werden mit ansteigenden Konzentrationen an 6-MB-cAMP bzw. mit 15mM 6-MB-cAMP, 15mM cGMP, 15mM ATP oder mit Wasser in Waschpuffer B mit 1mM IBMX und 1x Protease-Inhibitor in einem Gesamtansatz von 50µl versetzt und für 30 Minuten unter Drehen inkubiert. Der Überstand wird nach Zentrifugation mit 16,7µl 4x reduzierenden SDS-Probenpuffer versetzt oder mit Methanol-Chloroform gefällt (siehe 4.4.6) und in 25µl 4x reduzierenden SDS-Probenpuffer (siehe 4.4.9.1) und 25µl Wasser aufgenommen. Das cAMP-Agarosepellet wird mit 25µl 4x reduzierenden SDS-Probenpuffer und 25µl Wasser versetzt. 30µl werden aufs Gel aufgetragen.

4.4.8.3 cAMP-Präzipitation mit Lysaten aus transfizierten Zellen

Die Lysate werden wie unter 4.4.2.4 hergestellt und mit IBMX zu einer Endkonzentration von 1mM versetzt. Die weitere Durchführung erfolgt ähnlich wie unter 4.4.8.1. Die Lysate werden eine Stunde mit der Ethanolamin-Agarose vorgeklärt werden bevor sie mit der cAMP-Agarose inkubiert werden. Beide Agarosen werden vorher 3x mit Zelllyse-Puffer gewaschen. Nachdem die Pellets 3x mit Waschpuffer B gewaschen wurden, werden sie mit 25µl 4x reduzierenden SDS-Probenpuffer und 25µl Wasser versetzt. 30µl werden aufs Gel aufgetragen.

4.4.8.4 Konkurrenz mit cGMP und 6-MB-cAMP

Embryonale Hühnerherzlysate werden wie unter 4.4.2.3 beschrieben hergestellt. Zu den Lysaten wird IBMX zu einer Endkonzentration von 1mM hinzugefügt. 5µl des Lysats wird entnommen und mit 4x reduzierenden SDS-Probenpuffer versetzt. 180µl Lysat wird mit 20µl 0,2M 6-MB-cAMP bzw. cGMP, so dass die Endkonzentration der zyklischen Nukleotide 20mM ist, oder mit Wasser versetzt und für 30 Minuten bei 4°C unter Rotieren inkubiert, bevor das Lysat auf die mit Homogenatlyse-Puffer gewaschene cAMP-Agarose (0,0048g pro

Ansatz) gegeben wird. Zur Kontrolle wird gewaschene Ethanolamin-Agarose mit 180 μ l Lysat, das mit 20 μ l Wasser versetzt wurde, genommen. Nach einer zweistündigen Inkubation unter Rotieren bei 4°C, werden die Pellets 3x mit Waschpuffer B gewaschen, trockengesaugt und mit 25 μ l 4x reduzierenden SDS-Probenpuffer und 25 μ l Wasser versetzt. 30 μ l werden aufs Gel aufgetragen.

Für eine Kompetition mit abfallender Konzentration an zyklischen Nukleotiden werden 180 μ l Lysat mit x μ l 0,2M 6-MB-cAMP bzw. cGMP versetzt und mit Wasser auf 200 μ l aufgefüllt. Es wird wie oben weiter fortgefahren.

4.4.9 Diskontinuierliche Gelelektrophorese/ SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE werden Proteine unter denaturierten Bedingungen in Anwesenheit von SDS im elektrischen Feld abhängig von ihrer molaren Masse aufgetrennt.

SDS lagert sich mit seinem unpolaren Rest an das Protein an. Der negativ geladene Rest richtet sich nach außen und maskiert die Eigenladung des Proteins, so dass die Trennung im Gel hauptsächlich auf der Größe der Moleküle basiert.

Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese werden die Proteine in einem großporigen Sammelgel fokussiert und anschließend in einem kleinporigen Trenngel aufgetrennt.

4.4.9.1 Aufarbeitung der Proben

4x SDS-Probenpuffer (reduzierend)	3,8ml bidest.H ₂ O; 1ml 0,5M Tris-HCl, pH 6.8; 0,8ml Glycerin; 1,6ml 10%iges SDS; 0,4ml β -Mercaptoethanol; 0,4ml 1%iges Bromphenolblau
--------------------------------------	--

4x SDS-Probenpuffer	4,2ml bidest.H ₂ O; 1ml 0,5M Tris-HCl, pH 6.8; 0,8ml Glycerin; 1,6ml 10 %iges SDS; 0,4 ml 1%iges Bromphenolblau
---------------------	--

Die Proteinproben werden mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Danach werden die Proben bis zur Verwendung auf Eis gelagert bzw. eingefroren.

4.4.9.2 Gelelektrophorese

Trenngel	1,4ml H ₂ O; 0,33ml 30% Acrylamid-Mix; 0,25ml 1,0M Tris-HCl, pH 6,8; 0,02ml 10% SDS; 0,02ml 10% APS; 0,002ml TEMED
Sammelgel (10%)	1,9ml H ₂ O; 1,7ml 30% Acrylamid-Mix; 1,3ml 1,5M Tris- HCl, pH 8,8; 0,05ml 10% SDS; 0,05ml 10% APS; 0,002ml TEMED
5x Laufpuffer	15g Tris; 72g Glycin; 5g SDS; add. 1000 ml mit bidest. H ₂ O, vor Gebrauch wird der Laufpuffer auf einfache Konzentration verdünnt

Das Trenngel wird zwischen gut gereinigten Glasplatten in der Gießapparatur gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Gel auspolymerisiert ist, kann es mit dem frisch angesetzten Sammelgel überschichtet werden. Dazu wird der Alkohol vorher entfernt und die Oberfläche des Trenngels mit bidestilliertem Wasser gespült. Der Kamm wird sofort luftblasenfrei eingesetzt. Nach der Polymerisation des Gels wird es in die Gelkammer eingebaut, welche anschließend mit 1x Laufpuffer versehen wird. Der Kamm wird vorsichtig entfernt, die Taschen mit Laufpuffer gespült und die denaturierten Proben werden aufgetragen. Der Lauf erfolgt bei konstanten 100V.

4.4.9.3 Western Blot

Blotpuffer	25mM Tris-HCl pH 8,5; 150mM Glycin; 10% Methanol
------------	--

Nach der SDS-PAGE wird das Gel für 10 Minuten in Blotpuffer equilibriert. 6 Whatman-Papiere und die Nitrozellulose-Membran werden auf Größe des Gels zugeschnitten und ebenfalls in Blotpuffer equilibriert.

Der Blotaufbau erfolgt vom (+)- zum (-)- Pol folgendermaßen:

(-)

3 mit Blotpuffer getränkte Whatman-Papiere

equilibriertes Gel

equilibrierte Nitrozellulose-Membran

3 mit Blotpuffer getränkte Whatman-Papiere

(+)

Der Transfer der Proteine erfolgt mit $1,2\text{mA}/\text{cm}^2$ für eine Stunde. Nach dem Transfer wird die Membran entnommen und mit 1x PBS gespült.

4.4.9.3.1 Antikörpernachweis auf der Membran

10x TBS 1,5M NaCl; 0,5M Tris-HCl, pH 7,4

TBST 1x TBS; 0,1% Tween-20

Blocking-Puffer 5% Trockenmilch; 1x TBS; 0,1% Tween-20

4.4.9.3.2 Primärantikörper

Anti-Bves 1:200

Anti-Myc 1:1000

Anti-Flag 1:1000

Anti-Pop1 3F11 1:10 (Hybridoma-Überstand)

4.4.9.3.3 Sekundärantikörper

Anti-mouse/ goat HRP 1:1000

Die Membran wird für eine Stunde in Blocking-Puffer bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Darauf erfolgen mehrere Waschschrte: Es wird dreimal kurz und dreimal für 10 bis 15 Minuten mit TBST gewaschen. Die Inkubation der Membran mit dem ersten Antikörper in Blocking-Puffer erfolgt für eine Stunde bei Raumtemperatur in Parafilm, um

den Antikörperverbrauch möglichst gering zu halten. Nach Waschen der Membran, wie oben beschrieben, wird die Membran für eine Stunde mit dem zweiten Antikörper in Blocking-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert und danach wie oben gewaschen. Zur Detektion des Proteins werden ECL-Lösung 1 und 2 im Verhältnis 1:1 miteinander gemischt und für eine Minute auf die Membran gegeben. Danach wird die Membran in Frischhaltefolie eingewickelt und auf einem Röntgenfilm für 5 Sekunden bis zu einer Stunde je nach gewünschter Intensität der Banden exponiert.

4.4.9.4 Entwicklung von Filmen

Der Film wird für 10 Sekunden bis 2 Minuten im Entwickler entwickelt, 1 Minute in H₂O gespült und für 2 Minuten im Fixierer fixiert. Ein anschließender Spülschritt in H₂O entfernt den Fixierer.

4.5 Histologie

4 % Paraformaldehyd (Pfa) 4g Paraformaldehyd in 50ml sterilem H₂O unter Erwärmen lösen; 2 Tropfen 2M NaOH; 10ml 10x PBS; add. 100ml mit bidest. H₂O

10x PBS 80g NaCl; 2g KCl; 14,4g Na₂HPO₄ × 2H₂O; 2g KH₂PO₄; add. 1000 ml mit bidest. H₂O

1x PBS 100ml 1x PBS; 900ml bidest. H₂O

4.5.1 Präparation von Mäuseherzen und Sinusknoten

Den getöteten Mäusen wird nach Öffnen der Bauchdecke und Aufschneiden des Brustkorbes das Herz entnommen, indem dieses vorsichtig herausgeschnitten wird. Das Herz wird in PBS überführt und alle weiteren Schritte erfolgen in diesem Puffer. Es werden alle Gefäße bis auf die Aorta, die Vena cava superior sowie inferior und die Pulmonararterie entfernt. Das Herz wird von Fett befreit.

Soll der Sinusknoten präpariert werden, wird der gesamte Ventrikel entfernt. Anschließend werden die Aorta und die Pulmonararterie abgeschnitten. Das rechte Atrium wird parallel zur Christa terminalis abgeschnitten, das linke Atrium wird bis zum interatrialen Septum entfernt. Anschließend wird die Vena cava superior und die Vena cava inferior aufgeschnitten. Für

Gerierpräparate des Sinusknotens wird dieser dann vorsichtig mit Insektennadeln aufgespannt und anschließend wie unter 4.5.3 weiterbehandelt.

Für *whole mount* Färbungen wird der Sinusknoten in Methanol überführt und bei -20°C eingefroren (siehe 4.9).

4.5.2 Anfertigung von Gefrierpräparaten

Präparierte Sinusknoten und Herzen werden für 1,5 Stunden in 4% Pfa bei 4°C fixiert. Präparate, die auch LacZ gefärbt werden, werden nicht fixiert. Nach der Fixierung werden die Gewebe 3x in PBS gewaschen. Zur Kryoprotektion der Zellen wird das Gewebe mit 10%, 20% und 30% Saccharose in PBS bis zum Absenken des Gewebes bei 4°C infiltriert und anschließend in Einbettmedium für 15 Minuten inkubiert. Nach Ausrichten des Präparats wird es in Einbettmedium auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert.

4.5.3 Anfertigung von Gefrierschnitten

Gefrierschnitte vom SAN werden senkrecht zur Christa Terminalis geschnitten. Jeder 10 Schnitt wird separat auf einem Objektträger für die Acetylcholinesterase-Färbung gesammelt, die anderen Schnitte werden konsekutiv auf 3 Objektträgern aufgenommen. Herzgewebe wird longitudinal oder transversal geschnitten. Die Schnittdicke beträgt $10\mu\text{m}$. Nach dem Schneiden werden die Objektträger bei -80°C gelagert.

4.5.4 LacZ-Färbung

Fixierungslösung	0,2% Glutaraldehyd; 5mM EGTA; 2mM MgCl_2 in PBS
Waschlösung	0,01% Natriumdesoxycholat; 0,02% NP-40; 5mM EGTA; 2mM MgCl_2 in PBS
Färbelösung	5mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; 5mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 1 mg/ml X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-2-D-galactopyranoside); in Waschlösung

Schnitte bzw. Gewebe werden 3x mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgt mit Fixierungslösung für 10 Minuten auf Objektträgern und für 1 Stunde für ungeschnittenes Gewebe. Nach der Fixierung wird 3x für 5 Minuten mit Waschlösung gewaschen, bevor die

Objekte bei 37°C über Nacht mit Färbelösung inkubiert werden. Nach dem Färben werden die Objekte 3x mit PBS gewaschen und mit 4% Pfa postfixiert. Schnitte werden mit Roti-Histokit eingedeckelt (siehe 4.5.6.).

4.5.5 Acetylcholinesterase-Färbung

Färbelösung 65mM Natriumacetat, pH 6; 0,5mg/ml Acetylcholin Iodid;
 0,5mM $K_3[Fe(CN)_6]$; 0,3M $CuSO_4$;
 5mM Tri-Natriumcitrat

Schnitte werden für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wird 3x mit PBS gewaschen. Schnitte werden mit Entellan eingedeckelt 4.5.6.

4.5.6 Eindeckeln von Objektträgern

Die Objektträger werden jeweils einmal für 2 Minuten in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30, 50, 70, 80, 90 und 95%) und zweimal in 100% Ethanol dehydriert.

Um mit Roti-Histokit einzudeckeln werden die Objektträger anschließend zweimal für 2 Minuten mit Isopropanol und einmal für mindestens 2 Minuten mit Roti-Histol behandelt, bevor sie mit Roti-Histokit eingedeckelt werden.

Für das Eindeckeln mit Entellan müssen die Objektträger vorher zweimal für mindestens 2 Minuten mit Xylol gewaschen werden.

4.6 Antikörperfärbungen auf Gefrierschnitten

PBS-T 0,1% Triton in PBS

Blockierungslösung 0,15% BSA in PBS-T

Die Lösungen werden alle mit Ampuwa-Wasser hergestellt

4.6.1 Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten

10x TBS	1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl, pH 7,6
TBS	100 ml 10x TBS add. 1000 ml
Substratlösung	1 Tablette DAB in 15 ml TBS lösen, kurz vor Gebrauch 12 µl 30%iges H ₂ O ₂ hinzufügen

Die Schnitte werden nach dem Auftauen mit einem Fettstift umrandet, damit der Antikörperverbrauch möglichst gering gehalten wird. Zum Abwaschen des Einbettmediums werden die Schnitte 3x für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Es folgt eine Fixierung mit 4% Pfa für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach dreimaligen Waschen mit PBS werden die Schnitte für 10 Minuten mit 0,3% H₂O₂ in PBS inkubiert, um die endogene Peroxidase zu inaktivieren. Nach einem Waschschrift mit PBS-T erfolgt eine 30minütige Inkubation mit Blockierungslösung. Der erste Antikörper (anti-Bves) wird 1 zu 50 in Blockierungslösung verdünnt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgt in einer feuchten Kammer. Der Primärantikörper wird durch 3maliges Waschen mit PBS-T entfernt. Es folgt die Inkubation des 1:200 verdünnten Sekundärantikörpers (anti-goat HRP) für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungslösung in der feuchten Kammer. Danach werden die Schnitte 3x mit PBS und 1x mit TBS für jeweils 5 Minuten gewaschen. Nach Zugabe der Substratlösung wird die Entwicklung des braunen Niederschlages mikroskopisch verfolgt. Hat die Färbung die gewünschte Intensität, wird durch waschen mit PBS die Farbreaktion gestoppt. Die Objektträger werden mit Mowiol eingedeckelt.

4.6.2 Immunfluoreszenz

4.6.2.1 Antikörperverdünnungen

4.6.2.1.1 Primärantikörper

Bves	1:50
Ca _v 1.2	1:50
Caveolin3	1:50
Cx40	1:100
Cx43	1:100
Flag	1:200
Glattmuskelaktin	1:100
HCN4	1:100-1:400
Myc	1:200
NCX1	1:200
TREK1	1:50
α -sarkomerisches Aktinin	1:800

4.6.2.1.2 Sekundärantikörper

Alexa Fluor Antikörper	1:200
Anti-mouse Fab FITC	1:50
WGA-FITC	5 μ g/ml

4.6.2.2 Immunfluoreszenz auf Gefrierschnitten und isolierten kardialen Myozyten mit Primärantikörpern aus verschiedenen Spezies

Die Schnitte werden wie unter 4.6.1 mit einem Fettstift umrandet, mit PBS gewaschen, für 10 Minuten mit 4% Pfa fixiert und nochmals mit PBS gewaschen. Die ausplattierten kardialen Myozyten werden, da sie schon fixiert sind, nur 3x mit PBS gewaschen. Danach werden die Schnitte und die Kardiomyozyten 1x mit PBS-T gewaschen und anschließend für 30 Minuten bis zu einer Stunde in Blockierungslösung belassen. Die Primärantikörper werden für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in Blockierungslösung in einer feuchten Kammer inkubiert. Werden Doppelfärbungen durchgeführt, werden die beiden Primärantikörper gleichzeitig inkubiert. Danach werden wie oben die Primärantikörper durch 3maliges Waschen mit PBS-T entfernt. Es folgt die Inkubation der verdünnten

4.9.1 Antikörper

4.9.1.1 Primärantikörper

HCN4 1:200

4.9.1.2 Sekundärantikörper

Ziege anti-Kaninchen 1:200

AlexaFluor488

Die Sinusknoten werden 3x mit PBS und 1x mit PBS-T gewaschen, bevor sie mit Methanol fixiert werden. Dazu werden die Sinusknotenpräparationen für 10 Minuten in 50% Methanol in PBS-T inkubiert und anschließend in Methanol über Nacht bei 4°C fixiert. Danach kann das Gewebe bei -20°C gelagert werden. Das Gewebe wird für 2 Stunden in 4:1 in Methanol:30% H₂O₂ inkubiert. Es folgt eine Inkubation für 10 Minuten in 50% Methanol in PBS-T und 3maliges Waschen mit PBS-T à 5 Minuten. Nach Blocken von 2x 1 Stunde mit Blockierungslösung wird das Gewebe mit erstem Antikörper in Blockierungslösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgen, wenn nicht anders angegeben bei 4°C. Die Sinusknoten werden 3x für 5 Minuten und 5x für 1 Stunde in PBS-T gewaschen. Es folgt die zweite Antikörperinkubation in Blockierungslösung über Nacht in einer dunklen Kammer. Danach wird 3x mit PBS-T à 5 Minuten und 4x für 20 Minuten mit PBS-T gewaschen. Anschließend erfolgt eine Inkubation mit DAPI 1:1000 in PBS-T für 5 Minuten. Die Sinusknotenpräparationen werden flach mit der Außenseite nach oben in einen vertieften Objektträger mit Mowiol eingedeckelt.

4.10 3D-Rekonstruktion

4.10.1 3D-Rekonstruktion von Schnitten des Sinusknotens

Für die 3D-Rekonstruktion des Sinusknotens wird jeder 3. Schnitt fluoreszenzgefärbt und eine Ebene jeden Schnittes im konfokalen Mikroskop gescannt. Insgesamt werden 48 Schnitte aufgenommen und mit Hilfe der AMIRA 3.1.1-Software zu einem 3D-Modell zusammengesetzt. Dazu werden nach dem Einladen der Schnitte in das Programm die Voxel x Voxel x Voxel auf 1 x 1 x 30 gesetzt, da jeder Schnitt 10 µm dick ist und nur jeder 3. Schnitt verwendet wurde, so dass der gesamte nicht eingescannte Bereich in die Berechnung des Volumens mit einbezogen wird. Die Auflösung wird auf 200 x 200 x Anzahl der Aufnahmen

reduziert (resampling) und die Bilder mit Hilfe des Markierungsfeldes (label field) aufeinander ausgerichtet. Die gefärbten Areale werden mit Hilfe der label/voxel-Funktion des Programms markiert und das Volumen der markierten Flächen mittels der Gewebestatistik (tissue statistic) berechnet. Aus den markierten Flächen wird nun eine aus Polygonen bestehende Oberfläche generiert (surface modul), welches das 3D-Modell darstellt. Zur Berechnung der Oberfläche wird das surface modul ohne Glättung hergestellt und die Oberfläche über die Funktion „surface area“ berechnet.

4.10.2 3D-Rekonstruktion des *whole mount*- gefärbten Sinusknotens

Für die 3D-Rekonstruktion des *whole mount*- gefärbten Sinusknotens wird von diesem Stacks am konfokalen Mikroskop hergestellt, wobei jede 1,5µm eine Ebene aufgenommen wird. Es wird mit 800 Hz und einem Zoom von 1,7x gescannt. Um die Stacks 3D zu modellieren, werden diese in das AMIRA 3.1.1. Programm eingeladen und die Voxel x Voxel x Voxel auf 1,7 x 1,7 x 1,5 gesetzt. Die gefärbten Areale werden mit Hilfe des Markierungsfeldes und mit Hilfe der label/voxel-Funktion des Programms mit der Untereinstellung subvoxel accuracy markiert. Nach manuellem Entfernen der überlappenden Markierung, die durch die Aufnahme der verschiedenen Regionen des Sinusknoten entstehen, wird das Volumen der markierten Flächen mittels der Gewebestatistik (tissue statistic) berechnet. Aus den markierten Flächen wird nun über „surface gen“ mit der Unterfunktion „existing weights“ wiederum eine aus Polygonen bestehende Oberfläche generiert (surface modul), welches das 3D-Modell darstellt. Die Oberfläche wird anschließend über die Funktion „surface area“ berechnet.

4.11 Student's t-test

Für die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde die graphpad Software (<http://www.graphpad.com>) oder das Computerprogramm Microsoft Excel nach (Millar, 2001) verwendet.

4.12 Elektrophysiologische Messungen

4.12.1 Elektrophysiologische Messungen in Froschoozyten

ND96 Lösung 96mM NaCl; 2mM KCl; 1mM MgCl₂; 1mM CaCl₂;
5mM Hepes, pH 7.4–7.5

Die elektrophysiologischen Messungen in Oozyten aus *Xenopus laevis* wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Erhard Wischmeyer, Lehrstuhl II des Physiologischen Instituts in Würzburg, durchgeführt.

Die Oozyten werden mit cRNA für den humanen TREK1-Kanal, den humanen β_1 -adrenergen Rezeptor sowie Maus-Popdc1, Popdc2 oder Popdc3 und die Popdc1-D200A-Mutante injiziert. Zur Kontrolle werden die Oozyten mit TREK1, β_1 -adrenergen Rezeptor und Wasser injiziert. Als Expressionsvektor der Popdc-Transkripte dient der Vektor pSGEM. Nach Injektion werden die Oozyten für 48 Stunden in ND96-Lösung, 100 μ g/ml Gentamicin und 2,5mM Natriumpyruvat inkubiert und anschließend mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme elektrophysiologisch untersucht. Für einen schnellen Austausch der externen Lösung werden die Oozyten in eine kleinvolumige Perfusionskammer mit einem konstanten Fluss an ND96-Lösung oder „high K⁺-Lösung“ platziert. Als Verstärker dient ein TURBO TEC-10 C Verstärker (npi, Tamm, Deutschland). Die Messdaten werden mithilfe der PULSE/PULSEFIT Software (Heka) von einem EPC9 (Heka Electronics, Lamprecht, Deutschland) gesammelt. Mit Hilfe der IGOR Software (WaveMetrics, Lake Oswego, USA) erfolgt die Datenanalyse. Zur statistischen Analyse wird das Stat/Statview Softwareprogramm verwendet und der Student's T-Test wird angewandt um signifikante Unterschiede aufzuzeigen

4.12.2 Elektrophysiologische Messungen an Mäusen

Die elektrophysiologischen Messungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Larissa Fabritz, Medizinische Klinik C - Kardiologie und Angiologie, Universitätsklinikum Münster, durchgeführt

4.12.2.1 Echokardiographie

Um die kardiale Größe, Morphologie und Funktion zu messen, wurden Zwei-Dimensionale echokardiographische und Doppler-Messungen unter Isofluranbetäubung und Benutzung von 13,5 MHz im D und M Modus sowie 12 MHz Dopplerwandler (HP Sonos) und einer kleinen

tierischen Ultraschallplattform (VEVO770), die mit einem 50 MHz- Wandler ausgestattet ist, durchgeführt. Die Messungen wurden unter Grundbedingungen und nach intraperitonealer Injektion von 2 mg Isoproterenol pro kg Körpergewicht durchgeführt.

4.12.2.2 EKG und Telemetrie

Oberflächen Elektrokardiogramme (EKGs) mit 6 Ableitungen wurden von Wurfgeschwisterpaaren während Isofluraninhalierung (1-1,5% mit Sauerstoff) aufgenommen. Zur Signalmittelung wurden 10 Sekunden aufgenommen. Um EKGs von sich frei-bewegenden Tieren zu messen, wurde ein telemetrischer EKG-Transmitter (DSI, St. Paul, MN) implantiert. Analysen von Langzeit-EKGs wurden unter normaler Aktivität im Standardlaborkäfig über 24 Stunden und während definierten Stresses, wie Schwimmen oder warmer Luftstrom durchgeführt. Um mögliche chronotrope Inkompetenzen zu demaskieren wurden kein unterbrochener Stress aber dafür 6minütig andauernder Stress mittels warmen Luftstrom zugeführt. Die Aufnahmen wurden bei 2 kHz digitalisiert (EMKA, Falls Church, VA) und offline analysiert.

4.12.2.3 Elektrophysiologische Studien am isolierten Herzen

Um intrinsische Herzraten und -pausen zu erhalten, wurden die Herzen von 8 Monate alten Mäusen schnell herausgeschnitten und mit einer warmen, oxygenierten modifizierten Krebs-Henseleit Lösung an einer vertikalen Langendorff-Apparatur durchblutet (Harzheim et al., 2008; Knollmann et al., 2003). Atriale und ventrikuläre monophasische Aktionspotentiale, Elektrogrammen und Gewebepad-EKGs wurden simultan während spontanem Rhythmus unter Grundbedingungen und während einer Perfusion mit 1,7 μ M Orciprenalin aufgenommen (Kuhlmann et al., 2006). Die originalen Aufnahmen wurden manuell auf Pausen geprüft. Die Herzraten wurden manuell bei 15 Schlägen und semiautomatisch bei mehreren Minuten analysiert. Die AV-Knotenreizleitung wurde semi-automatisch mittels anwendungsspezifischer Software (LabVIEW und EMKA) gemessen. 2:1 sinoatrialer Block wurde definiert nach folgenden akzeptierten vorfestgelegten klinischen Kriterien, z.B. einen plötzlichen zweifachen Zunahme des PP- Intervalls. Bei den Analysen war der Genotyp nicht bekannt. Sinuspausen wurden definiert als plötzliche Zunahme des PP- Intervalls um mehr als 60% des 0,9 Quantils der durchschnittlichen Herzrate in einem gegeben Protokoll.

5 Ergebnisse

5.1 Die *Popdc1*-Maus

5.1.1 Der Phänotyp der *Popdc1*-Mäuse

Popdc2-Mäuse zeigen einen altersabhängigen Rhythmusphänotyp. Langzeit-EKGs von 8 Monate alten Mäusen weisen eine stressinduzierte Sinusbradykardie auf, die auf eine erhöhte Anzahl von Sinuspausen zurückzuführen ist. Dieser Rhythmusphänotyp tritt erstmals mit ca. 5½ Monaten auf und ist bei Mäusen im Alter von 3 Monaten noch nicht feststellbar (Froese et al., eingereicht). Die neuesten Befunde von sehr alten *Popdc2*-Mäusen (≥ 16 Monate) deuten auch auf einen stressinduzierten AV-Block und ventrikuläre Fibrillation hin (Zusammenarbeit mit der AG Sebastian Maier, Medizinische Klinik I der Universität Würzburg). Diese Daten weisen auf einen progressiven Verlust der Funktionsfähigkeit des kardialen Reizleitungssystems in der Stressadaptation hin. Der Pacemaker im Sinusknoten verliert zuerst seine Funktionsfähigkeit und danach treten in sehr alten Mäusen Defekte im AV-Knoten und im ventrikulären Reizleitungssystem auf. Die Altersabhängigkeit der kardialen Phänotypen lässt vermuten, dass es einen kompensatorischen Mechanismus in jungen Tieren gibt. Da die *Popdc*-Genfamilie stark überlappende Expressionsmuster aufweisen, ist es eine attraktive Hypothese, dass die einzelnen Mitglieder der Genfamilie sich funktionell kompensieren können. Aus diesem Grund war es von Interesse, auch die *Popdc1*-Mäuse elektrophysiologisch zu charakterisieren. Bislang wurden in diesen Mäusen nur ein Defekt in der Regenerationsfähigkeit der Skelettmuskulatur beschrieben (Andrée et al. 2002), während kardiale Defekte bislang unbekannt sind. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden dazu C57Bl6/J Wildtypmäuse zur Kontrolle bzw. homozygote *Popdc1*-Nullmutanten (im Weiteren als *Popdc1*-Mäuse bezeichnet) verwendet, in denen das erste Exon durch eine *LacZ-neo*-Kassette ausgetauscht wurde (Andrée et al., 2002). Um den kardialen Phänotyp der *Popdc1*-Mäuse zu untersuchen, wurde das Körper- und Herzgewicht bestimmt, sowie in Zusammenarbeit mit Dr. Larissa Fabritz, Universitätsklinikum Münster elektrophysiologische Messungen an diesen Tieren durchgeführt.

5.1.2 *Popdc1*-Mäuse zeigen ein geringeres Körper- und Herzgewicht

Von den *Popdc2*-Mäusen ist bekannt, dass diese ein verringertes Gewicht gegenüber den Wildtypmäusen aufweisen, während die Herzgewichte beider Genotypen sich recht ähnlich sind (Froese, Doktorarbeit, 2007). Es sollte nun überprüft werden, ob die Körper- und Herzgewichte der *Popdc1*-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp auch verschieden sind.

Rein äußerlich unterschieden sich ältere *Popdc1*-Mäuse von Wildtypmäusen durch ihre Größe und ihren Körpervolumen. So waren 8 Monate alte männliche und weibliche homozygote Mäuse wesentlich dünner und hatten einen geringeren Maß an Bauchfett im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Abb. 5-1 A-D).

Das Körpergewicht der männlichen homozygoten Tiere war 62% des Gewichts der Wildtypmännchen (Abb. 5-1 E). In Absolutzahlen beträgt der Mittelwert des Körpergewichts von Wildtypmäusen 41,8g und der von homozygoten Mäusen bei 26,13g. Das Herzgewicht dieser Mäuse war um 10% niedriger (der Mittelwert des Herzgewichts von Wildtypmäusen und homozygoten Mäusen beträgt 182,1mg bzw. 163,3mg; Abb. 5-1 G). Dies resultiert in einem 43% erhöhten Herz- zu Körpergewichtsquotienten der homozygoten *Popdc1*-Mäuse (4,40mg/g (Wildtyp) und 6,32mg/g (homozygote Mutanten); Abb. 5-1 I). Das Körpergewicht der 8 Monate alten homozygoten Weibchen war nicht so stark reduziert wie das der männlichen *Popdc1*-Mäuse und betrug 73% des Wildtypgewichts (30g (WT) vs. 22g (*Popdc1*); Abb. 5-1 F). Das Herzgewicht der weiblichen *Popdc1*-Mäuse war wie das Herzgewicht der Männchen um ca. 10% reduziert (146,9mg (WT) vs. 131,7mg (*Popdc1*); Abb. 5-1H). Der Quotient von Herz- zu Körpergewicht war bei den weiblichen *Popdc1*-Mäusen um 20% von 5,0 auf 6,0 mg/g erhöht (Abb. 5-1 J). In beiden Geschlechtern war der Unterschied im Körpergewicht also wesentlich größer als im Herzgewicht. Erhöhte Herz- zu Körpergewichtsquotienten sind ein Hinweis auf pathologische Veränderungen im Herzen. Allerdings ist aufgrund der gleichzeitigen niedrigeren Körpergewichte die Interpretation dieser Befunde schwierig. Es wurden an den Tieren aber auch funktionelle Analysen mittels Echokardiographie durchgeführt, die den Schluss zulassen, dass die Herzen keine Hinweise auf eine Veränderung in der Verkürzungsgeschwindigkeit oder in der Herzarbeit aufweisen. Weitere Untersuchungen zur Herzpathologie sind hier aber notwendig.

5. Ergebnisse

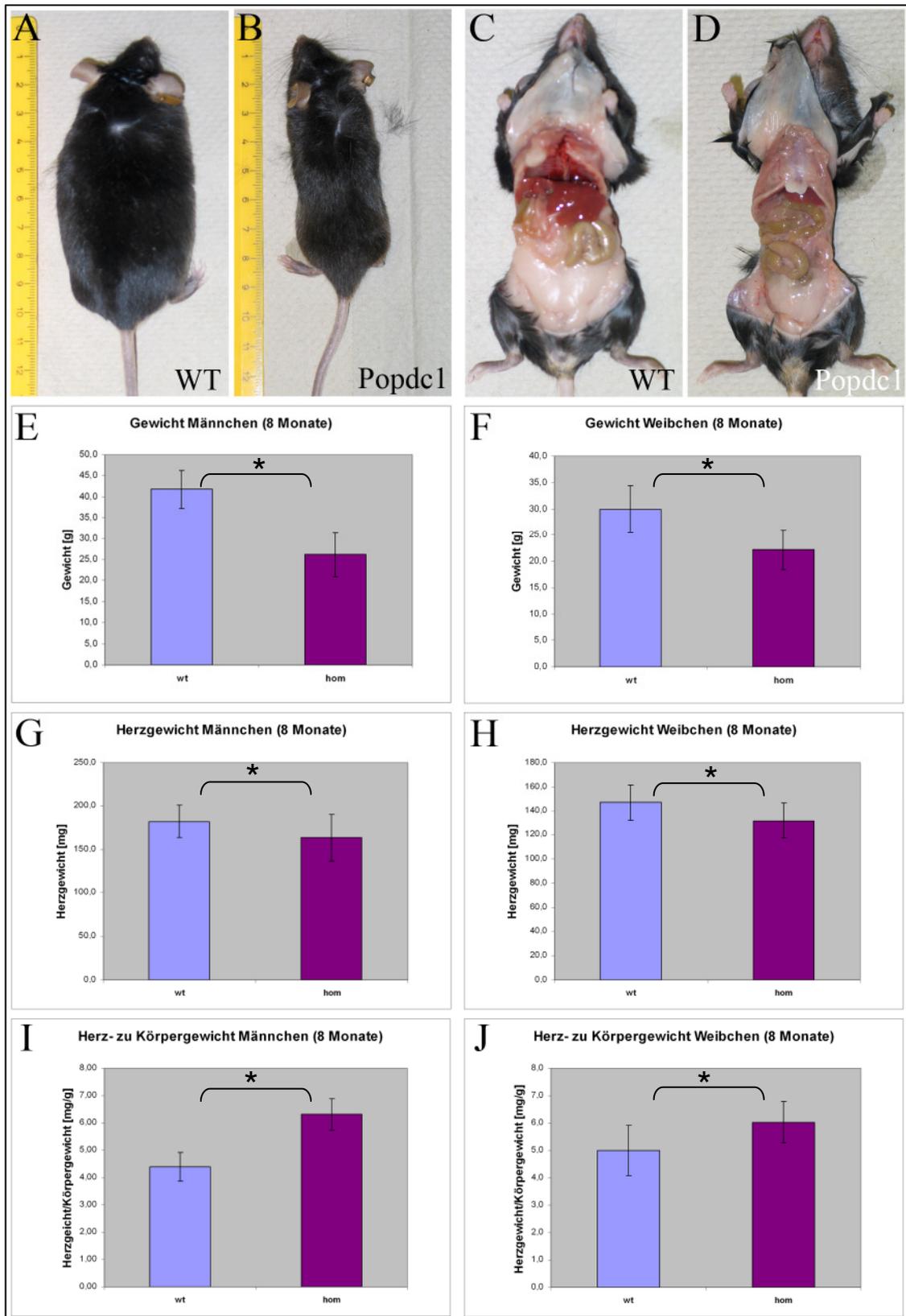


Abb. 5-1: Vergleich von Körpergewicht, Herzgewicht und Herz- zu Körpergewicht von *Popdc1* und Wildtypmäusen

Habitus von (A) Wildtyp und (B) *Popdc1*-Mäusen. Der Fettgewebeanteil ist in *Popdc1*- (D) im Vergleich zu Wildtypgeschwistern (C) deutlich reduziert. Statistisch signifikante Unterschiede im Körpergewicht liegen zwischen Wildtyp- und *Popdc1*-Mäusen vor (E,F). Die Herzgewichte von männlichen und weiblichen *Popdc1*-Mäusen sind geringfügig aber statistisch signifikant reduziert (G,H), während der Quotient aus Herz- und Körpergewicht bei männlichen und weiblichen *Popdc1*-Mäusen vergrößert ist (I,J). * $p < 0,05$, $n \geq 14$

5.1.3 *Popdc1*-Mäuse zeigen eine geringere Herzrate nach Stressinduktion

Wie oben schon erwähnt zeigen die *Popdc2*-Mäuse einen stressinduzierten kardialen Phänotyp. In Zusammenarbeit mit Dr. Larissa Fabritz, Universitätsklinikum Münster wurde untersucht, ob *Popdc1*-Mäuse elektrophysiologische Defekte aufweisen. Es wurden dazu Messungen der Herzfrequenz unter basalen Bedingungen und unter Stress durchgeführt.

Langzeit-EKGs über 24h von 8 Monate alten Mäusen unter Ruhe und Stress zeigten, dass Wildtyp- und *Popdc1*-Mäuse unter Kontrollbedingungen keine signifikanten Unterschiede in der Herzrate aufwiesen. Allerdings war der Anstieg der Herzrate bei *Popdc1*-Mäusen unter mentalem Stress (heißer Luftstrom) signifikant geringer als in Wildtypmäusen (Abb. 5-2 A). EKGs von anästhesierten Mäusen zeigten, dass die *Popdc1*-Mäuse auch einen gegenüber Wildtypmäusen verringerten Anstieg der Herzrate nach β -adrenerger Stimulation durch Isoproterenol aufwiesen (Abb. 5-2 B).

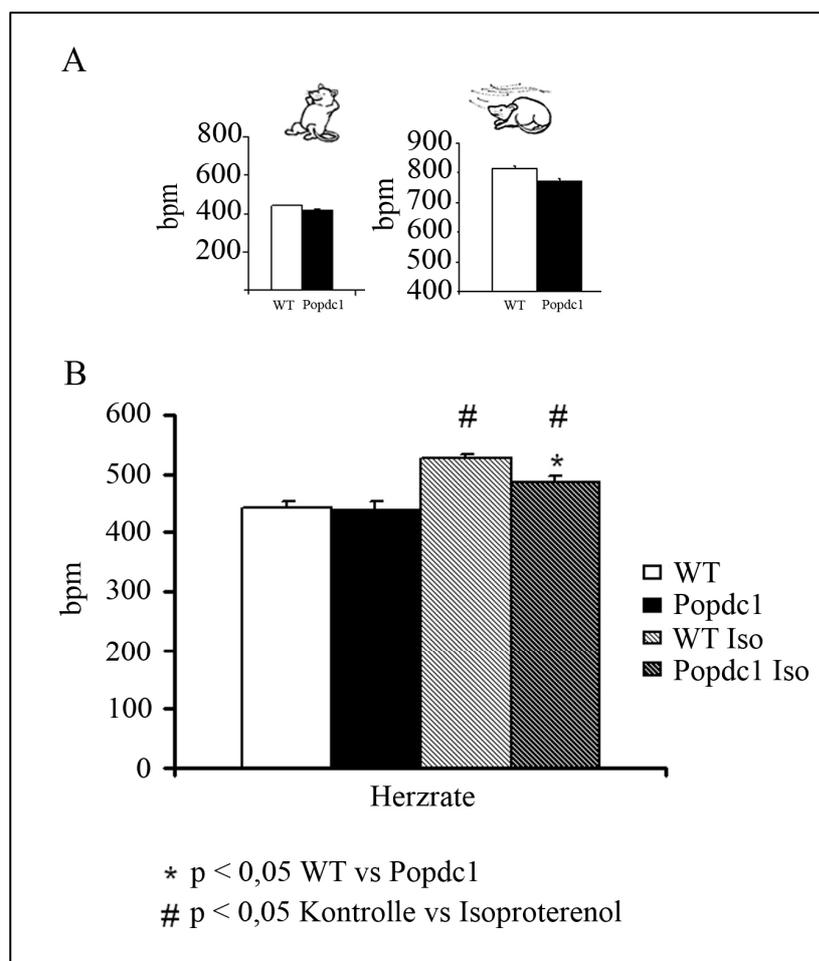


Abb. 5-2: Funktionelle Analyse der Herzraten von *Popdc1*- und Wildtypmäusen

(A) Die Herzrate während Stressbedingungen ist bei *Popdc1*-Mäusen verringert. (B) Nach β -adrenerger Stimulation mit 2mg Isoproterenol/kg Körpergewicht erhöht sich die Herzrate der *Popdc1*-Mäuse von 440 \pm 13 bpm im Ruhezustand (unter 1,5% Isofluran- und Sauerstoffeinwirkung) auf 485 \pm 12 bpm nach β -adrenerger Stimulation während die Herzrate der Wildtypmäuse sich von 442 \pm 13 bpm auf 526 \pm 8 bpm erhöht. (bpm: beats per minute (Schläge pro Minute))

5.1.4 *Popdc1*-Mäuse zeigen nur eine Veränderung in der Herzrate

Um die Herzgröße, Morphologie und Funktion zu messen, wurden zwei-dimensionale echokardiographische Messungen und Doppler-Messungen unter Isofluranbetäubung durchgeführt. Es zeigte sich, dass unter Grundbedingungen die linksventrikuläre Ejektionszeit (LVET) bei beiden Genotypen gleich waren. Nach β -adrenerger Stimulation durch Isoproterenolinjektion fiel der Wert bei beiden Mausgenotypen signifikant ab. Die Wildtypmäuse zeigten einen signifikanten geringeren Wert als die *Popdc1*-Mäuse (Abb. 5-3 A und B), was bedeutet, dass die linksventrikuläre Ejektionszeit gegenüber dem Wildtyp nach β -adrenerger Stimulation etwas verlängert war. Die maximale Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe (AoVmax) war unter Kontrollbedingungen bei den *Popdc1*- Mäusen gegenüber den Wildtypmäusen erhöht. Nach β -adrenerger Stimulation durch Isoproterenolinjektion war AoVmax in den Kontrollmäusen signifikant erhöht. Dieser Wert war auch bei den *Popdc1*-Mäusen erhöht, diese Erhöhung war nicht signifikant und zeigte aber einen signifikant geringeren Wert gegenüber den Wildtypmäusen auf (Abb. 5-3 A und B). D.h. unter Stressbedingungen erhöhte sich AoVmax bei den *Popdc1*-Mäusen nicht aber die linksventrikuläre Ejektionszeit war verlängert. Dies lässt sich vielleicht damit erklären, dass die *Popdc1*-Mäuse eine stressinduzierte Erniedrigung der Herzfrequenz zeigten und bei einer niedrigeren Herzfrequenz die Auswurfzeit des Blutes aus dem Ventrikel verlängert ist und das Blut langsamer fließt.

Doppler-Messungen zeigten außerdem, dass die RR-Intervalle unter Grundbedingungen wie nach β -adrenerger Stimulation in den *Popdc1*- Mäusen etwas verlängert waren und sich diese in den *Popdc1*-Mäusen nach β -adrenerger Stimulation weniger verringerten als in den Wildtypmäusen (Abb. 5-3 B). Die fraktionale Verkürzung des linken Ventrikels (LVFS) und linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) zeigten auch nach β -adrenerger Stimulation keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und *Popdc1*-Mäusen auf (Abb. 5-3 C). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass hauptsächlich nur Herzratenparameter in den *Popdc1*-Mäusen nach β -adrenerger Stimulation beeinflusst wurden.

5. Ergebnisse

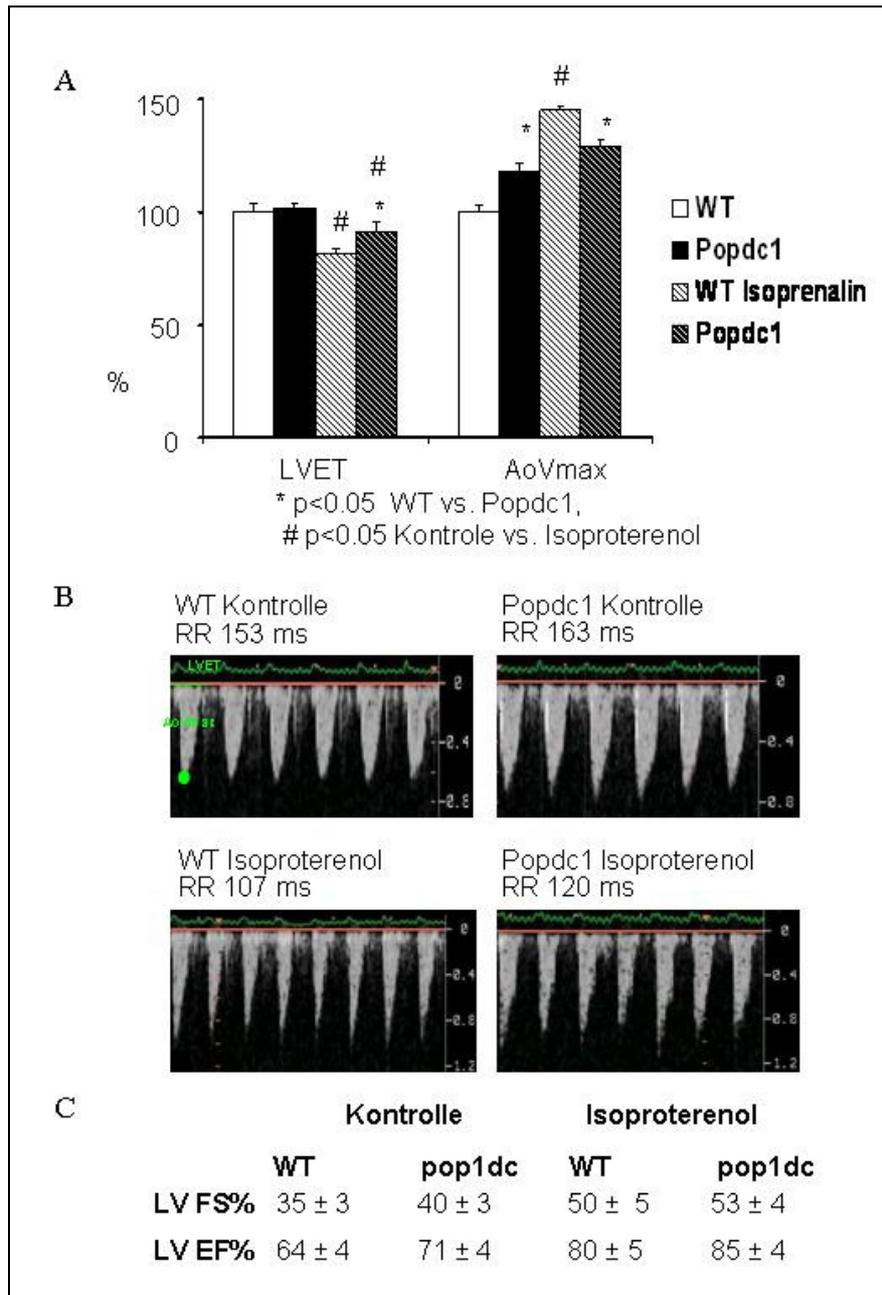


Abb. 5-3: Doppler-Messungen an *Popdc1*- und Wildtypmäusen

(A) Der LVET-Wert der *Popdc1*-Maus nach β -adrenerger Stimulation ist gegenüber dem Wildtyp erhöht und fällt signifikant gegenüber Kontrollbedingungen ab, während AoVmax nicht signifikant bei den *Popdc1*-Mäusen nach β -adrenerger Stimulation wie bei den Kontrollmäusen steigt. (B) Aufzeichnungen von Doppler-Messungen zeigen, dass sich das RR-Intervall bei den *Popdc1*-Mäusen nach β -adrenerger Stimulation von 163 ms auf 120 ms verringerte, das der Wildtypmäuse verringert sich von 153 ms auf 107 ms. (C) Der LVFS- und der LVEF-Wert zeigen keine signifikanten Unterschiede unter Grundbedingungen und nach β -adrenerger Stimulation zwischen Wildtyp und *Popdc1*-Maus.

5.1.5 Der stressinduzierte Phänotyp in den *Popdc1*-Mäusen ist altersabhängig

Der stressinduzierte Phänotyp in den *Popdc1*-Mäusen war altersabhängig. So konnte in 3 Monate alten Wildtyp- und homozygoten *Popdc1*-Mäusen, denen ein Holter-EKG implantiert wurde, unter verschiedenen Stressbedingungen wie Schwimmen (Abb. 5-4 A), warmer Luftstrom (Abb. 5-4 B) und β -adrenerger Stimulation (Abb. 5-4 C) kaum ein Unterschied in der Herzrate festgestellt werden. Erst mit 5,5 Monaten konnte ein reduzierter Anstieg der Herzrate nach Stressapplikation in den *Popdc1*-Mäusen nachgewiesen werden. Dieser Effekt war mit 8 Monaten voll ausgebildet (Abb. 5-4 A-C). So lag die durchschnittliche Herzrate während Schwimmstress bei 701 ± 16 bpm in WT- und bei 593 ± 39 bpm in *Popdc1*-Mäusen, während sie bei Stress durch warmen Luftstrom bei 684 ± 23 bpm in WT- and 614 ± 25 bpm in *Popdc1*-Mäusen lag. Dieser altersabhängige Phänotyp ließ sich auf Sinuspausen zurückführen, die bis zum Alter von 8 Monaten in den *Popdc1*-Mäusen stark zunahmen. Die EKGs von Wildtyp- und *Popdc1*-Mäusen wurden 30 Minuten lang nach 6-minütigem Schwimmstress gemessen und zeigten, dass die Anzahl der Sinuspausen mit zunehmendem Alter signifikant zunahm (Abb. 5-4 E). Die durchschnittliche Anzahl an Sinuspausen in 8 Monate alten Mäusen lag bei *Popdc1*-Mäusen bei 581 ± 300 während Wildtypmäuse nur 4 ± 2 Sinuspausen aufwiesen. Die Beispiel-EKGs von 8 Monaten alten Wildtyp- und *Popdc1*-Mäusen, welche während der ersten Minute nach 6minütigem Schwimmstress aufgenommen wurden, zeigen, dass das Herz der Wildtypmaus gleichmäßig schlug, während die *Popdc1*-Maus einen ungleichmäßigen Herzschlag aufwies. Dieser ungleichmäßige Herzschlag war auf Sinuspausen zurückzuführen, die durch die verlängerten PP-Intervalle aufgezeigt wurden (Abb. 5-4 D).

5. Ergebnisse

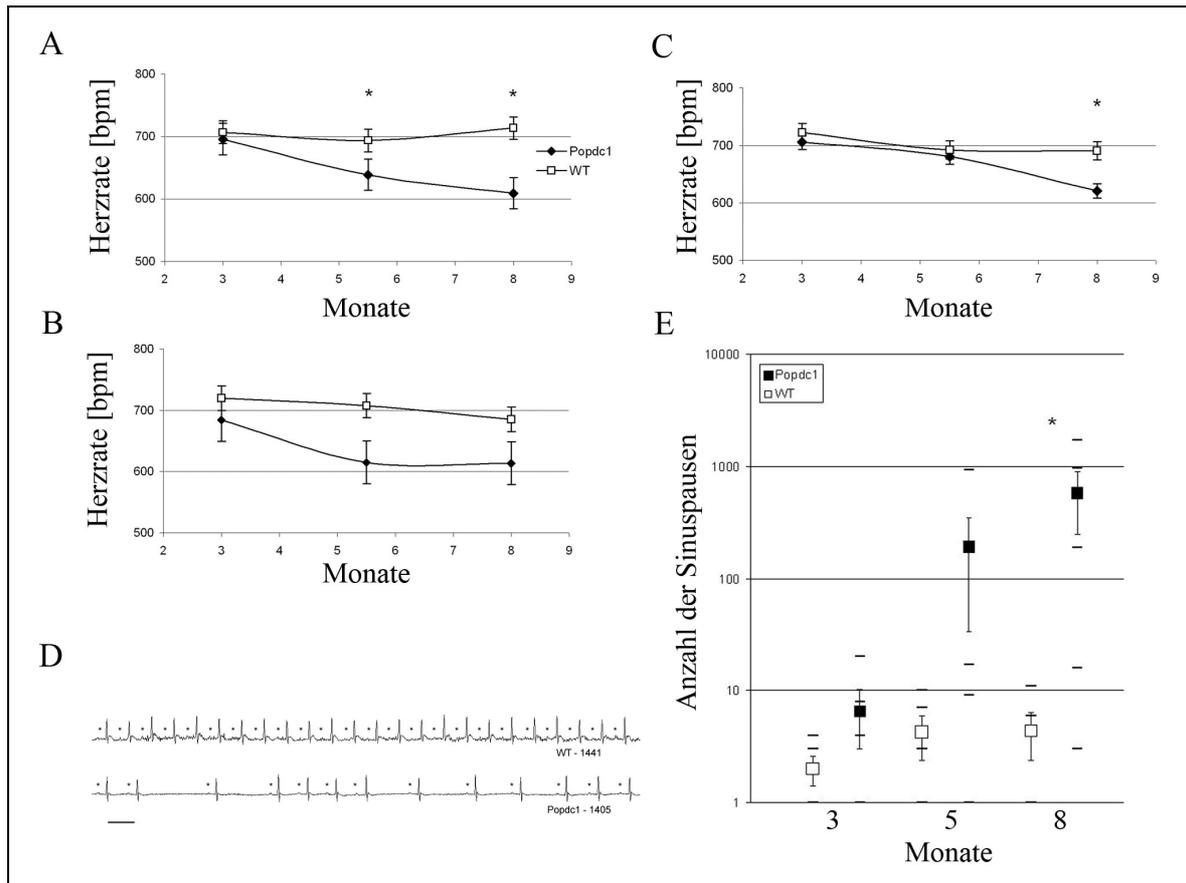


Abb. 5-4: Die Altersabhängigkeit des stressinduzierten Phänotyps sowie die altersabhängige Zunahme von Sinuspausen in *Popdc1*-Mäusen

Im Stress wie in (A) Schwimmstress, in (B) Luftstromstress oder in (C) nach β -adrenerger Stimulation verringert sich die Herzrate der 8 Monate alten *Popdc1*-Mäuse signifikant. Diese Verringerung ist erstmals in 5,5 Monate alten *Popdc1*-Mäusen sichtbar und zeigt sich noch nicht in 3 Monate alten Tieren. (D) Das EKG einer 8 Monate alten *Popdc1*-Maus zeigt einen ungleichmäßigen Herzschlag (unten) im Gegensatz zur Wildtypmaus. Dieser ist auf Sinuspausen zurückzuführen. Die PP-Intervalle sind mit einem kleinen Stern markiert. (E) Die Anzahl der Sinuspausen 30 Minuten nach Schwimmstress steigt mit zunehmenden Alter der *Popdc1*-Mäuse stark an. * $p < 0,05$ WT vs *Popdc1*

5.1.6 Zwischen *Popdc1*- und Wildtypmäusen gibt es keinen Unterschied in den PQ-Intervallen

Es wurden auch die PQ-Intervalle bei Herzraten von 600, 450 und 150 Schlägen pro Minute während des Schwimmens getestet. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den PQ-Intervallen, die bei Verlängerung auf einen AV-Block hinweisen würden. Zu bemerken ist aber, dass bei den *Popdc1*-Mäusen Herzraten von 150 Schlägen pro Minute vorkommen. Diese niedrige Herzfrequenz war bei Wildtypmäusen nicht detektierbar (Abb. 5-5).

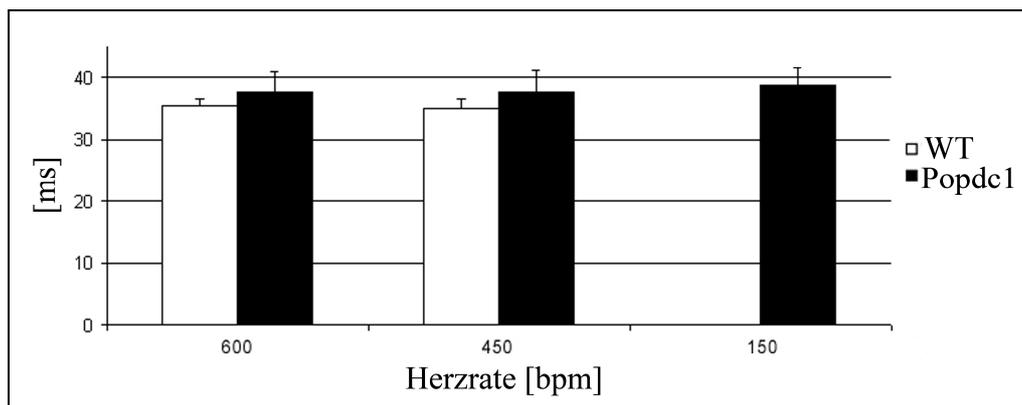


Abb. 5-5: Dauer der PQ-Intervalle während des Schwimmens bei Wildtyp- und *Popdc1*-Mäusen.

Die Dauer des PQ-Intervalls wurden bei 600, 450 und 150 Schlägen pro Minute gemessen. Bei den hohen Herzraten sind keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und *Popdc1*-Mäusen festzustellen. 150 Schläge pro Minute konnten nur bei den *Popdc1*-Mäusen gemessen werden.

5.1.7 Elektrophysiologische Untersuchungen an isolierten Herzen

Isolierte schlagende Herzen zeigten eine verlängerte atriale Zykluslänge für *Popdc1*-Mäuse (*Popdc1*: 170 ± 33 ms; WT: 96 ± 4 ms). Die Herzen der *Popdc1*-Mäuse zeigten einen erhöhten Wenckebachpunkt gegenüber denen der Wildtypmäuse, was eine veränderte anterograde Erregungsleitung im AV-Knoten anzeigt. Nach β -adrenerger Stimulation durch Orciprenalin war der Wenckebachpunkt erhöht (Abb. 5-6 A) sowie die ventrikuläre Herzrate verlangsamt (Abb. 5-6 B). Außerdem zeigten die *Popdc1*-Herzen ein kürzeres monophasisches Aktionspotential (Abb. 5-6 C). Es konnten aber keine Arrhythmien beobachtet werden. Diese Daten sind präliminar und es müssen noch weitere Untersuchungen folgen.

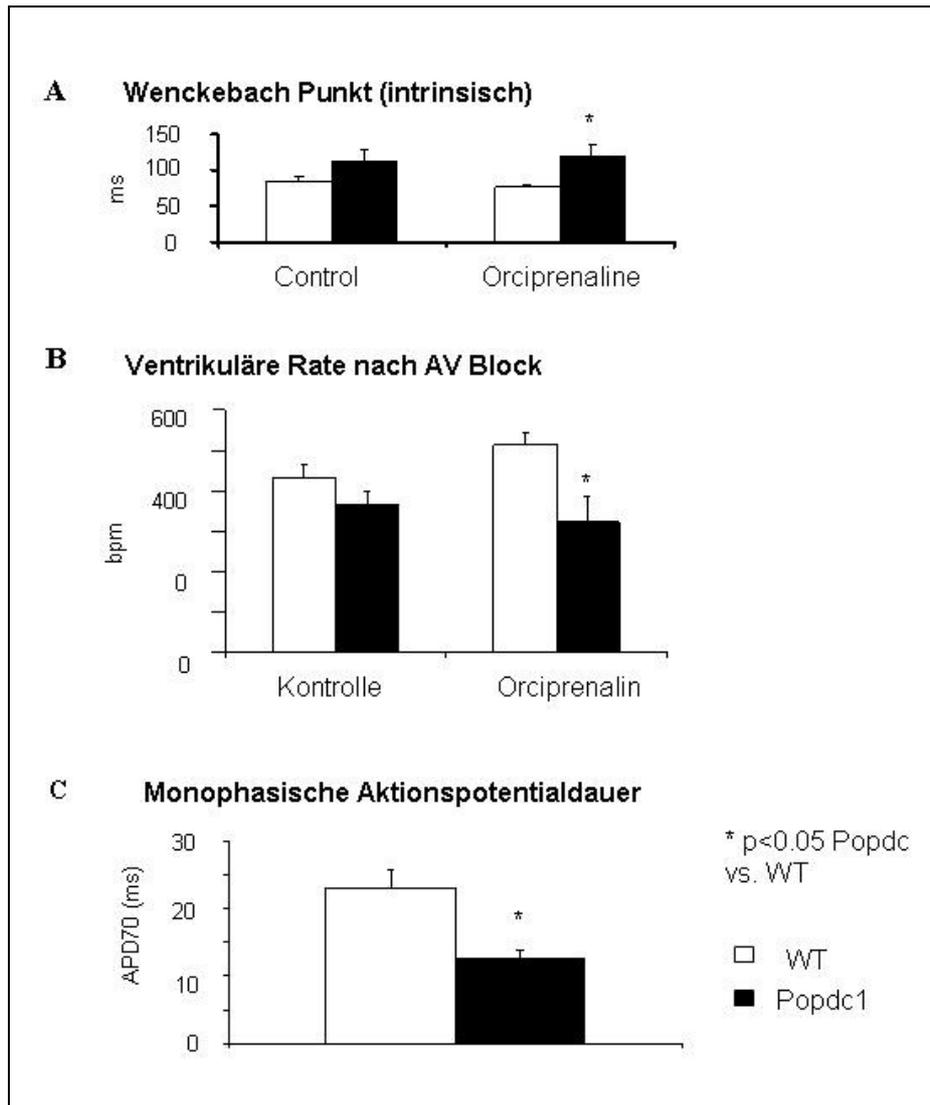


Abb. 5-6: Elektrophysiologische Messungen an isolierten Herzen

(A) Die anterograde AV-Knoten –Erregungsleitung ist bei den *Popdc1*-Mäusen nach β -adrenerger Stimulation erhöht. (B) Nach mechanischem AV-Block ist die Herzrate in den *Popdc1*-Mäusen verringert. (C) *Popdc1*-Mäuse zeigen eine kürzere monophasische Aktionspotentialdauer.

5.1.8 Strukturelle Veränderungen des Sinusknotens von *Popdc1*-Mäusen

Da die *Popdc1*-Mäuse wie die *Popdc2*-Mäuse eine altersabhängige Stress-induzierte Sinusbradykardie zeigten, sollte untersucht werden, ob sich auch wie bei den *Popdc2*-Mäusen bei diesen Tieren die Sinusknoten im Volumen bzw. in der Oberfläche vom Wildtyp unterscheiden. Dazu wurden die Sinusknoten präpariert, aufgespannt, fixiert und anschließend so eingebettet, dass senkrecht zur *Christa terminalis* geschnitten werden konnte. Es handelt sich hierbei um eine andere Einbett- und Schneidemethode als die, die mit Sinusknoten von *Popdc2*-Mäusen durchgeführt wurde. Mit dieser Methode konnte der Schneidewinkel zur *Christa terminalis* besser eingehalten und die Schnittlänge besser kalkuliert werden. Die Schnitte wurden konsekutiv gesammelt und jeder 3. Schnitt mit HCN4 gefärbt. Da der

5. Ergebnisse

Sinusknoten der Maus ca. 1,4 bis 1,5 mm lang ist, wurden ab der ersten zusammenhängenden Färbung 48 Schnitte für die Rekonstruktion verwendet.

Es zeigte sich, dass sich bei dieser Methode die Volumina und die Oberflächengröße zwischen *Popdc1*-Mäusen und Wildtyp nicht signifikant unterschieden. So lag der Mittelwert für das Volumen bei 3 Monate alten Mäusen bei 0,0072 und 0,0082mm³, bei 5 Monate alten Mäusen bei 0,0078 und 0,0063mm³ und bei 8 Monate alten Mäusen bei 0,0068 und 0,0068mm³ für Wildtypmaus bzw. *Popdc1*-Maus (siehe Abb. 5-7 A). Der Mittelwert für die Oberfläche lag für 3 Monate alte Wildtyp- und *Popdc1*-Mäusen bei 1,49 und 1,65mm², für 5 Monate alte Mäuse bei 1,79 und 1,40mm² sowie für 8 Monate alte Mäuse bei 1,78 und 1,51mm² (siehe Abb. 5-7 C). Für die Bestimmung der relativen Oberfläche (Abb. 5-7 B) und des relativen Volumens (Abb. 5-7 D) wurden die Mittelwerte der Wildtypmäuse auf 1 gesetzt und die restlichen Werte normalisiert. Hier konnte auch gezeigt werden, dass sich bei dieser Methode die Oberflächen und Volumina zwischen den Mäusen nicht unterscheiden. Zu beachten ist, dass bei dieser Rekonstruktionsmethode der inferiore Teil des Sinusknoten nicht berücksichtigt wurde.

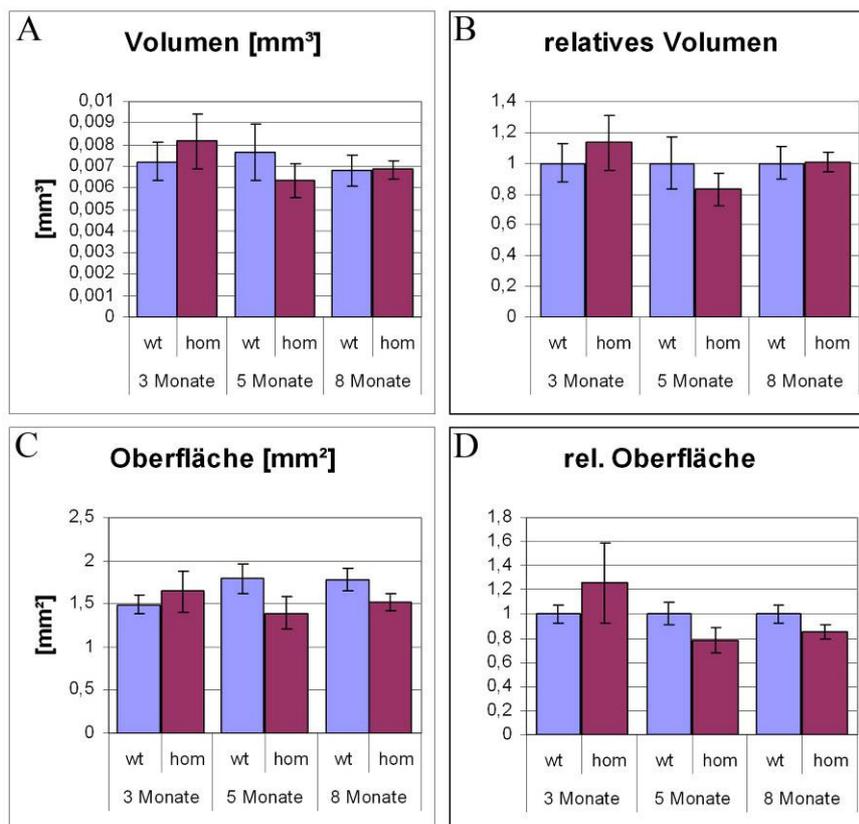


Abb. 5-7: Größe der Sinusknoten nach 3D-Rekonstruktion von HCN4-markierten Zellen auf Schnitten
Die Volumina (A und B) und die Oberflächen (C und D) der Sinusknoten von Wildtyp- und *Popdc1*-Mäusen sind in keiner Altersstufe signifikant unterschiedlich.

5. Ergebnisse

Bei der Rekonstruktion von HCN4-*whole mount*-gefärbten Sinusknoten wurde ein Volumen- und Oberflächenverlust festgestellt (Abb. 5-8). Bei dieser Methode wurde der gesamte Sinusknoten von jeweils zwei Wildtyp- und zwei *Popdc1*-Mäusen im Alter von 8 Monaten von der epikardialen Seite mit dem konfokalen Laserscanning Mikroskop analysiert und mit Hilfe von Amira rekonstruiert. In der Rekonstruktion erkennbar, schien der inferiore Bereich des Sinusknotens bei den *Popdc1*-Mäusen schmaler als bei den Wildtypmäusen (Abb. 5-8), wodurch es zu einem Verlust an Volumen und Oberfläche kam. Das Volumen der beiden Wildtypmäuse betrug im Mittel $0,018\text{mm}^3$, während das der *Popdc1*-Mäuse im Mittel $0,010\text{mm}^3$ betrug. Durch Berechnung des relativen Volumens konnte gezeigt werden, dass sich das Volumen des *Popdc1*-Sinusknotens um 42% erniedrigte (Abb. 5-8 B). Die Oberfläche der Sinusknoten der *Popdc1*-Mäuse war gegenüber der der Wildtypmäuse um 43% verkleinert. Die Oberfläche war im Mittel bei diesen Mäusen bei $3,96\text{mm}^2$, während sie bei den Wildtypmäusen bei $6,98\text{mm}^2$ lag (Abb. 5-8 C).

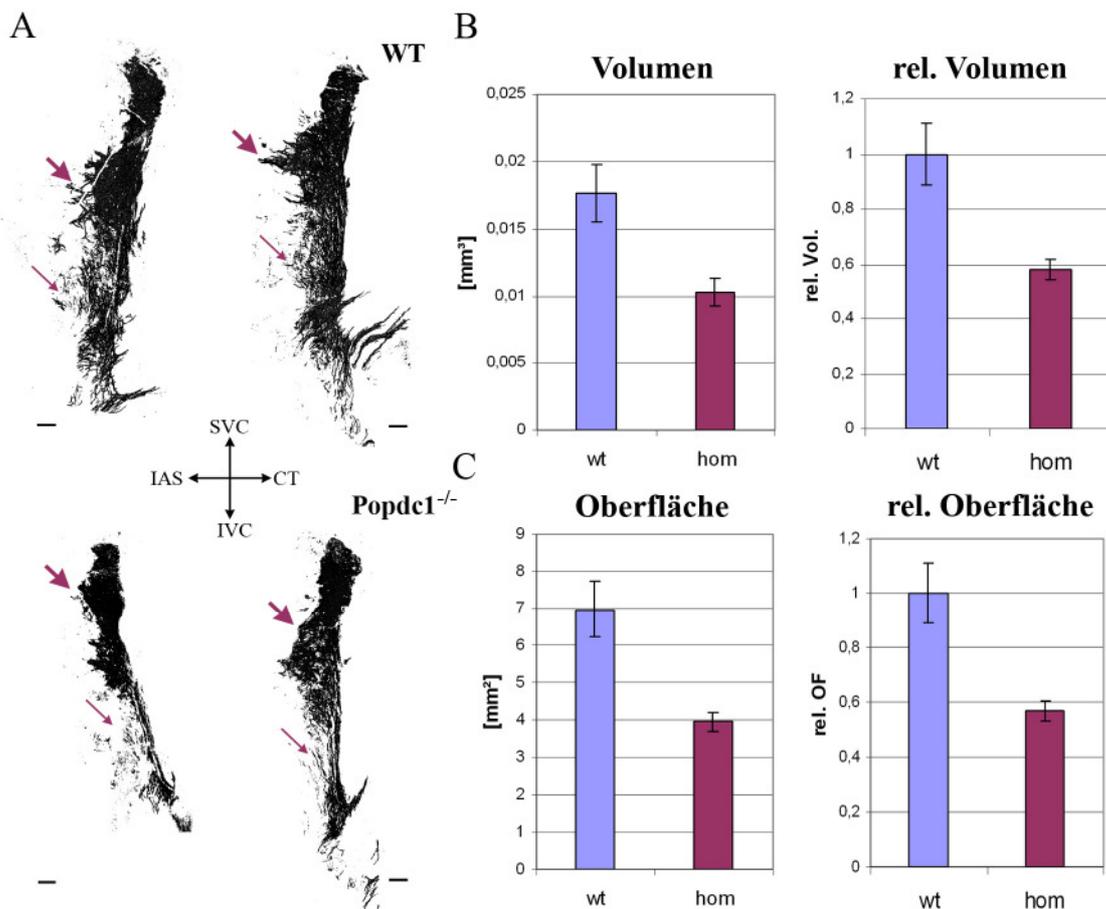


Abb. 5-8: Größe der Sinusknoten von HCN4-*whole mount* gefärbten Sinusknoten

In (A) sind oben die *whole mount* Rekonstruktionen von Wildtypmäusen und unten die von *Popdc1*-Mäusen abgebildet. (B) stellt das tatsächliche und das relative Volumen der Sinusknoten dar. Die tatsächliche und relative Oberfläche der Sinusknoten ist in (C) gezeigt. Mit der angewandten Methode konnte eine Verringerung des Sinusknotenvolumens und der Sinusknotenoberfläche festgestellt werden. Dicke Pfeile weisen auf den Bereich des Sinusknotens, der bei Wildtypmäusen Ausläufer zeigt. Dünne Pfeile verweisen auf den inferiore Teil des Sinusknotens, der bei den homozygoten Mäusen eine starke Reduktion zeigt. Maßstab: $200\mu\text{m}$

HCN4-Immunfluoreszenzfärbungen von Schnitten entlang der Superior-Inferior-Achse der Vena Cava (Abb. 5-9) bestätigten den Verlust im inferioren Bereich des Sinusknotens auf zellulärer Ebene. Jeweils die gleichen Regionen der Sinusknoten von einer Wildtyp- und *Popdc1*-Maus im Alter von 9 Monaten wurden analysiert. Im superioren Bereich sind in beiden Genotypen ähnlich viele HCN4-positive Zellen angefärbt (Abb. 5-9 A', A'' und B', B''). Dieser Bereich entspricht in etwa dem Bereich der in Abb. 5-8 mit dem dicken Pfeil markiert ist. Die Abbildungen E' bis H'' sind Schnitte in dem inferioren Abschnitt des Sinusknotens und entsprechen ungefähr dem Bereich der Abb. 5-8 mit dem schmalen Pfeil markiert ist. Hier war bei den Tieren ein deutlicher Unterschied zwischen Wildtyp- und *Popdc1*-Mäusen zu erkennen. Im Sinusknoten der *Popdc1*-Maus war ein Verlust an HCN4-positiven Sinusknotenzellen zu beobachten (Abb. 5-9 E' bis H'')

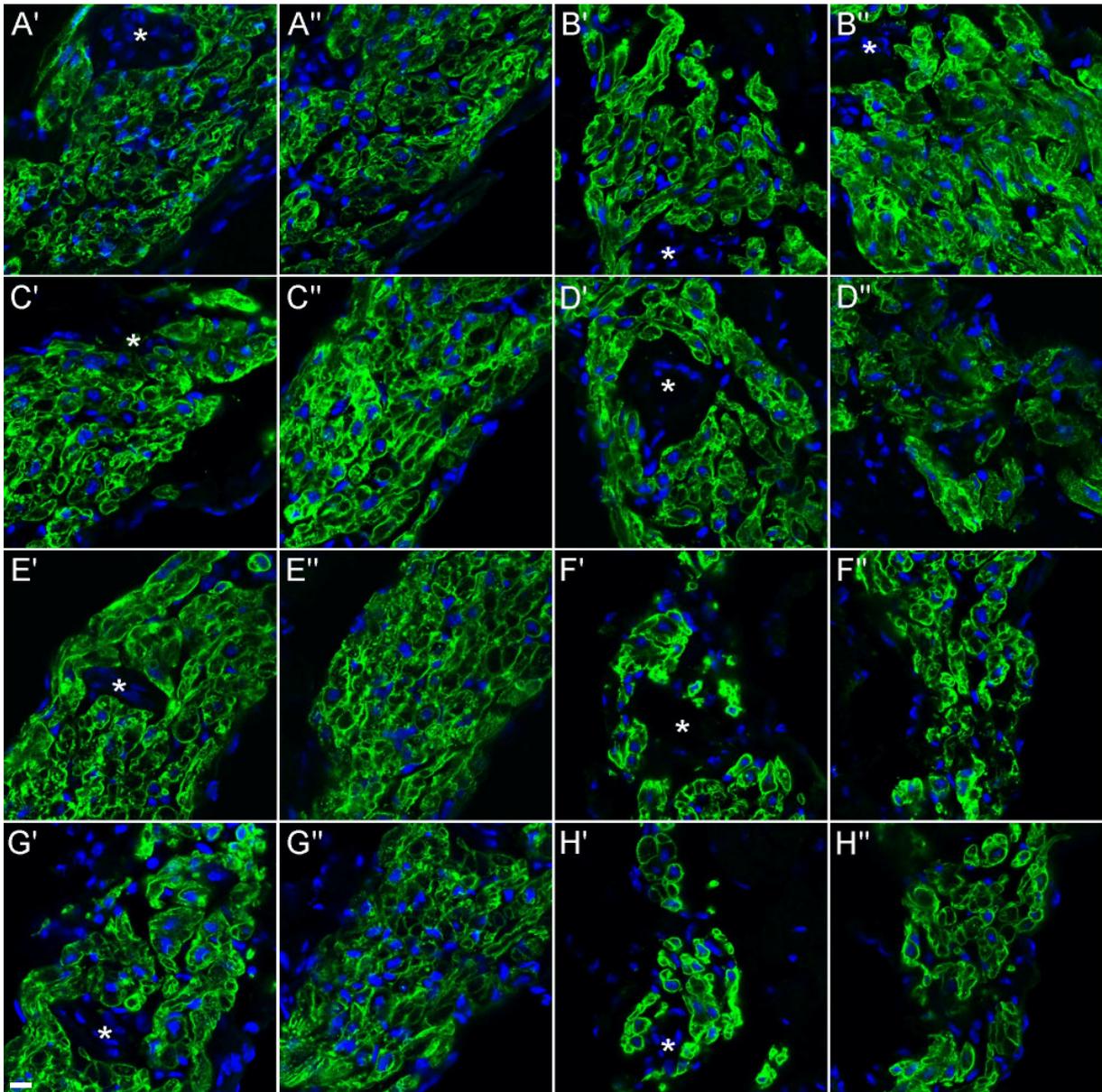


Abb. 5-9: HCN4-Färbungen entlang der Superior-Inferior-Achse des Sinusknotens

In (A') und (A''), (C') und (C''), (D') und (D'') sowie (G') und (G'') sind Schnitte durch den WT-Sinusknoten und in (B') und (B''), (D') und (D''), (F') und (F'') sowie (H') und (H'') sind Schnitte durch den Popdc1-Sinusknoten entlang der Superior-Inferior-Achse dargestellt. Geschnitten wurde senkrecht zur Crista terminalis. Sternchen verweisen auf die Sinusknotenarterie. In den Abbildungen mit ' wird der Teil des Sinusknotens dargestellt, der distal zur Crista terminalis ist, während in den Abbildungen mit '' der Teil des Sinusknotens gezeigt wird, der proximaler zur Crista terminalis ist. Ein Verlust an HCN4-positiven Zellen ist im inferioren Bereich des Popdc1-Sinusknotens zu vermerken. Maßstab: 10µm.

5.1.9 Der Popdc1-Antikörper zeigt nur in Wildtypmäusen ein Signal

Um die Spezifität eines kommerziellen polyklonalen Antikörpers, der gegen Popdc1 gerichtet ist (Santa Cruz), zu überprüfen, wurden Gefrierschnitte durch den Ventrikel von *Popdc1*- und Wildtypmäusen mit diesem Antikörper immunhistochemisch gefärbt. Nur in Wildtypmäusen wurde ein Fluoreszenzsignal beobachtet (Abb. 5-10 A-C). Der Antikörper detektiert folglich spezifisch Popdc1. Popdc1 wird im ventrikulären Gewebe in der Plasmamembran von Myozyten detektiert.

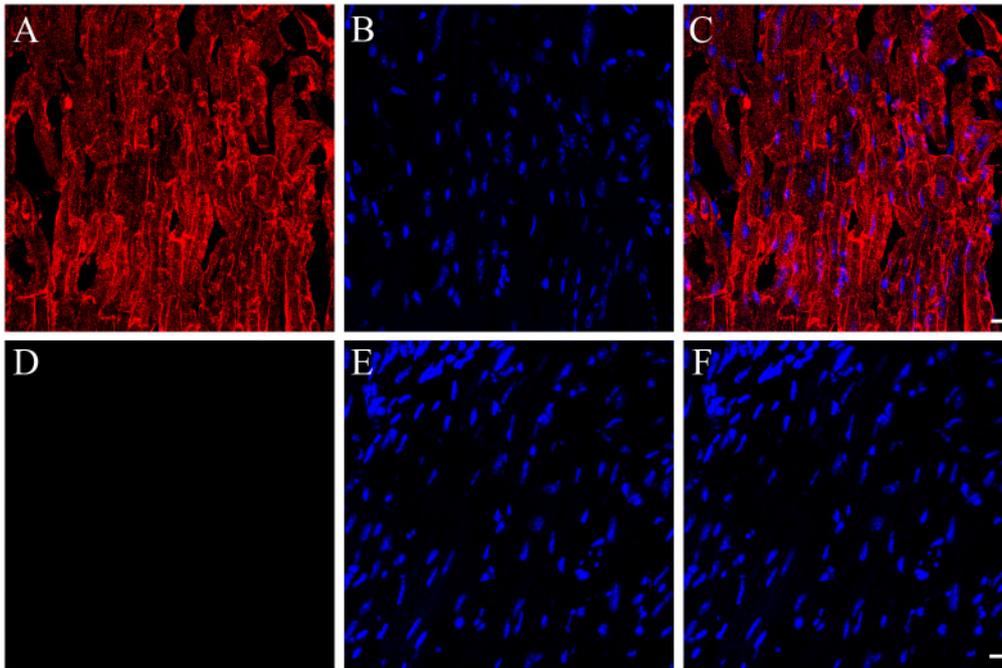


Abb. 5-10: Der Popdc1-Antikörper zeigt nur in Wildtypmäusen ein Signal

In den lateralen Membranen und in den Glanzstreifen von Wildtypmäusen (A-C) wird ein Signal durch den Popdc1-Antikörper (A) detektiert, während in den homozygoten *Popdc1*-Mäusen (D-F) kein Signal auftritt (D). (A) und (D) zeigt die Popdc1-Immunfluoreszenz in rot. (B) und (E) zeigt die DAPI-Kernfärbung in blau. In (C) und (F) sind die Übereinanderlagerungen von (A) und (B) bzw. von (D) und (E) dargestellt. Ein Popdc1-Signal wird nur in den Wildtypmauszellen erkannt. Maßstab: 10 μ m

Auch im Western Blot wird ausschließlich im Gewebehomogenat von neonatalen Wildtypherzen ein Signal bei ca. 60kDa erkannt (Abb. 5-11 A). Somit konnte auch hier gezeigt werden, dass der Antikörper von Santa Cruz für Popdc1 spezifisch ist. In manchen Fällen konnte eine weitere immunoreaktive Proteinbande unterhalb von 60 kDa detektiert werden. Die Puffer 1 bis 6 entsprechen der Reihenfolge der Puffer unter 4.4.2.1 (Abb. 5-11 B). Da schon früher gezeigt wurde, dass Popdc1 nur unzureichend unter nicht-denaturierenden Bedingungen extrahierbar ist (Vasavada et al., 2004), wurde adultes Herzgewebe in Harnstoffpuffer aufgenommen. Ventrikuläres Gewebe ließ sich wesentlich leichter homogenisieren als atriales, da es sich um große Gewebestücke handelt. Das atriale Gewebe ließ sich nicht homogenisieren. Aus diesem Grunde wurde im Falle der Atrien nach Zentrifugation das unlösliche Pellet in SDS-Probenpuffer aufgenommen. In Harnstoff-Puffer konnte in Ventrikulärgewebe ein Signal im löslichen Überstand bei ca. 60 kDa und im unlöslichen Pellet des Atriums bei etwa 55 kDa detektiert werden (Abb. 5-11 C).

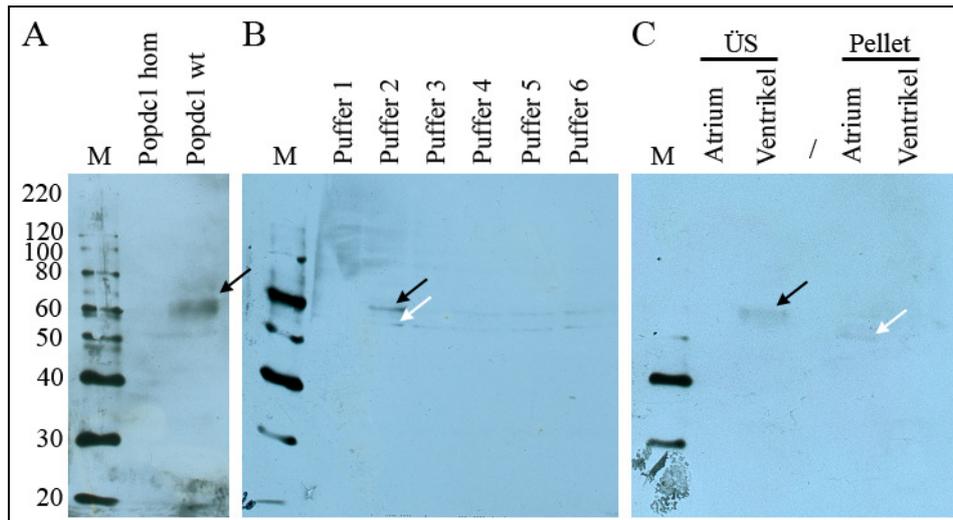


Abb. 5-11: Der Popdc1-Antikörper detektiert verschiedene Banden im Western Blot

In (A) und (B) wurden Herzlysate von neonatalen Mäusen aufgetragen, während in (C) Harnstoffextrakte von Ventrikel und Atrien einer adulten Maus aufgetragen wurde. Diese wiederum wurden noch in Überstand (ÜS) und Pellet getrennt. Bei den restlichen Lysaten wurde nur der Überstand aufgetragen. In (A) erkennbar detektiert der Popdc1-Antikörper eine Bande in der Popdc1 wt Spur bei ca. 60 kDa. Kein Signal wird in der Popdc1 hom Spur detektiert. (B) zeigt die Lysierbarkeit von Popdc1 in verschiedenen Lysispuffern. Die beste Lyse erfolgte bei Puffer 2. In den Spuren von Puffer1 bis Puffer 6 werden zwei Banden auf unterschiedlichen Höhen erkannt. Die obere Bande (schwarzer Pfeil) läuft bei ca. 60 kDa, die untere Bande (weißer Pfeil) läuft bei ca. 55 kDa. Im adulten Gewebe (C) wird in der Spur des Ventrikelüberstandes eine Bande bei ca. 60 kDa (schwarzer Pfeil) erkannt, im Atriumpellet wird eine Bande bei ca. 55 kDa erkannt (weißer Pfeil).

5.2 Das Expressionsmuster von Popdc1 im Herzen

5.2.1 Das Expressionsmuster von Popdc1 im Reizleitungssystem im Herzen

In adulten Mäusen wird Popdc1 im Reizleitungssystem des Herzens erhöht exprimiert. *Whole mount* LacZ-Färbungen von adulten Mäuseherzen zeigten, dass Popdc1 im SAN und in den Atrien (Abb. 5-12 C) exprimiert wird. Eine starke Expression von Popdc1 wurde außerdem im His-Bündel und in den linken (Abb. 5-12 D) und rechten (Abb. 5-12 E) Bündelverzweigungen im Septum gefunden. Detailaufnahmen zeigten, dass die Expression von Popdc1 im ventrikulären Reizleitungssystem gegenüber dem Arbeitsmyokard gesteigert ist. Sowohl die Expression des Popdc1-LacZ (Abb. 5-12 F und I), als auch die Expression des endogenen Proteins wurde erhöht in den Zellen des Reizleitungssystems detektiert. Die Expression im ventrikulären Reizleitungssystem wurde durch die Acetylcholinesterase-Färbung auf konsekutiven Schnitten (Abb. 5-12 H und K) bestätigt. Acetylcholinesteraseaktivität markiert nodales Myokard aufgrund der hohen Innervation von Sinusknoten und AV-Knoten durch cholinerge parasymphatische Neuronen. Interessanterweise war die Expression in den Atrien gegenüber den Ventrikeln ebenfalls erhöht (Abb. 5-12 A und B).

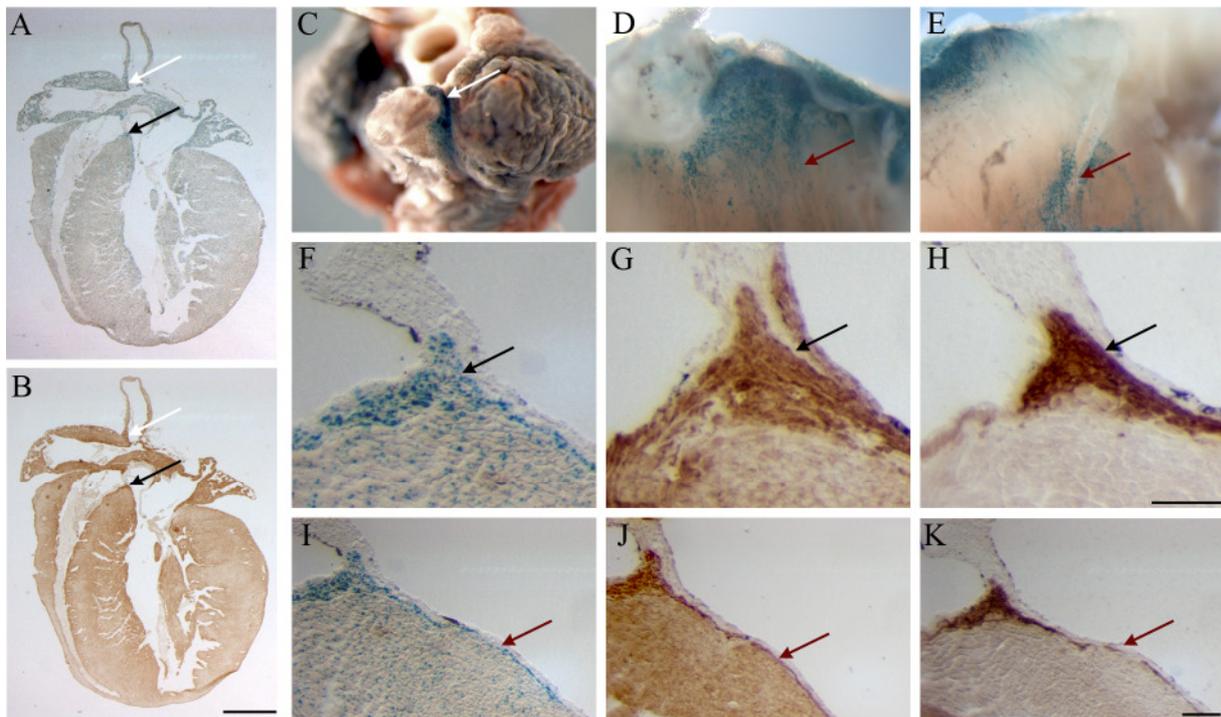


Abb. 5-12: Popdc1 ist im Reizleitungsgewebe exprimiert

(A) und (B) zeigen konsekutive Schnitte von Übersichten eines LacZ- und eines Popdc1-gefärbten Herzens. Schwarze Pfeile zeigen auf das His-Bündel und weiße Pfeile auf den SAN. (C) zeigt das Herz von der rechten oberen Seite, (D) eine Aufsicht von links und (E) von rechts auf das Septum. Rote Pfeile markieren die Bündelverzweigungen. (F-H) zeigen konsekutive Schnitte des His-Bündels, (I-K) zeigen konsekutive Schnitte durch das His-Bündel mit anschließenden linken Bündelverzweigung. (A,C-E,F, I) zeigen LacZ-Popdc1-, (B,G,J) Popdc1-HRP- und (H,J) Acetylcholinesterase-Färbungen. (A,B) Maßstab 1 mm, (F-G,I-K). Maßstab: 0,1 mm.

5.2.2 Die Popdc1-Expression kolokalisiert mit der HCN4-Expression im Reizleitungssystem

Der HCN4-Kanal ist für den nach innen gerichteten, depolarisierenden Natrium-/Kaliumstrom (I_f) verantwortlich. Er wird im Reizleitungsgewebe exprimiert und durch Hyperpolarisation des Membranpotentials aktiviert. Auf Proteinebene konnte HCN4 im Sinusknoten (Liu et al., 2007) sowie im kompakten Knoten, im His-Bündel und in der posterioren nodalen Extension des ventrikulären Reizleitungssystems (Dobrzynski et al., 2003) detektiert werden. HCN4 ist besonders gut als Markerprotein für den Sinus- und AV-Knoten geeignet.

Der hier verwendete Popdc1-Antikörper, der das Mausprotein detektierte, erkannte im atrialen (Abb. 5-13 A) und ventrikulären Myokard die myozytäre Plasmamembran (Abb. 5-10 A).

Wie die LacZ-Färbung in Abb. 5-12 zeigte, war Popdc1 im Bereich des Sinusknotens exprimiert. Eine Doppelfärbung gegen Popdc1 und HCN4 zeigte eine Kolokalisation beider Proteine (Abb. 5-13 A-C). Während die Expression von HCN4 auf den Sinusknoten beschränkt blieb (Abb. 5-13 B), war die Expression von Popdc1 auch im angrenzenden

Atrium und in der Vena cava superior zu finden (Abb. 5-13 A). Popdc1 war jeweils in den Plasmamembranen lokalisiert. Im Sinusknoten waren die beiden Proteine überlappend exprimiert (Abb. 5-13 C).

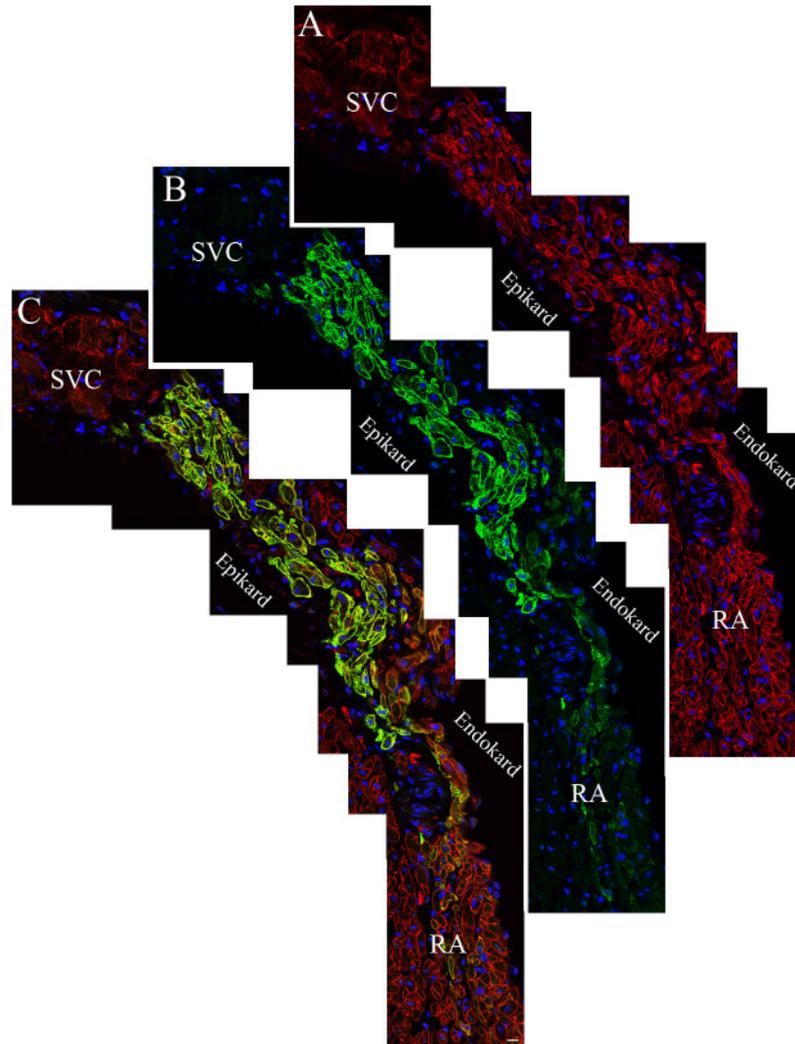


Abb. 5-13: Die Expression von Popdc1 im Sinusknoten

Der Sinusknoten wird durch HCN4 (B) markiert. Popdc1 (A) ist neben der Lokalisation im Sinusknoten auch in den Membranen des Arbeitsmyokard des rechten Atriums (RA) sowie in der Superior Vena Cava (SVC) lokalisiert. Im Sinusknoten lokalisieren HCN4 und Popdc1 (C). Maßstab: 10 μ m

Popdc1 war, wie oben schon durch die LacZ-Färbung und die Immunhistochemie gezeigt wurde, auch im ventrikulären Reizleitungssystem exprimiert. Die Signalstärke des LacZ-Transgens, als auch die des endogenen Proteins waren im Vergleich zum ventrikulären Arbeitsmyokard erhöht (Abb. 5-12). Die erhöhte Expression von Popdc1 (Abb. 5-14 A) im ventrikulären Reizleitungssystem wurde durch die HCN4-Markierung (Abb. 5-14 B) bestätigt, welche ausschließlich das Reizleitungssystem markierte und in der Überlagerung (Abb. 5-14 C) den Bereich markiert, der dem Reizleitungssystem entspricht.

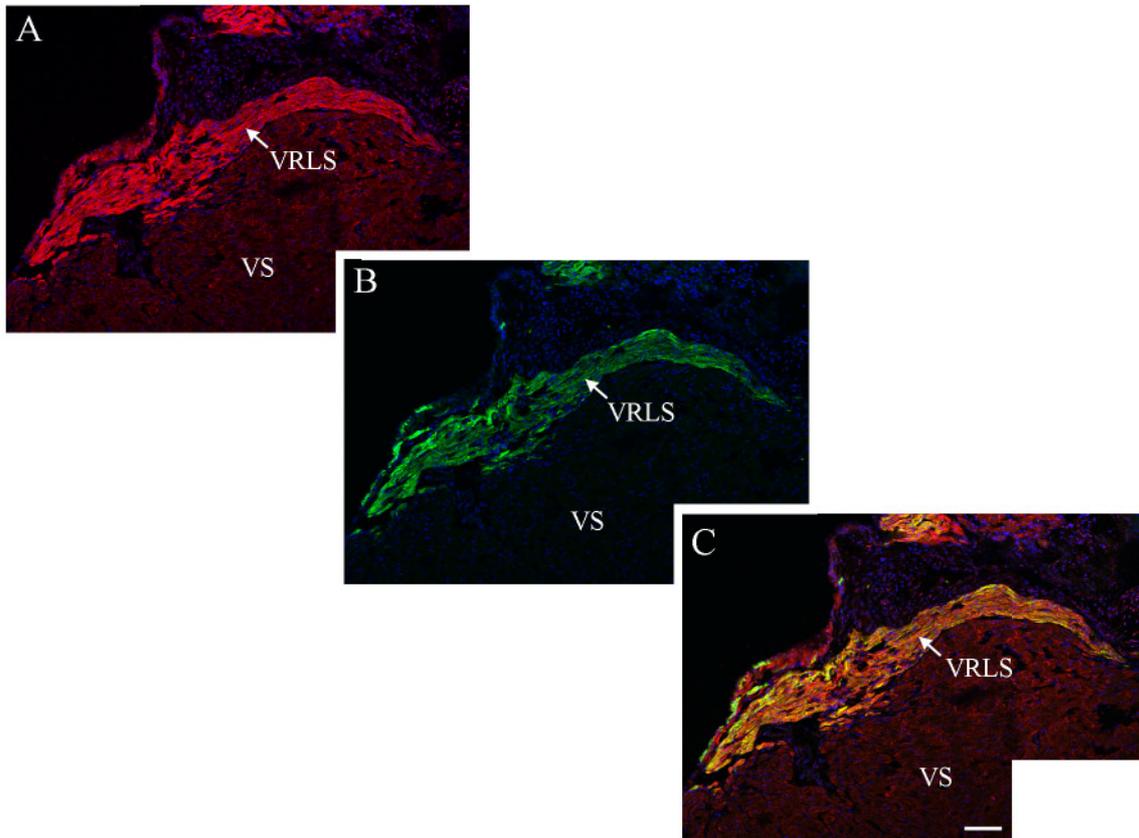


Abb. 5-14: Popdc1 kolokalisiert mit HCN4 im ventrikulären Reizleitungssystem

Popdc1 (A) ist im ventrikulären Reizleitungssystem (VRLS) gegenüber dem Myokard des ventrikulären Septums erhöht (VS). HCN4 (B) markiert ausschließlich das Reizleitungssystem. Die Übereinanderlagerung von beiden Proteinsignalen zeigt, dass eine Kolokalisation nur dort stattfindet, wo Popdc1 erhöht vorkommt. Maßstab: 10 μ m

5.2.3 Popdc1- und Cx40-Lokalisation in den verschiedenen Bereichen des Herzens

Das Gap Junction Protein Cx40 ist ein weiteres Protein, welches im Reizleitungssystem vorkommt. Anders als HCN4 wird es nur sehr gering im Sinusknoten exprimiert (Boyett et al., 2006). Dafür wird Cx40 in den Atrien und im ventrikulären Reizleitungssystem hauptsächlich im His-Bündel, in den Bündelverzweigungen und in den Purkinje-Fasern exprimiert (Delorme et al., 1995; Gros and Jongasma, 1996).

Doppelfärbungen von Popdc1 und Cx40 zeigten, dass die beiden Proteine in der Plasmamembran von atrialen Myozyten lokalisiert vorkommen. Während Popdc1 eher homogen verteilt war, zeigte Cx40 eine punktähnliche Distribution (Abb. 5-15 A-C).

Auch hier war in Längsschnitten wieder erkennbar, dass die Expression von Popdc1 im ventrikulären Reizleitungssystem (Abb. 5-15 H-P) gegenüber dem ventrikulären Arbeitsmyokard erhöht war. Popdc1 war im His-Bündel (Abb. 5-15 E) und in den Bündelverzweigungen (Abb. 5-15 H) dort erhöht, wo Cx40 (Abb. 5-15 F und I) exprimiert war und somit das Reizleitungsgewebe markierte. In Querschnitten durch den rechten (Abb. 5-15 K-M) und linken (Abb. 5-15 N-P) Ventrikel waren die randständigen Zellen, die ins

5. Ergebnisse

Lumen der Ventrikel wiesen, Cx40 gefärbt. Dies waren vermutlich Zellen der Bündelverzweigungen. Die randständigen Zellen zeigten ein erhöhtes Popdc1-Signal.

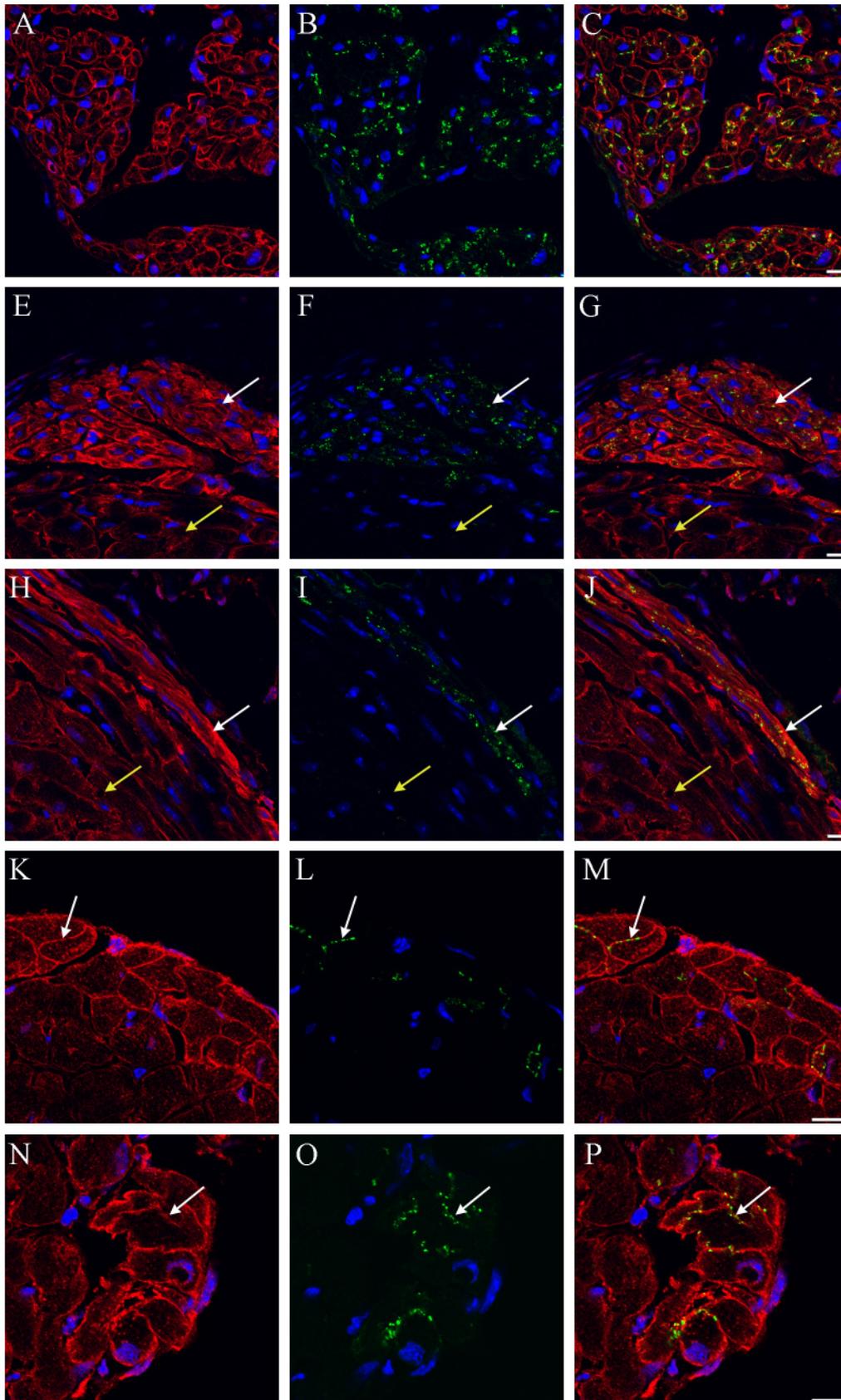


Abb. 5-15: Popdc1 kolokalisiert mit Cx40 in ventrikulären Reizleitungssystem

Popdc1 (A, E, H, K und N) kolokalisiert mit Cx40 (B, F, I, L und O) in atrialen Myozyten (A-C). Die Expression von Popdc1 ist im Reizleitungssystem gegenüber dem ventrikulären Myokard erniedrigt (weißer Pfeil versus gelber Pfeil, (E und H)). (E-J) Längsschnitte, (K-P) Querschnitte. Maßstab: 10 µm

5.2.4 Popdc1 wird nicht im Epikard und nicht in den Gefäßen des Myokards exprimiert

Bis heute ist ungeklärt, ob *Popdc1* in den Glattmuskelzellen der Koronargefäße und im Epikard exprimiert wird. Die Arbeitsgruppe um David Bader berichtet in mehreren Publikationen, dass Popdc1 im Herzen des Huhns mit Hilfe verschiedener monoklonalen Antikörper im Epikard und in den Glattmuskelzellen der Koronararterien detektiert wird (Reese et al., 1999). Eine andere Arbeitsgruppe (DiAngelo et al., 2001; Vasavada et al., 2004) und unsere eigenen Untersuchungen zeigten aber, dass Popdc1 nur im Myokard detektierbar ist und nicht in Epikard und in den Gefäßen (Breher et al., 2004; Torlopp et al., 2006).

Um zu untersuchen, ob das Popdc1-Protein mit dem Santa Cruz Antikörper auch im Epikard und in den Glattmuskelzellen der Gefäße erkannt wird, wurden Gefrierschnitte mit dem Popdc1-Antikörper allein (Abb. 5-16 A-F) oder zusammen mit einem Antikörper gegen Glattmuskelaktin (Abb. 5-16 G-I) inkubiert. In Abb. (Abb. 5-16 C) erkennbar, wurde Popdc1 im Atrium nicht in der äußeren epikardialen Schicht detektiert (weißer Pfeil). Es wurde auch kein Popdc1-Signal in den Gefäßen gefunden (Abb. 5-16 D, F, G und I), die aber mit Glattmuskelaktin (Abb. 5-16 H) markiert wurden (gelber Pfeil).

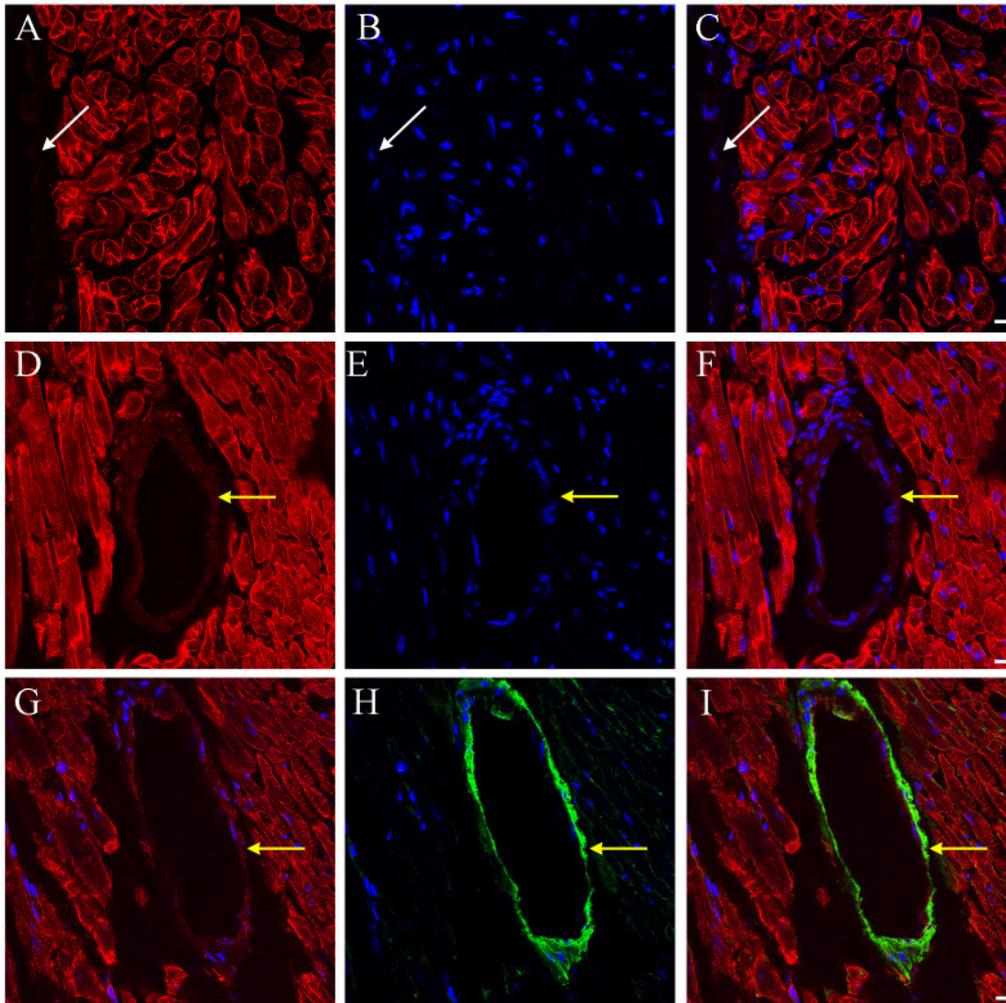


Abb. 5-16: Popdc1 wird nicht im Epikard und nicht in den Gefäßen des Ventrikels exprimiert.

Popdc1 (A, D und G) zeigt ein Signal im atrialen (A) und ventrikulären (D und G) Myokard. In (B) und (E) wird DAPI allein dargestellt. In (C) zeigt die äußerste Schicht, das Epikard, kein Popdc1-Signal (weißer Pfeil). Im Ventrikel sind die Gefäße nicht Popdc1-positiv (gelber Pfeil). In (H) wird das Gefäß mittels des Glattmuskelantikörpers Glattmuskelaktin dargestellt. Das Podc1-Signal ist in den Gefäßen nicht detektierbar (gelber Pfeil). (C, F und I) sind die Überlagerungen von (A und B), (D und E) und (G und H). Maßstab: 10 µm

5.2.5 Subzelluläre Distribution von Popdc1

5.2.5.1 Popdc1 kolokalisiert mit N-Cadherin und Connexin 43 in den Glanzstreifen

Die Endkontakte der ventrikulären Myozyten werden auch als Glanzstreifen bezeichnet. Glanzstreifen dienen der elektrischen und mechanischen Kopplung der Myozyten. Die elektrische Kopplung erfolgt über die Gap Junctions, während die Myozyten über Adhärenzverbindungen und Desmosomen mechanisch gekoppelt werden.

N-Cadherin ist im adulten Myokard primär in den Adhärenzverbindungen und Connexin 43 in den Gap Junctions der Glanzstreifen lokalisiert. Popdc1 und N-Cadherin waren im ventrikulären Gewebe und in isolierten adulten Myozyten in den Glanzstreifen kolokalisiert

(Abb. 5-17 A-C; Abb. 5-18 A-C). Auch Connexin 43 konnte im Ventrikelgewebe und in isolierten Myozyten in diesen Bereichen lokalisiert werden (Abb. 5-17 D-F sowie Abb. 5-18 D-F). Des Weiteren war Popdc1 in einer charakteristischen quergestreiften Domäne in ventrikulären Myozyten zu beobachten.

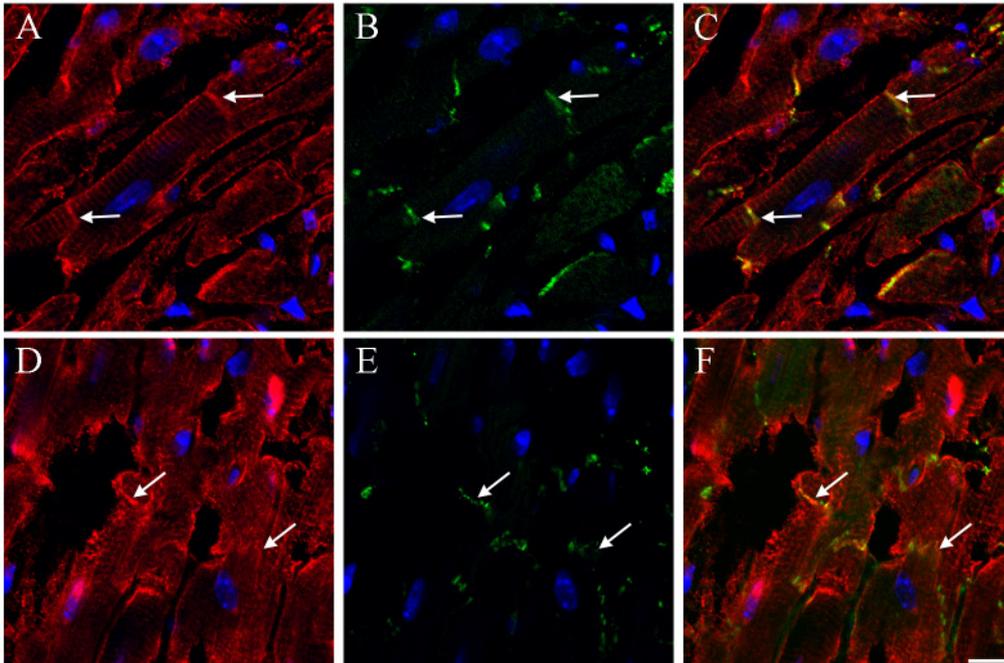


Abb. 5-17: Popdc1 lokalisiert mit N-Cadherin und Connexin 43 in den Glanzstreifen im ventrikulären Gewebe

In (A) und (D) wird Popdc1 in den lateralen Membranen, in einer Querbänderung und in den Glanzstreifen (Pfeile) lokalisiert. N-Cadherin (B) wird in den Glanzstreifen detektiert, wo es mit Popdc1 lokalisiert (C). Auch Connexin43 (E) wird in den Glanzstreifen detektiert. Es lokalisiert dort mit Popdc1 (F). Maßstab: 10 μ m

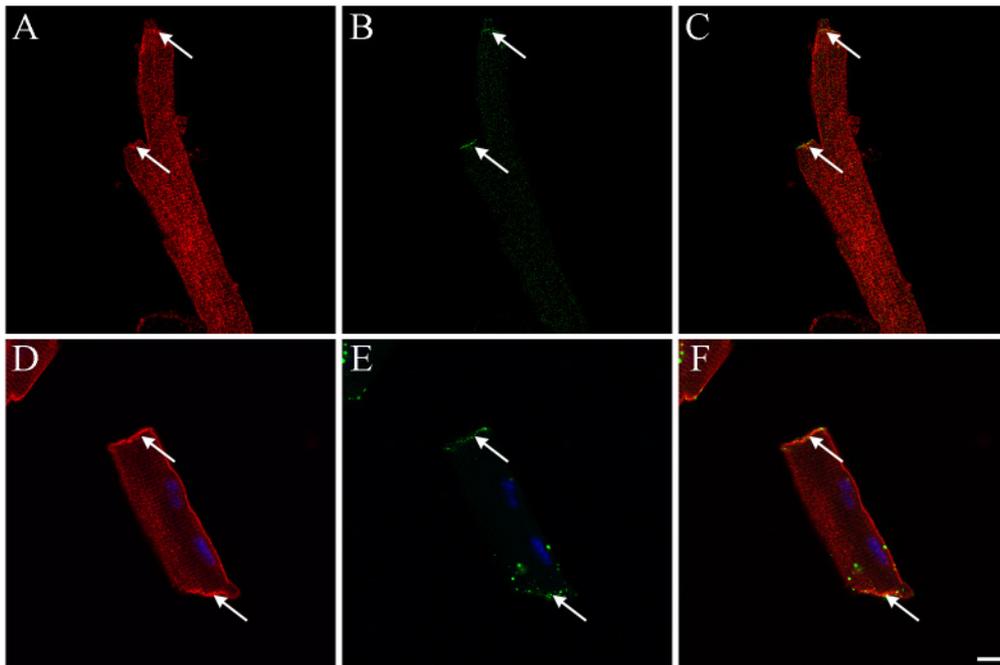


Abb. 5-18: Popdc1 lokalisiert mit N-Cadherin und Connexin 43 in den Glanzstreifen in isolierten Myozyten

In (A) und (D) wird Popdc1 in den lateralen Membranen, in einer Querbänderung (D) und in den Enden (Pfeile) lokalisiert. N-Cadherin (B) wird in den Enden detektiert, wo es mit Popdc1 lokalisiert (C). Auch Connexin43 (E) wird an diesen Stellen zusammen mit Popdc1 (F) detektiert. Maßstab: 10 μm

In einer vergrößerten Darstellung bei gleichzeitiger Reduktion der Intensität des Popdc1-Signals, zeigten die beiden Proteine eine nichtkomplementäre Distribution bzw. eine sehr schwache periphere Kolo­kalisation (Abb. 5-19 A-C).

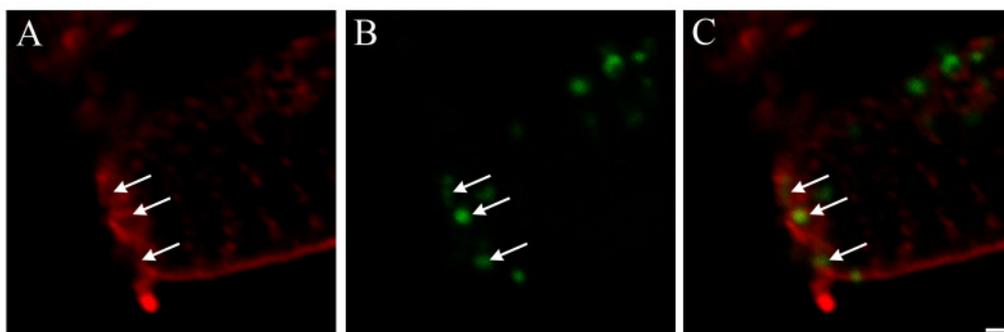


Abb. 5-19: Popdc1 und Cx43 sind nicht kolo­kalisiert

Popdc1 in einer größeren Vergrößerung zeigt am Glanzstreifen Aussparungen (A). Cx43 ist punk­tiert im Glanzstreifen verteilt (B) und scheint in den Aussparungen vom Popdc1-Signal lokalisiert zu sein (C). Maßstab: 1 μm

5.2.5.2 Die Expression von Popdc1 in den T-Tubuli der Herzmuskulatur

Immunfärbungen von ventrikulären Myozyten mit Popdc1 während der frühen postnatalen Entwicklung zeigten, dass Popdc1 in den Tagen 1 bis 8 eine starkes Vorkommen in den lateralen Membranen der Herzmuskelzellen sowie den Glanzstreifen aufwies. Im Alter von 4 Wochen wurde eine Querstreifung innerhalb der Myozyten sichtbar. Bei diesen handelt es sich sehr wahrscheinlich um T-Tubuli (Abb. 5-20). Es ist bekannt, dass die T-Tubuli-Entwicklung in Mäusen im Alter von 10 bis 14 Tagen abgeschlossen ist. Die Struktur ist dann mit der von adulten Mäusen identisch (Forbes et al., 1984)

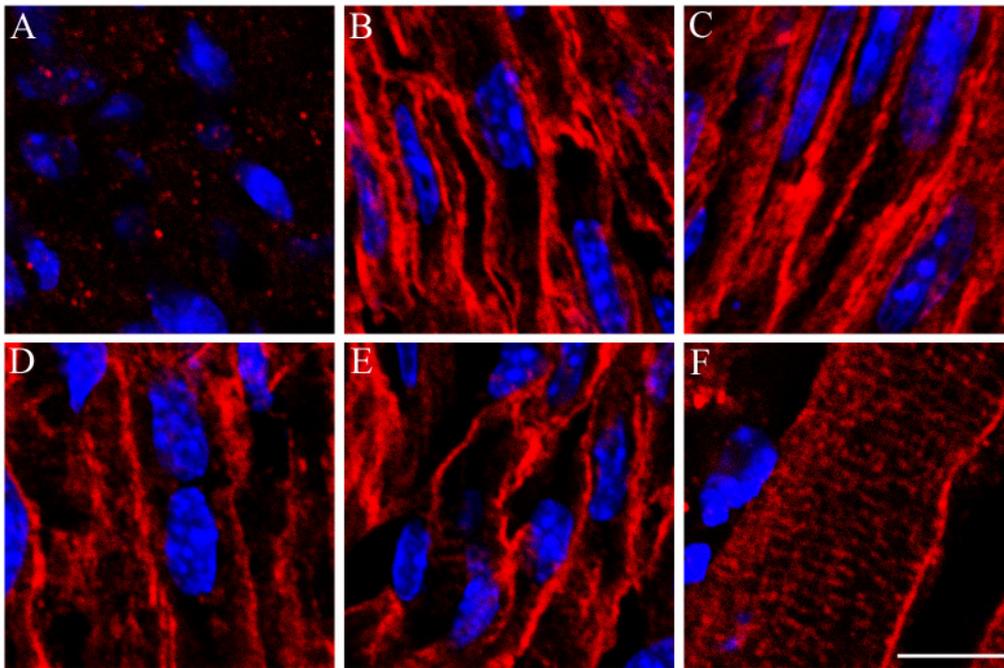


Abb. 5-20: Die Expression von Popdc1 in der frühen postnatalen Entwicklung in ventrikulären Myozyten
Im Alter von 1 Tag (B), 2 Tagen (C), 4 Tagen (D) und 8 Tagen (E) ist die Expression von Popdc1 auf die lateralen Membranen sowie den Glanzstreifen der Herzmuskelzellen beschränkt. Im Alter von 4 Wochen (F) kann Popdc1 auch in Querstreifen detektiert werden. (A) zeigt einen Schnitt durch ventrikuläre Myozyten eines 1 Tag alten Herzens, der nur mit dem 2. Antikörper inkubiert wurde. Maßstab 10 μ m.

In isolierten adulten ventrikulären Myozyten der Maus war Popdc1 auch in einer quergestreiften Musterung detektierbar. Des Weiteren wurde Popdc1 wie oben erwähnt zum Teil in den lateralen Membranen und in den Glanzstreifen lokalisiert (Abb. 5-21).

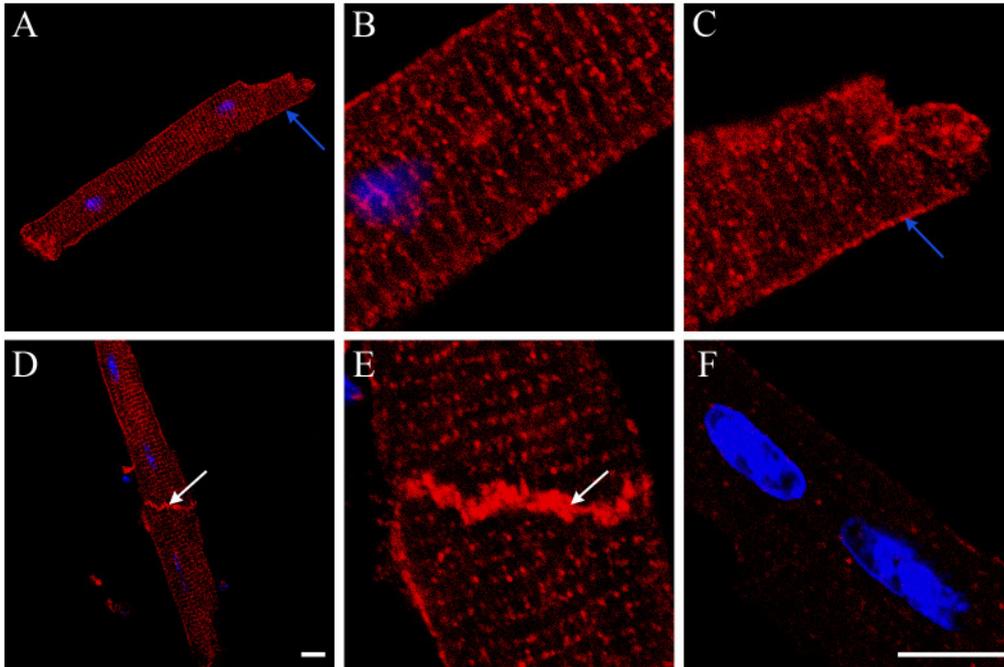


Abb. 5-21: Popdc1-Expression in adulten ventrikulären Myozyten

Die Popdc1 wird in einer quergestreiften Bänderung in adulten ventrikulären Myozyten detektiert. Außerdem kann Popdc1 in den Glanzstreifen (weißer Pfeil) und in den lateralen Membranen (blauer Pfeil) lokalisiert werden. (B und C) Ausschnitt von (A), (E) Ausschnitt von (D). (A-E) Popdc1-Detektion, (F) nur sekundärer Antikörper. Maßstab (A,D und B,C,E,F). Maßstab: 10 µm

In atrialen Myozyten ist ein transverses T-Tubulinetz nicht ausgebildet (Ayettey and Navaratnam, 1978). Atriale Myozyten zeigten nach Färbung mit dem Popdc1-Antikörper nur ein Signal an der Plasmamembran. Einige schwach gefärbte longitudinale Membranstrukturen waren in einigen atrialen Myozyten zu erkennen, aber es wurde keine Färbung in einer quergestreiften Anordnung innerhalb der Zellen festgestellt. Dieser Befund unterstützt die Interpretation der immunhistochemischen Färbung, dass es sich bei der Querstreifung um T-Tubuli handelt.

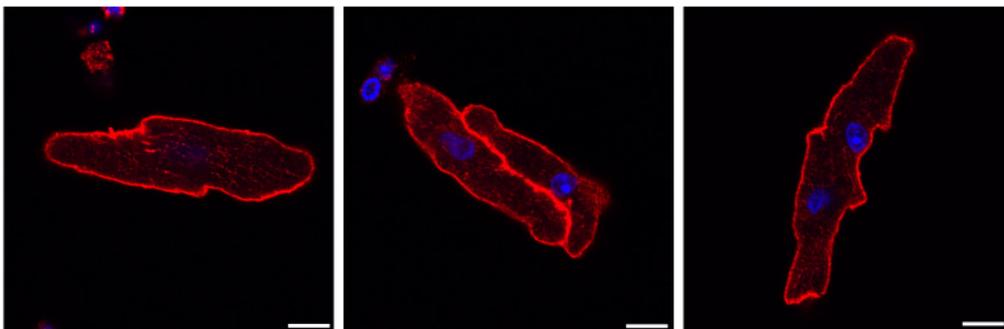


Abb. 5-22: Popdc1-Expression in adulten atrialen Myozyten

Popdc1 wird in atrialen Myozyten in den lateralen Membranen lokalisiert. Maßstab: 10 µm

Gefrierschnitte von humanem Herzgewebe wurde von Prof. Dr. Gattenlöhner, Institut für Pathologie der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt. Auch im humanen ventrikulären

Myokard zeigte Popdc1 eine identische Proteindistribution: Popdc1 wurde in den Glanzstreifen, T-Tubuli und in der Plasmamembran von Myozyten detektiert (Abb. 5-23).

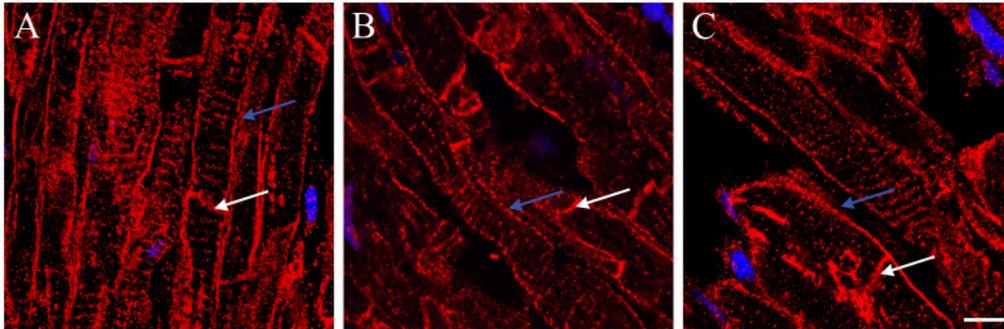


Abb. 5-23: Expression von Popdc1 in humanen Herzwesen dreier verschiedener Probanden (A-C)
Popdc1 wird in den Glanzstreifen (weiße Pfeile), in den lateralen Membranen (blaue Pfeile) und in einer quergestreiften Bänderung lokalisiert. Maßstab 10µm.

5.2.5.3 Die Popdc1-Expression in der Querbänderung von ventrikulären Myozyten

Eine Querbänderung entsteht in Myozyten durch Z-Linien sowie durch T-Tubuli. Z-Linien definieren die Enden eines Sarkomers und sind mit den dünnen Filamenten, den Aktinfilamenten, über α -Aktinin verbunden. Ein Antikörper gegen α -sarkomerisches Aktinin erkennt spezifisch die beiden Isoformen α -skelettales und kardiales Muskelaktinin und diente hier als Markerprotein für Z-Linienproteine. Popdc1 zeigte, wie oben beschrieben, eine Querbänderung (Abb. 5-24 A, D, G, J und M). Popdc1 war nicht mit α -Aktinin an der lateralen Membran kolokalisiert, es gab aber Bereiche in denen die beiden Proteine ein überlappendes Signal aufwiesen (Abb. 5-24 C-C'). Das Muster beider Proteine war trotz teilweiser Überlappung signifikant unterschiedlich. Während Popdc1 eher eine punkartige Verteilung entlang der Querbänderung aufwies, zeigte α -Aktinin eine strichartige Verteilung. Teilweise waren die Popdc1-Punkte unter- und oberhalb von α -Aktinin bzw. schienen zwischen der Expressionsdomäne von α -Aktinin lokalisiert zu sein (rote Pfeile in Abb. 5-24 C''). Um den Grad der Kolokalisation zu bestimmen, wurden entlang der Querbänderungen die Signalprofile beider Proteine gemessen. Das Profil zeigt, dass viele α -Aktinin Peaks (Beispiele sind mit einem grünen Pfeil in Abb. C'' gekennzeichnet) zwischen den Signalen von Popdc1 (rot) liegen (Abb. 5-24 C''). Es gibt aber auch Signale die überlappen (Beispiele sind mit einem gelben Pfeil in Abb. 5-24 C'' gekennzeichnet).

Ein Marker für Plasmamembranen ist das Lektin WGA (*Wheat germ agglutinin*). Dieses bindet an Sialinsäure- und *N*-Acetylglucosaminreste von Glykolipiden der Membran. Es wurde gezeigt, dass WGA an das Sarkolemma von kardialen Myozyten sowie an die Glanzstreifen und T-Tubuli bindet (Dolber et al., 1992). Doppelfärbung mit Popdc1 und

WGA zeigten, dass sich beide Proteine in der Membran und in den T-Tubuli befinden (Abb. 5-24 D-F'). Das Profil beider Proteine zeigte, dass WGA eher gleichbleibend über die T-Tubuli und stärker als Popdc1 um den Kern herum verteilt war. Außerdem war Popdc1 eher punktiert exprimiert. An der Membran zeigten beide Proteine jeweils einen großen Peak, die aber nicht vollständig überlappend waren.

Proteine der T-Tubuli sind wie in der Einleitung schon erwähnt unter anderem NCX1 und Ca_v1.2, die in Subkompartimenten der Membran lokalisiert sind (Scriven et al., 2000).

NCX1 zeigte mit Popdc1 eine Lokalisation an den lateralen Membranen und auch in den Glanzstreifen. Des Weiteren wiesen beide Proteine ein ähnliches Muster in den T-Tubuli auf (Abb. 5-24 G-I'). Die beiden Profile haben viele übereinstimmende Peaks (Abb. 5-24 I''). Ähnlich sah es mit der Verteilung von Popdc1 und Ca_v1.2 aus (Abb. 5-24 J-L'). Auch hier zeigten die Profile eine ähnliche Intensitätsverteilung (Abb. 5-24 L'').

Auch Caveolin 3 weist in Myozyten eine Querbänderung auf, die mit dem T-Tubulinetzwerk assoziiert ist (Parton et al., 1997; Scriven et al., 2005). Wie NCX1 und Ca_v1.2 zeigte Caveolin 3 ein überlappendes Profil (Abb. 5-24 O'') sowie eine Kolokalisation (Abb. 5-24 M-O') mit Popdc1.

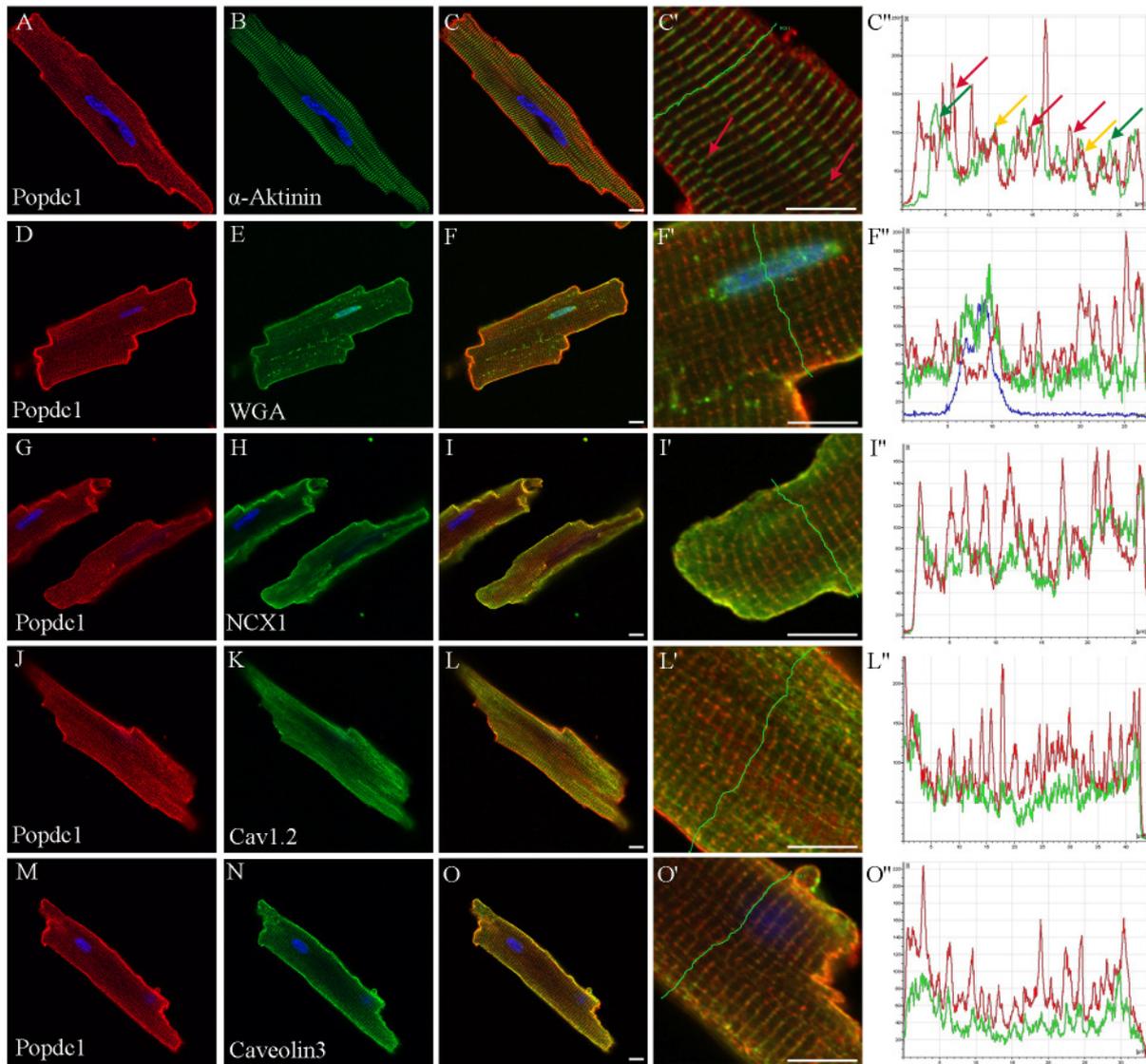


Abb. 5-24: Die Lokalisierung von Popdc1 in isolierten kardialen ventrikulären Myozyten

Lokalisationen von Popdc1 (A,D,G,J und M) mit α -sarkomerischen Aktinin (B), WGA (E), NCX1 (H), $Ca_v1.2$ (K) und Caveolin 3 (N) zeigen, dass Popdc1 in einer ähnlichen Querbänderung wie α -sarkomerisches Aktinin (C-C''), WGA (F-F''), NCX1 (I-I''), $Ca_v1.2$ (L-L'') bzw. Caveolin 3 (O-O'') lokalisiert. Die Peaks der Profile in F'', I'', L'' und O'' sind stärker überlappend als das Profil in C''. Die Profile wurden entlang der grünen dünnen Linie gemessen. Rot weist auf Popdc1 hin, während grün auf die jeweiligen Proteine der Reihe repräsentiert. Rote Pfeile in C'' zeigen auf Peaks von Popdc1 und grüne Pfeile auf α -sarkomerisches Aktinin, diese Peaks überlappen nicht. Gelbe Pfeile weisen auf überlappende Peaks in C'' hin. Maßstab: 10 μ m

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Popdc1 mit bekannten T-Tubuli-Markern kolokalisiert, während eine Kolokalisation mit α -sarkomerischem Aktinin keine große Überlappung zeigte. Die Beobachtung, dass sich die quergestreifte Expressionsdomäne von Popdc1 in den ventrikulären Myozyten erst während der postnatalen Entwicklung auftauchte und nur in ventrikulären und nicht in atrialen Myozyten vorkam, untermauert die Interpretation, dass Popdc1 auch in den T-Tubuli lokalisiert wird.

5.3 Die biochemische Charakterisierung von Popdc1

5.3.1 Popdc1 ist ein Membranprotein

Die *Popdc*-Gene kodieren für eine Familie von integralen Membranproteinen. Dass es sich bei Popdc1 um ein Membranprotein handelt, konnte durch zelluläre Fraktionierung von embryonalen Hühnerherzgewebe bestätigt werden (Abb. 5-25 A). Dazu wurde Herzgewebe durch differentielle Zentrifugation in Kerne, Membranen und Zytosol getrennt. Mithilfe des Popdc1-Antikörpers wurde das Protein ausschließlich in der Membranfraktion detektiert. Um auszuschließen, dass es sich dabei um ein membranassoziiertes Protein handelt, wurde als weiterer Versuch eine Fraktionierung der Membranproteine in Puffer mit aufsteigenden Salzkonzentrationen und anschließender Trennung von Membranen und assoziierter Proteinen mittels Zentrifugation durchgeführt. Popdc1 wurde dabei ausschließlich in den Membranfraktionen M1 (stark und schwach membranassoziierte Proteine), M2 (stark membranassoziierte Proteine) und M3 (integrale Membranproteine) gefunden (Abb. 5-25 A). Es handelt sich bei Popdc1 also um ein integrales Membranprotein.

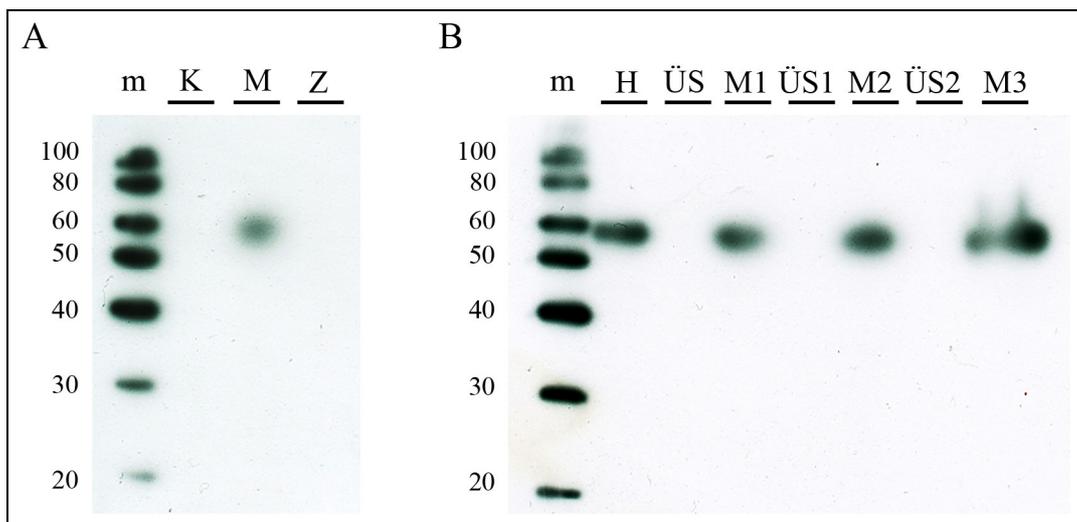


Abb. 5-25: Subzelluläre Fraktionierung von embryonalen Hühnerherzlysaten

Popdc1 wird nach Fraktionierung in Kerne, Membranen und Zytosol ausschließlich in den Membranfraktionen detektiert (A). Auch nach Aufnahme in aufsteigenden Salzkonzentrationen wird Popdc1 nur in den Membranfraktionen detektiert (B). m - Marker; K - Kerne; M - Membranproteine ; M1 - Membranproteine mit stark und schwach assoziierten Proteinen, M2 - Membranproteine mit schwach assoziierten Proteinen, M3 - integrale Membranproteine; Z - Zytosol; ÜS - Homogenatüberstand, ÜS1 - schwach assoziierte Proteine, ÜS2 - stark assoziierte Proteine

5.3.2 Popdc1 ist ein glykosyliertes Protein und dimerisiert

Popdc1 weist zwei funktionelle Glykosylierungsstellen am extrazellulären N-Terminus auf und der C-Terminus liegt intrazellulär (Knight et al., 2003). Die Glykosylierung von Popdc1 konnte in eigenen Versuchen bestätigt werden. Dazu wurden Hühnerherzlysate in An- und Abwesenheit von N-Glykosidas F inkubiert und anschließend auf ein Proteingel aufgetragen. In Anwesenheit von N-Glykosidase F wurde zwei Banden unterhalb der 42kDa- Bande detektiert, von dem die eine dem nativen Proteingewicht von ca. 41kDa entspricht (Abb. 5-26 A). Wurde kein N-Glykosidase-Verdau durchgeführt, so lief das Protein bei ca. 58kDa.

Unter nicht-reduzierenden Bedingungen im Western Blot zeigt Popdc1 ungefähr das doppelte Molekulargewicht (Vasavada et al., 2004). Es wird deshalb postuliert, dass Popdc1 in Zellen als Homodimer vorliegt. Für die Dimerisierung wird neben einer extrazellulär lokalisierten Disulfidbrücke auch eine Dimerisierungssequenz benötigt, die carboxyterminal am Ende der *Popeye*-Domäne lokalisiert ist (Kawaguchi et al., 2008). Die Dimerisierung von Popdc1 wurde getestet, indem Hühnerherzlysate in SDS-Probenpuffer aufgenommen wurde, in An- (+) oder Abwesenheit (-) des Reduktionsmittels β -Mercaptoethanol. In Anwesenheit des Reduktionsmittels wies das Popdc1-Protein ein Molekulargewicht von ca. 58kDa auf, welches sich in Abwesenheit des Reduktionsmittels auf ungefähr das Doppelte erhöhte (Abb. 5-26 B).

Aus diesen Daten lässt sich ein Arbeitsmodell für Popdc1 als Prototyp für die Mitglieder der *Popeye* domain containing Proteine ableiten (Abb. 5-26 C). Da die N-Glykosylierung im Lumen des ER stattfindet, und das ER nach weiterer Prozessierung von Proteinen dem extrazellulären Bereich entspricht, liegt der N-Terminus von Popdc1 extrazellulär. Dies konnte auch in früheren Versuchen der Membrantopologie festgestellt werden (Breher, Diplomarbeit, 2003). Der N-Terminus ist glykosyliert. Die 3 Transmembrandomänen durchspannen die Membran und der C-Terminus liegt intrazellulär. Dieser trägt die *Popeye*-Domäne an dessen Ende ein Dimerisierungsmotiv liegt. Da unter nicht-reduzierenden Bedingungen das Molekulargewicht von Popdc1 ca. doppelt so groß ist, scheint das Protein als Dimer vorzuliegen.

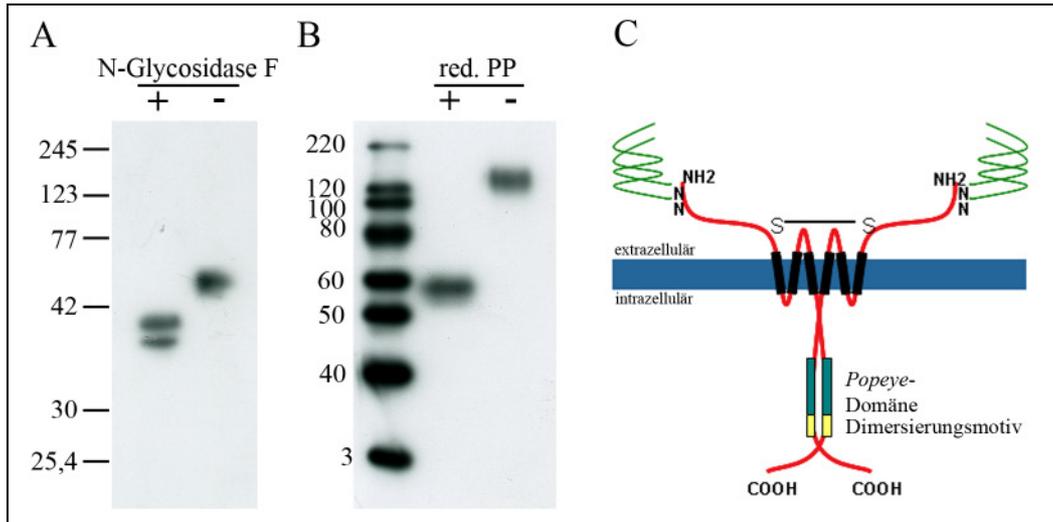


Abb. 5-26: Popdc1 ist ein glykosyliertes Protein und bildet Dimere

Popdc1 zeigt nach Verdau mit N-Glykosidase F (+) ein Molekulargewicht von ca. 41kDa, während es sonst bei ca. 58kDa im Proteingel wandert (A). In Abwesenheit eines Reduktionsmittels (-) wandert das Protein auf ca. der doppelten Höhe als mit Reduktionsmittel(+) (B). In (C) ist das Proteinmodell von Popdc1 dargestellt. red. PP: reduzierender Probenpuffer

5.3.3 Die Popcye-Domäne

Die ungefähr 150 Aminosäuren lange Popcye-Domäne ist zytoplasmatisch lokalisiert. Es handelt sich um eine stark konservierte Proteindomäne, die in allen untersuchten Popdc-Proteinen von verschiedenen Vertebraten- und Invertebratenpezies gefunden wurde. Ein Sequenzvergleich der Popcye-Domäne zeigte, dass innerhalb der Popcye-Domäne 17 Aminosäuren invariant bzw. nahezu invariant sind (Abb. 5-27). Auffällig sind die beiden konservierten Sequenzmotive DSPE und FQVT.



Abb. 5-27: Die Popcye-Domänen verschiedener Spezies.

Sequenzvergleich der Popcye-Domäne von verschiedenen Spezies ist hoch konserviert. Invariante Aminosäuren sind in rot dargestellt. Auffällig sind die beiden Motive DSPE und FQVT. Daneben gibt es Popdc1 bzw. Popdc2/Popdc3 spezifische Sequenzmotive

5. Ergebnisse

Die Vorhersage der Sekundärstruktur mittels Psipred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>) zeigte eine starke Kongruenz zwischen der Bindungsdomäne für zyklische Nukleotide der Protein Kinase A (PKA) und der *Popeye*-Domäne (Popdc1) (Abb. 5-28). So sind in beiden Sekundärstrukturen acht β -Faltblattstrukturen vorhanden, die durch einen α -helikalen Abschnitt unterbrochen werden. In PKA markiert dieser α -helikale Abschnitt zwischen β -6 und β -7 die Phosphatbindungskassette (PBC), die direkt mit cAMP interagiert. Flankiert werden die β -Faltblätter durch α -Helices (α -A bzw. α -B/ α -C). Auch die Tertiärstrukturen der beiden Proteine weisen eine große Ähnlichkeit auf. Die β -Faltblätter bilden einen Stapel, der von den α -Helices auf beiden Seiten flankiert wird.

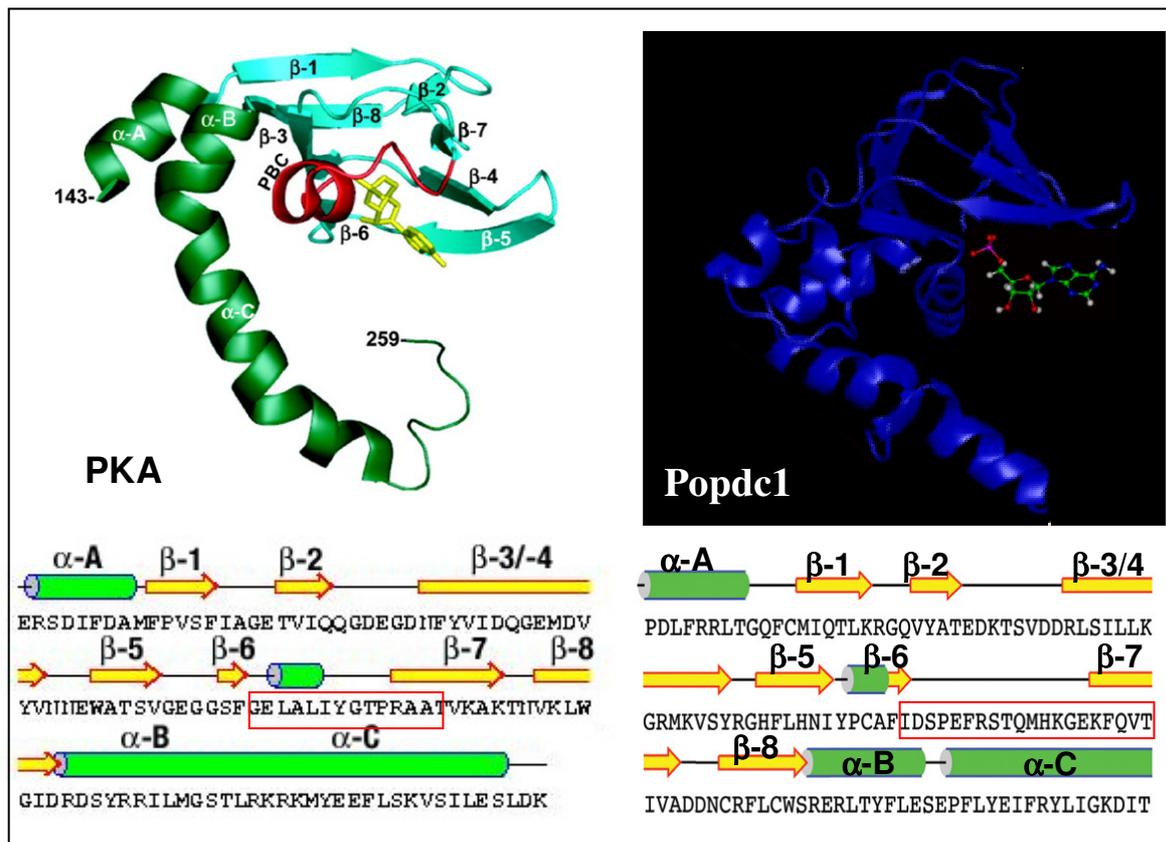


Abb. 5-28: Vergleich der Sekundär- und Tertiärstrukturen zwischen den zyklischen Bindungsdomänen der PKA und Popdc1.

Die Sekundärstrukturen der beiden zyklischen Bindungsdomänen zeigen eine ähnliche Abfolge von α -Helices (Zylinder) und β -Faltblättern (gelbe Pfeile). Die PBC ist rot umrandet. Die Tertiärstrukturen zeigen einen ähnlichen Aufbau.

Der Vergleich der Tertiärstrukturen zwischen den *Popeye*-Domänen der 3 Popdc-Proteine zeigte, dass die *Popeye*-Domänen ähnlich aufgebaut sind. Jede *Popeye*-Domäne besteht aus einem β -Faltblattstapel, der von α -Helices umrahmt ist. Somit besitzen die anderen beiden Popdc-Proteine auch eine ähnliche Raumstruktur wie PKA (Abb. 5-29).

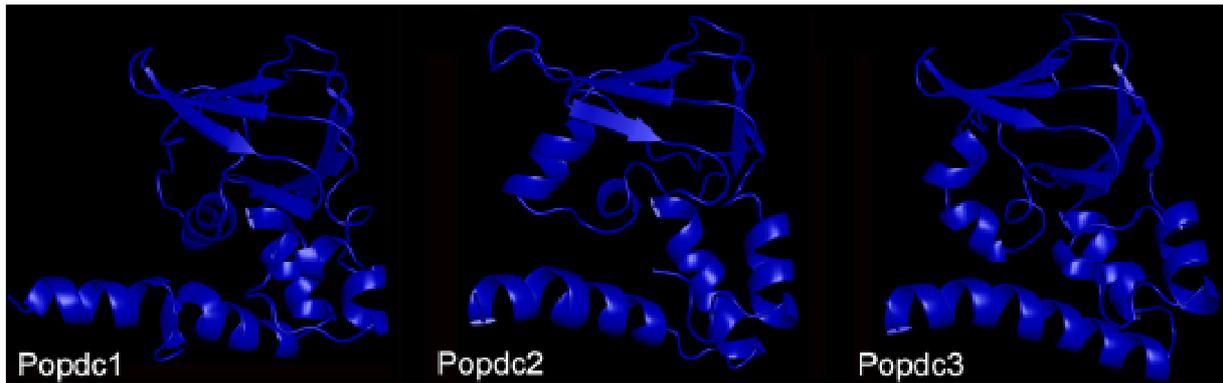


Abb. 5-29: Die Tertiärstrukturen der 3 Popdc Popeye-Domänen zeigen einen ähnlichen Aufbau
 Wie die Popdc1-Popeye-Domäne sind auch die Popeye-Domänen von Popdc2 und 3 aus einem β -Faltblattstapel, der von α -Helices eingerahmt wird, umgeben

In der Darstellung der Oberflächenstruktur (Abb. 5-30 A) sowie im Bänderdiagramm (Abb. 5-30 B der Popeye-Domäne), die beide von Prof. Dr. Thomas Müller, Botanisches Institut I der Universität Würzburg generiert wurden, konnte gezeigt werden, dass die invarianten Aminosäuren, die in rot dargestellt wurden, an der Oberfläche in der vermuteten Phosphatbindungskassette liegen.

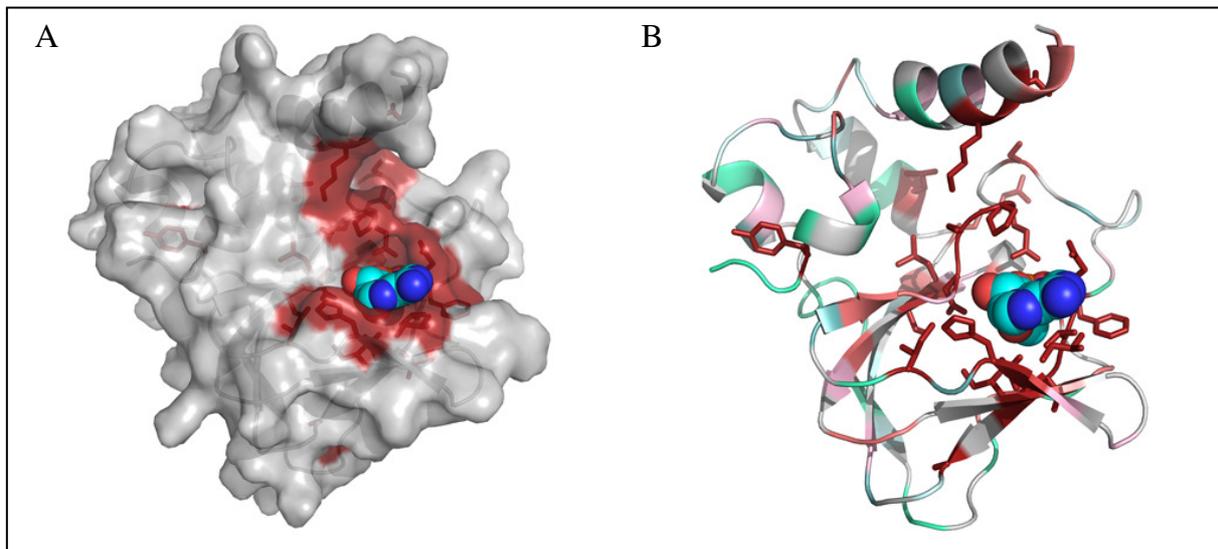


Abb. 5-30: Die konservierten Aminosäuren liegen überwiegend in der vermuteten Phosphatbindungskassette

Die konservierten Aminosäuren sind in (A) und (B) in rot dargestellt. Sie liegen in der vorhergesagten Phosphatbindungskassette. In (A) ist die Oberflächenstruktur der Popeye-Domäne dargestellt, (B) zeigt das Bänderdiagramm der Popeye-Domäne. Die invarianten Aminosäuren sind hervorgehoben. Das zyklische Nucleotid wurde als Kalottenmodell in die 3D-Strukturen in die vermutlichen Phosphatbindungskassette integriert. Diese graphische Darstellung wurde von Prof. Dr. Thomas Müller (Botanisches Institut I der Universität Würzburg) erstellt.

Die Lokalisation der konservierten Aminosäuren im 3D-Modell der Popeye-Domäne liegen überwiegend in bzw. nahe der vorhergesagten Phosphatbindungskassette (Abb. 5-30). Die beiden Motive DSPE und das FQVT sind vermutlich direkt an der Bindung der zyklischen

Nukleotide beteiligt. Eine konservierte Eigenschaft bereits bekannter PBCs ist das Vorhandensein eines Argininrestes, der mit der Phosphatgruppe des cAMPs interagiert; ein Glutamatrest innerhalb der PBC bindet an die Hydroxylgruppe der Riboseuntereinheit. Der PBC der *Popeye*-Domäne fehlt dieser Argininrest, ein konservierter Glutamatrest ist jedoch vorhanden. Dies deutet darauf hin, dass sich die PBC der *Popeye*-Domäne fundamental von anderen PBCs unterscheidet.

Zum Generieren der Konsensussequenzen der putativen Bindungsregion wurde das Programm weblogo unter (<http://weblogo.threepulseone.com>) genutzt. Dieses Programm stellt die Aminosäuren je nach Konservierungsgrad in verschiedenen Größen dar. Negativ-geladene Aminosäuren werden rot, positiv-geladene Aminosäuren werden blau und ungeladene Aminosäuren werden schwarz unterlegt (Abb. 5-31). Hier ist auch noch mal die Invarianz des DSPE- und FQVT-Motivs zu erkennen (Abb. 5-31 A).



Abb. 5-31: Vergleich der Konsensussequenz der PBC.

Die putative Bindungsregion von (A) Popdc-Proteinen und (B) eu- bzw. prokaryotischen zyklischen Nukleotidbindungsproteinen wurden mit dem Programm Web Logo graphisch dargestellt. Die Größe der Buchstaben, die die einzelnen Aminosäuren markieren, repräsentiert den jeweiligen Konservierungsgrad. Alternative Aminosäuren an der jeweiligen Position sind untereinander dargestellt. Die Aminosäuren sind rot (negativ geladen), blau (positiv geladen) bzw. schwarz (ungeladen) markiert. Die beiden Bindungsdomänen divergieren vollständig und zeigen keinerlei Ähnlichkeiten. An der Bindung von cAMP innerhalb der kanonischen PBC ist der Glutamatrest (Pos. 2) und der Argininrest (Pos. 11) beteiligt.

5.3.4 Die Bindung von Popdc1 an cAMP

Aufgrund der strukturellen Homologie zwischen cNMP- (cyclic nucleotide monophosphate) Bindungsproteinen und der *Popeye*-Domäne einerseits und der starken Divergenz in der putativen PBC andererseits, war es notwendig, die cNMP-Bindungsfähigkeit der *Popeye*-Domäne direkt experimentell zu charakterisieren. Um zu überprüfen, ob Popdc-Proteine tatsächlich fähig sind cAMP zu binden, wurden embryonale Hühnerherzen homogenisiert, mit cAMP-Agarose präzipitiert und die Präzipitate im Western Blot mit Hilfe des Popdc1 Antikörpers analysiert. Popdc1 ist in diesem Experiment fähig an cAMP-Agarose zu binden (Abb. 5-32 A). Um eine unspezifische Bindung an die cAMP-Agarose auszuschließen, wurde das Homogenat auch mit Ethanolamin-Agarose inkubiert. Im Unterschied zur cAMP Agarose bindet Popdc1 nicht an die Ethanolamin-Agarose (Abb. 5-32 B). Die Ethanolamin-Agarose wurde deshalb in den folgenden Versuchen als Negativkontrolle oder für die Präadsorption der Gewebekomponenten eingesetzt.

In einem weiteren Experiment wurden Cos7-Zellen mit einem Konstrukt transfiziert, das für den C-Terminus von Popdc1 des Huhns kodiert. Dieses Konstrukt startet mit dem Lysin an der Position 115 gleich nach der dritten Transmembrandomäne und beinhaltet den gesamten restlichen C-Terminus. So ist in diesem Konstrukt auch die *Popeye*-Domäne mit der putativen Nukleotidbindungsregion vorhanden. Dieses trunkierte Protein bindet an die cAMP-Agarose aber nicht an die Ethanolamin-Agarose (Abb. 5-32 C).

Die Fähigkeit der Popdc-Proteine zyklische Nukleotide zu binden etabliert diese Proteinfamilie als einen neuen Zweig der Superfamilie der zyklische Nukleotide bindenden (CNB) Proteine.

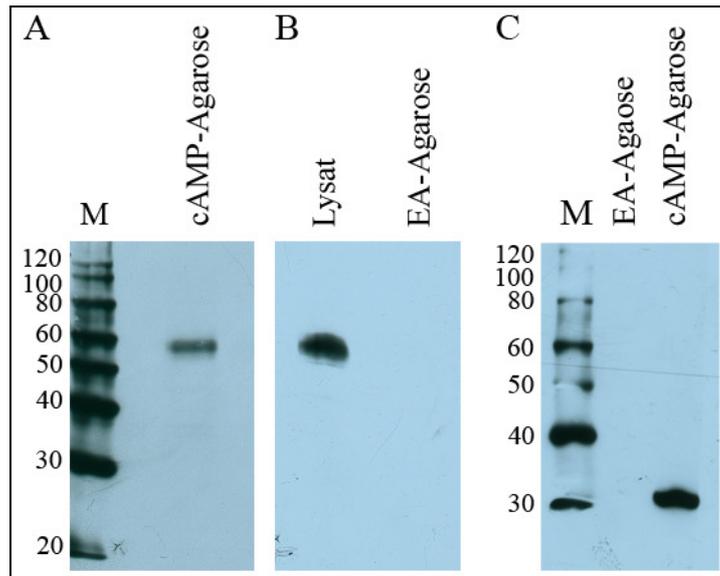


Abb. 5-32. Popdc1 bindet an cAMP-Agarose

Popdc1 wird mit cAMP-Agarose präzipitiert (A). In der Spur der Ethanolamin-Agarose (EA-Agarose) wird kein Signal detektiert (B). Der C-Terminus von Popdc1 präzipitiert mit der cAMP-Agarose aber nicht mit der EA-Agarose (C). M: Marker

5.3.5 Popdc1 kann mit cAMP und cGMP von der cAMP-Agarose eluiert werden

Popdc1 kann wie unter 5.3.4 gezeigt wurde mit cAMP-Agarose präzipitiert werden. Um zu überprüfen, ob Popdc1 auch wieder von der cAMP-Agarose eluiert werden kann, wurde Herzhomogenat mit cAMP-Agarose inkubiert und anschließend wurden die Präzipitate mit 15mM cAMP, cGMP, ATP und als Kontrolle mit Puffer inkubiert. Western Blot Analysen zeigten, dass mit cAMP und cGMP aber nicht mit ATP Popdc1 teilweise von der cAMP-Agarose eluiert werden konnte (Abb. 5-33).

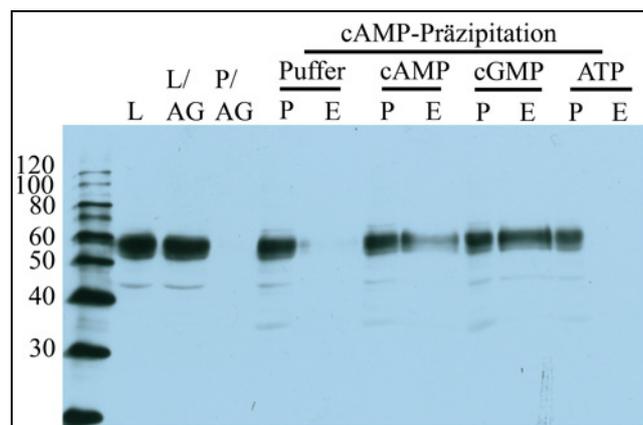


Abb. 5-33: Western Blot der Popdc1-Elution von der cAMP-Agarose

Popdc1 bindet an die cAMP-Agarose (P) und kann in den Eluaten (E) mit cAMP und cGMP detektiert werden. Im ATP-Eluat wird Popdc1 nicht erkannt. L: Lysat; L/AG: Lysat nach Vorreinigung mit Ethanolamin-Agarose; P/AG: Pellet der Ethanolamin-Agarose nach der Vorreinigung

5. Ergebnisse

Die Elution von gebundenem Popdc1 an cAMP-Agarose konnte in einem weiteren Experiment, bei dem eine aufsteigende Konzentrationen von cAMP eingesetzt wurde, bestätigt werden. Die Menge des eluierten Popdc1-Proteins war dabei proportional der Konzentration an freiem cAMP (

Abb. 5-34).

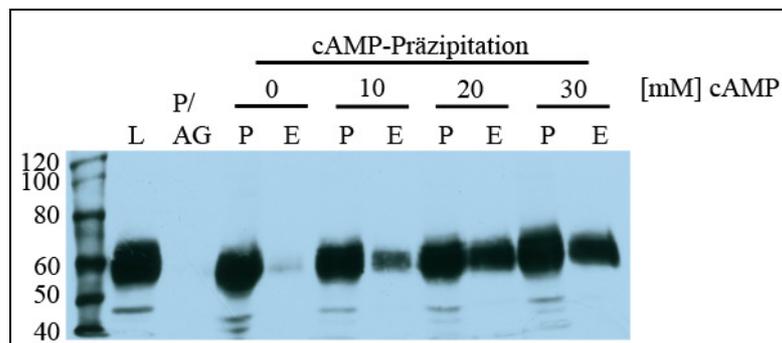


Abb. 5-34: Western Blot der Popdc1-Elution von der cAMP-Agarose mit ansteigenden Konzentrationen an freiem cAMP

Popdc1 bindet an die cAMP-Agarose (P) und wird mit ansteigenden Konzentrationen von cAMP von der cAMP-Agarose eluiert (E). L: Lysat; P/AG: Pellet der Ethanolamin-Agarose

5.3.6 Konkurrenz der Popdc1-Bindung an cAMP-Agarose durch cGMP und cAMP

Es wurde auch geprüft, ob die Inkubation des Herzhomogenats mit freiem cAMP bzw. mit cGMP die Bindungskapazität des Popdc1-Proteins absättigt und dadurch die Bindung an die cAMP-Agarose kompetitiert wird. Eine vollständige Konkurrenz erfolgte mit cAMP, während die gleiche Menge an cGMP die Bindung nicht vollständig kompetitieren konnte (Abb. 5-35 A).

In Abb. 5-35 B und C sind Western Blots dargestellt, in denen Herzhomogenate mit fallenden Konzentrationen an cAMP bzw. cGMP inkubiert wurden, bevor eine cAMP-Präzipitation durchgeführt wurde. Als Kontrolle wurde wieder Wasser anstelle des zyklischen Nukleotids verwendet. Es zeigte sich, dass mit abfallender Konzentration des zyklischen Nukleotids mehr Popdc1 an die cAMP-Agarose binden kann. D.h. eine vollständige Konkurrenz wird nur bei einer hohen Konzentration des zyklischen Nukleotids erreicht.

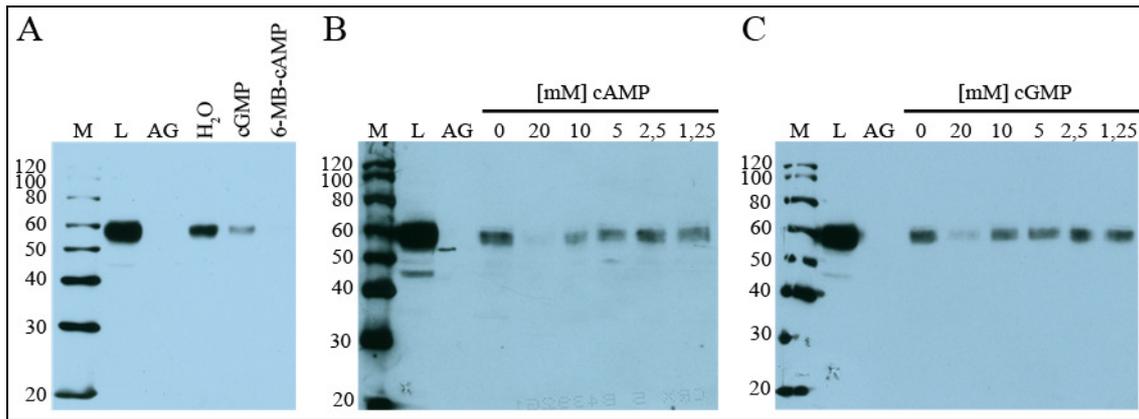


Abb. 5-35: Western Blots von cAMP-Agarose präzipitierten Popdc1 nach Konkurrenz mit zyklischen Nukleotiden

Vor der cAMP-Präzipitation wurde Hühnerherzlysat mit cAMP, cGMP oder Wasser anstelle des zyklischen Nukleotids inkubiert. Eine Konkurrenz findet mit cAMP statt. Mit cGMP konnte die Bindung von Popdc1 an die cAMP-Agarose reduziert werden (A). Die Konkurrenz mit cAMP wird mit abfallender cAMP-Konzentration (B) bzw. cGMP-Konzentration (C) schwächer.

5.3.7 Popdc1, Popdc2 und Popdc3 binden an cAMP

Da die *Popeye*-Domänen der drei Popdc1-Proteine eine sehr ähnliche Proteinsequenz und vermutlich auch eine nahezu identische Tertiärstruktur aufweisen, wurde die Möglichkeit getestet, ob neben Popdc1 auch Popdc2 und Popdc3 in der Lage sind, an cAMP-Agarose zu binden. Dazu wurden mit Myc-Epitop markierte Popdc1-, 2- und 3-Konstrukte in Cos7-Zellen transfiziert. Alle drei Popdc1-Proteine sind in der Lage an die cAMP-Agarose zu binden (Abb. 5-36). So wurde im Western Blot in den Spuren der cAMP-Präzipitation ein Signal bei über 60 kDa für Popdc1-myc sowie für Popdc2-myc erkannt und bei ca. 45 kDa wurden zwei Banden für Popdc3-myc erkannt. Diese Signale bestehen aus jeweils mehreren Banden, die vermutlich auf posttranslationale Modifikationen zurückzuführen sind und in der Abbildung mit einer Klammer versehen sind. Die Sterne weisen auf das unmodifizierte Protein hin, deren erwartetes Molekulargewicht ohne Myc-Epitop bei ca. 41 kDa für Popdc1 und Popdc2 liegt und bei Popdc3 bei ca. 33 kDa liegt. Das Myc Epitop ist ca. 10 kDa groß, so dass die Größe für Popdc1-myc und Popdc2-myc bei ca. 51 kDa liegt. Popdc3-myc hat folglich eine Größe von ca. 43kDa.

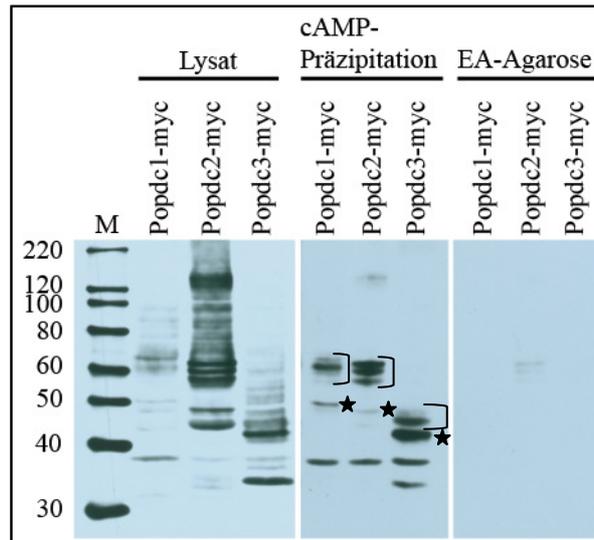


Abb. 5-36: Alle drei Popdc1-Proteine interagieren mit cAMP

Popdc1, Popdc2 und Popdc3 werden mit der cAMP-Agarose präzipitiert, während keine Präzipitation mit der Ethanolamin-Agarose detektiert werden kann. Klammern markieren die posttranslational modifizierten Proteine, Sterne weisen auf das unmodifizierte Protein hin.

Die *Popeye*-Domäne der einzelnen Popdc1-Proteine ist hoch konserviert. 17 Aminosäuren sind invariant bzw. nahezu invariant. Darunter sind zwei Motive, DSPE und FQVT, die keine Variationen innerhalb der Popdc-Proteine zeigen. Die *Popeye*-Domäne zeigt in der Sekundär- und Tertiärstruktur starke Ähnlichkeiten mit zyklischen Nukleotid-Bindungsproteinen wie der PKA auf. Versuche zeigten, dass alle 3 Popdc-Proteine fähig sind an cAMP-Agarose zu binden. Diese Bindung kann durch cAMP und cGMP kompetitiert werden. Eine Elution von der cAMP-Agarose war mit freiem cAMP möglich. Die bisher durchgeführten Versuche wiesen auf eine hohe Affinität des Popdc1-Proteins zum cAMP hin. Es waren aber bisher Quantitative Betrachtungen nicht möglich und es müssen weitere Versuche folgen, um den Bindungsbereich relativ zu den physiologisch vorkommenden Konzentrationen an zyklischen Nukleotiden zu bestimmen.

Die *Popeye*-Proteine stellen neben EPAC (exchange factor directly activated by cAMP), cyclic nucleotide gated channels (CNG), CAP und PKA stellen eine weitere Gruppe von zyklischen Nukleotid-bindenden Proteinen dar, die in den Kontext der anderen eukaryotischen cNMP-bindenden Proteine noch zu bringen sind. Die putative Nukleotidbindungskassette unterscheidet sich stark von bisher bekannten Phosphatbindungskassetten. So fehlt der Nukleotidbindungskassette der Argininrest, der mit der Phosphatgruppe des cAMPs interagiert.

Erste Mutationsversuche einzelner Aminosäuren der beiden hochkonservierten Motive DSPE und FQVT weisen darauf hin, dass die Bindung sehr wahrscheinlich über diese beiden Motive vermittelt wird. Folgende Mutationen wurden in *Popdc1* der Maus eingeführt: D200A,

P202A, E203A und V217F. Diese Mutationen zeigten eine unterschiedliche Bindungsaffinität zu cAMP und cGMP und lassen sich im Vergleich zum Wildtyp folgendermaßen zusammenfassen: Die cAMP-Bindungsaffinität ist $P202A > WT > E203A > V217F > D200A$, die cGMP-Bindungsaffinität ist $P202A > WT > E203A \geq V217F > D200A$ (Kuhutz, Diplomarbeit, 2008).

5.4 Popdc1 und TREK1

5.4.1 Popdc1 moduliert den TREK1-Hintergrundstrom

Der Hintergrundkanal TREK1 wird wie Popdc1 im Herzen exprimiert. Beide Proteine zeigen eine Regulation durch cAMP. Während TREK1 indirekt durch cAMP über PKA-Phosphorylierung inhibiert wird (Fink et al., 1996), bindet Popdc1 direkt an cAMP. Popdc2 zeigt eine Funktion in der Stressadaptation der Schrittmacheraktivität (Froese et al., eingereicht). Ähnliche elektrophysiologische Ergebnisse konnten auch für Popdc1 erhoben werden (siehe 5.1). TREK1 ist in der Aufrechterhaltung des Ruhepotentials involviert (Lesage and Lazdunski, 2000). Um eine Modulierung des TREK1-Stroms durch Popdc zu untersuchen, wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Erhard Wischmeyer, Physiologie II der Universität Würzburg elektrophysiologische Messungen an Froschoozyten mittels der Zwei-Elektroden-Klemme durchgeführt. Die *Xenopus* Oozyten wurden mit Popdc1, -2, -3 und TREK1 injiziert. Des Weiteren wurde der Einfluss von β -adrenerger Stimulation getestet, indem zusätzlich der humane β_1 -adrenerge Rezeptor $h\beta_1$ -AR injiziert und die Inhibition des TREK1-Stroms durch Zugabe von Isoproterenol bestimmt wurde. Die Stromstärke wurde bei einer Haltespannung von 30mV gemessen.

Wurde TREK1 alleine in Froschoozyten injiziert, so war der Strom wesentlich geringer als wenn TREK1 zusammen mit Popdc1 injiziert wurde (Abb. 5-37 A). Popdc1 erhöhte den TREK1-Strom auf ca. das Doppelte (Abb. 5-37 B). Eine Koinjektion von Popdc1 und TASK1, einem weiteren Zwei-Poren-Domänen-Kanal zeigte hingegen keine Veränderung in der Konduktivität. Außerdem konnte bei alleiniger Injektion von Popdc1 in Froschoozyten kein Strom gemessen werden (Beobachtung Prof. Dr. E. Wischmeyer). Dies zeigt, dass es sich sehr wahrscheinlich um eine selektive Interaktion zwischen Popdc1 und TREK1 handelt und das Popdc1 selbst kein Ionenkanal ist. Gleiche Messungen des TREK1-Stroms wurden auch mit den anderen Familienmitgliedern der Popdc-Familie sowie von Proteinen, die eine Mutation in der *Popeye*-Domäne trugen, durchgeführt. Bei der Mutation handelte es sich um die Mutation D200A im DSPE-Motiv von Popdc1, bei der die saure Aminosäure Asparaginsäure gegen die neutrale Aminosäure Alanin ausgetauscht wurde. Diese Mutation in

der zyklischen Nukleotidbindungsdomäne führte in cAMP-Bindungsstudien zu einer geringeren Affinität des Popdc1-Proteins zum cAMP (Kuhtz, Diplomarbeit, 2008). Während Popdc2 und Popdc3 den TREK1-Strom im Mittel um ca. 80% erhöhten, war der Stromfluss bei Injektion mit der Punktmutante nur um 24% erhöht. Die Modulation des TREK1-Stroms schien bei Popdc1 am größten.

Die Inhibition des TREK1-Stroms durch cAMP und der Einfluss von Popdc1-Proteinen, wurde mit Hilfe der Koinjektion des β -adrenergen Rezeptors und Zugabe von Isoproterenol getestet. Der TREK1-Strom wurde durch Isoproterenol um ca. 50% inhibiert (Abb. 5-37 C und D). Der erhöhte TREK1-Strom in Anwesenheit von Popdc1 wurde nach Zugabe von Isoproterenol um 75% inhibiert. D.h. das Ausmaß der adrenerg-induzierten Inhibition des TREK1-Kanals war in Anwesenheit von Popdc1 um 25% erhöht (Abb. 5-37 D). Im Unterschied zu Popdc1 hatte Popdc2 keinen Einfluss auf die β -adrenerge Inhibition des TREK1-Kanals. Popdc3 und die Popdc1-cAMP Bindungsmutante (Popdc1D200A) hatten im Vergleich zu dem wildtypischen Popdc1 Protein nur einen geringen Einfluss auf die Inhibition der TREK1-Konduktivität.

Popdc1 scheint folglich der größte Modulator der TREK1-Konduktivität unter den Popdc-Proteinen zu sein. Dieses Proteinfamilienmitglied erhöhte den TREK1-Strom am meisten und reduzierte nach β -adrenerger Stimulation die Konduktivität am stärksten. Außerdem zeigte die cAMP-Bindungsmutante von Popdc1 eine geringe Erhöhung des TREK Stroms und dementsprechend eine, im Vergleich zum Wildtypprotein, deutlich reduzierte Inhibition nach adrenerger Stimulation.

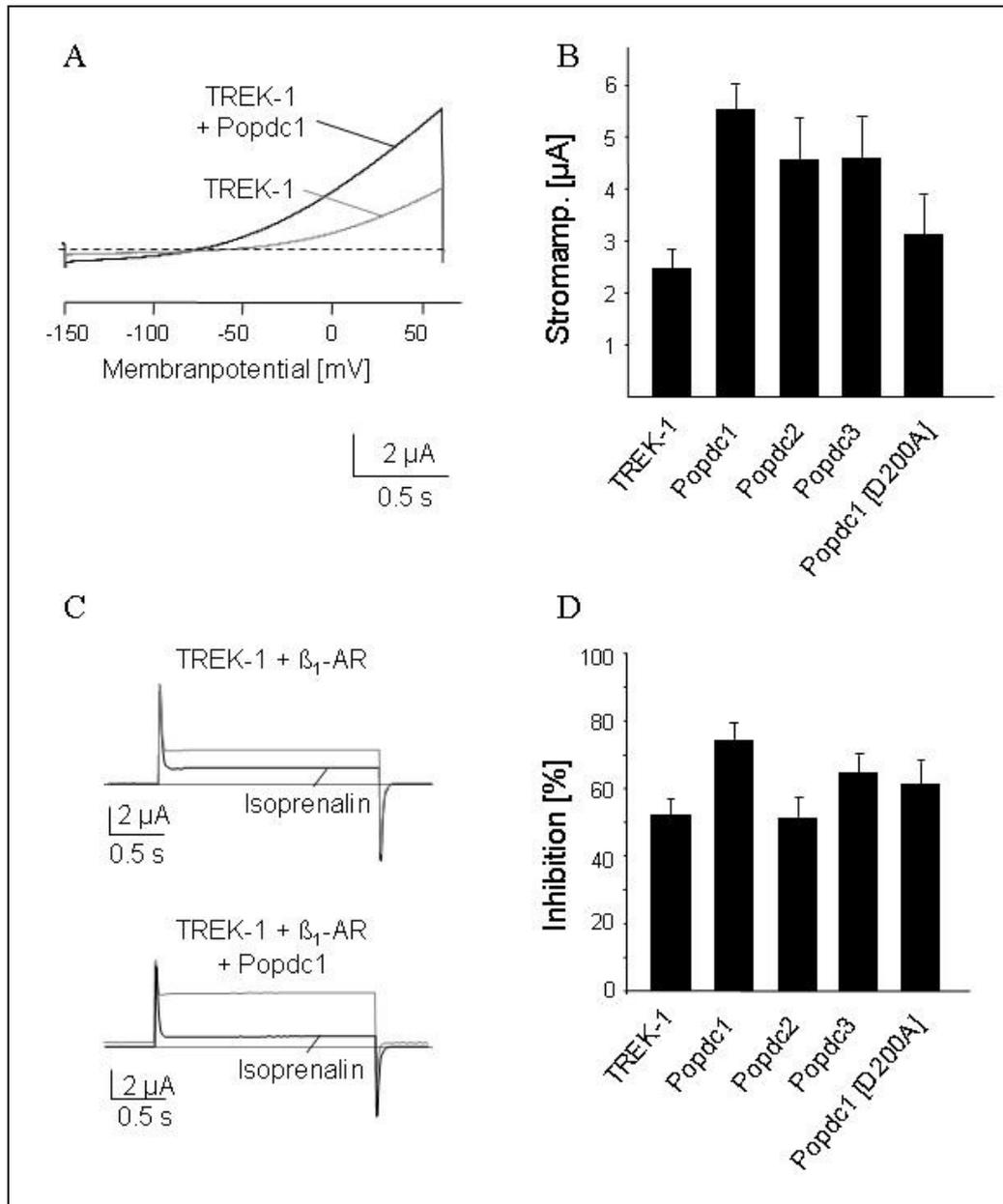


Abb. 5-37: TREK1-Ströme in Froschoozyten in Ab- und Anwesenheit von Popdc-Proteinen

Die Messung der Stromstärke zeigt, dass der TREK1-Strom in Anwesenheit von Popdc1 auf ca. das Doppelte erhöht ist (A). Die TREK1-Stromstärke wird durch die Anwesenheit von Popdc1 um ca. das Doppelte, von Popdc2 und 3 um ca. 80% sowie von der Popdc1[D200A]-Mutanten um ca. 25% erhöht (B). Nach β -adrenerger Stimulation ist die Konduktivität des TREK1-Kanals um ca. 50% herabgesetzt (C, oben), die erhöhte Konduktivität von TREK1 durch Popdc1 wird nach β -adrenerger Stimulation um ca. 75% gesenkt (C, unten).

Tabelle 5-1: TREK1-Ströme in Froschoozyten in An- und Abwesenheit von Popdc-Proteinen

		+Popdc1	+Popdc2	+Popdc3	+Popdc1 [D200A]
TREK-1 Amplitude $\mu\text{A} \pm$ (SEM)	2.57 \pm 0.33 (n=22)	5.10 \pm 0.48 (n=19)	4.55 \pm 0.79 (n=15)	4.61 \pm 0.78 (n=14)	3.19 \pm 0.76 (n=10)
TREK-1+ β1- AR Inhibition [%]	52.3 \pm 4.83	74.6 \pm 4.96	51.6 \pm 5.82	64.9 \pm 5.30	60.9 \pm 6.61

5.4.2 Popdc1 und TREK1 kolokolisieren partiell im Herzgewebe

Aufgrund der Steigerung der Konduktivität von TREK1 in Froschoozyten in Anwesenheit von Popdc1 sollte überprüft werden, ob die beiden Proteine im Herzen kolokolisieren. Dazu wurden Popdc1- und TREK1-Immunfärbungen auf Gefrierschnitten von ventrikulärem Gewebe durchgeführt. Popdc1 war wie oben schon erwähnt in den lateralen Membranen der Myozyten, den Glanzstreifen und in den T-Tubuli lokalisiert (Abb. 5-38 A und D). In den Membranen konnte TREK1 auch detektiert werden. Dies stimmt überein mit einer vorherigen Studie mit isolierten Myozyten aus der Ratte (Xian Tao et al., 2006). Die Überlagerung der beiden Expressionsdomänen zeigte, dass TREK1 und Popdc1 in den lateralen Membranen zum Teil kolokolisiert waren, dass aber das TREK1-Signal wesentlich breiter schien und über die Expressionsdomäne von Popdc1 hinaus ging. Ob es sich um eine Expression in Nichtmuskelzellen handelt, ist noch offen. Des Weiteren wurde TREK1 auch in den T-Tubuli und in den Glanzstreifen detektiert. Dort ist das Signal aber wesentlich schwächer (Abb. 5-38 B und C), schien aber mit Popdc1 zu kolokolisieren. (Abb. 5-38 C und F).

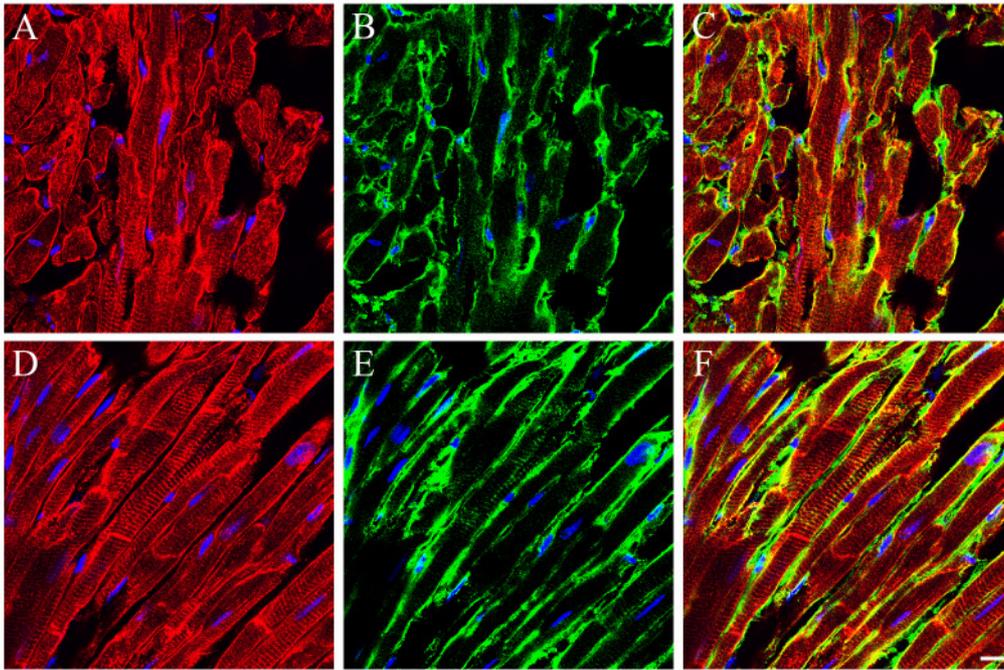


Abb. 5-38: Popdc1 und TREK1 kolokalisieren in ventrikulären Myozyten

Popdc1 zeigt die schon erwähnte Lokalisierung in den Glanzstreifen, den lateralen Membranen und in den T-Tubuli (A,D), TREK1 ist in den lateralen Membranen lokalisiert und zum Teil in den Glanzstreifen sowie in einer Querbänderung (B,E), die Übereinanderlagerung beider Proteinsignale zeigt eine partielle Kolokalisierung in den lateralen Membranen, in der Querbänderung und in den Glanzstreifen (C,F). Maßstab 10µm.

Um zu überprüfen, ob TREK1 eine Expression im Reizleitungssystem aufweist und mit Popdc1 dort kolokalisiert ist, wurden Schnitte von SAN- und AVN-Gewebe gegen Popdc1 und TREK1 (Abb. 5-39 B-D und F-H) gefärbt. Zur Identifizierung des SAN (Abb. 5-39 A) und des ventrikulären Reizleitungssystems (Abb. 5-39 E) wurden konsekutive Schnitte mit HCN4 angefärbt. Es zeigte sich, dass TREK1 (Abb. 5-39 C) im SAN exprimiert wurde, Die Expressionsstärke schien der im atrialen Gewebe äquivalent zu sein. Neben der Expression im atrialen und im Sinusknotengewebe, schien TREK1 auch im Bindegewebe exprimiert zu sein. Ähnlich sah es im ventrikulären Reizleitungssystem aus. Während dort die Expression von Popdc1 (Abb. 5-39 F) und HCN4 (Abb. 5-39 E) erhöht war, war die von TREK1 (Abb. 5-39 G) gegenüber den ventrikulären Septum gleich. TREK1 schien auch hier wieder im Bindegewebe exprimiert zu sein. Popdc1 und TREK1 waren im Reizleitungssystem und im Arbeitsmyokard kolokalisiert (Abb. 5-39 D und H).

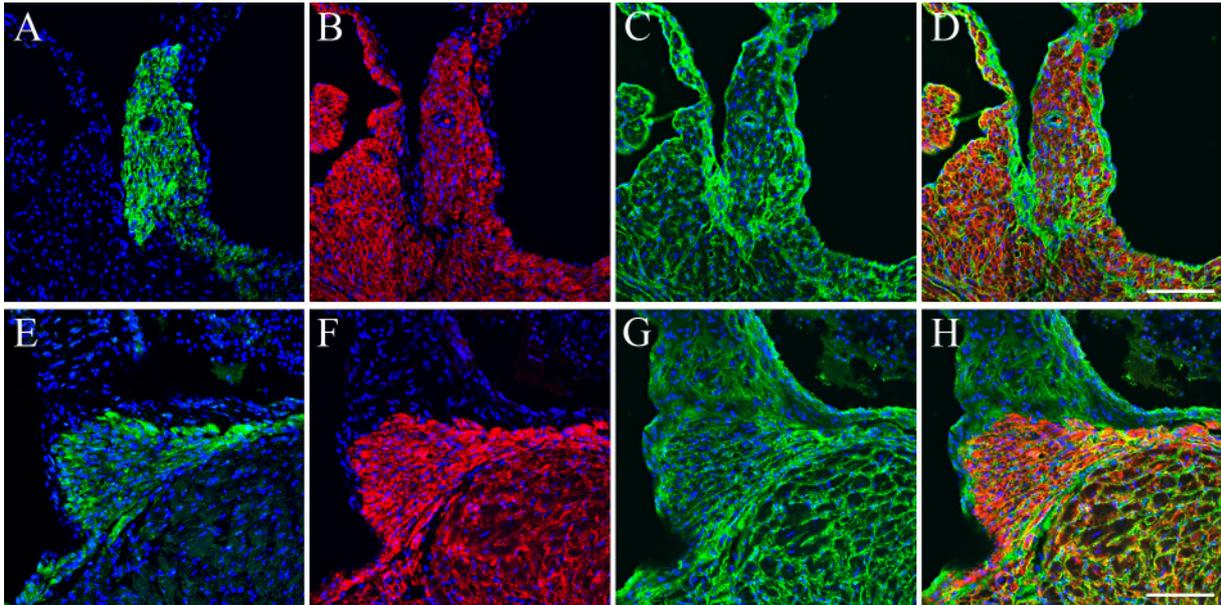


Abb. 5-39: Popdc1 und TREK1 kolokalisieren im Reizleitungsgewebe und Arbeitsmyokard.

In (A) und (E) sind konsekutive Schnitte zu (B-D, Sinusknoten) bzw. (F-H, ventrikuläres Reizleitungsgewebe) aufgeführt und zeigen zum Markieren des Reizleitungsgewebes eine HCN4-Färbung auf. (B) und (F) zeigen die Popdc1- und (C) und (G) die TREK1- Färbung. In (D) und (H) sind die Übereinanderlagerung von (B) und (C) bzw. (F) und (G) zu sehen. Popdc1 kolokalisiert mit HCN4 im Reizleitungsgewebe und mit TREK1 zusätzlich im Arbeitsmyokard. Maßstab: 100µm

Aufnahmen der Popdc1- und TREK1-Lokalisation im Arbeitsmyokard in höherer Auflösung zeigten, wie oben schon erwähnt, eine identische Proteindistribution von Popdc1 und TREK1 in den lateralen Membran von ventrikulären Myozyten (Abb. 5-40 D-F). Auch in atrialen Myozyten war eine Kolokalisierung in den Membranen zu erkennen (Abb. 5-40 A-C). Im ventrikulären Reizleitungssystem des His-Bündels (Abb. 5-40 J-L) sowie im Sinusknoten (Abb. 5-40 G-I) wurde in den Membranen eine Kolokalisierung aufgezeigt. Diese war nicht immer vollständig überlappend.

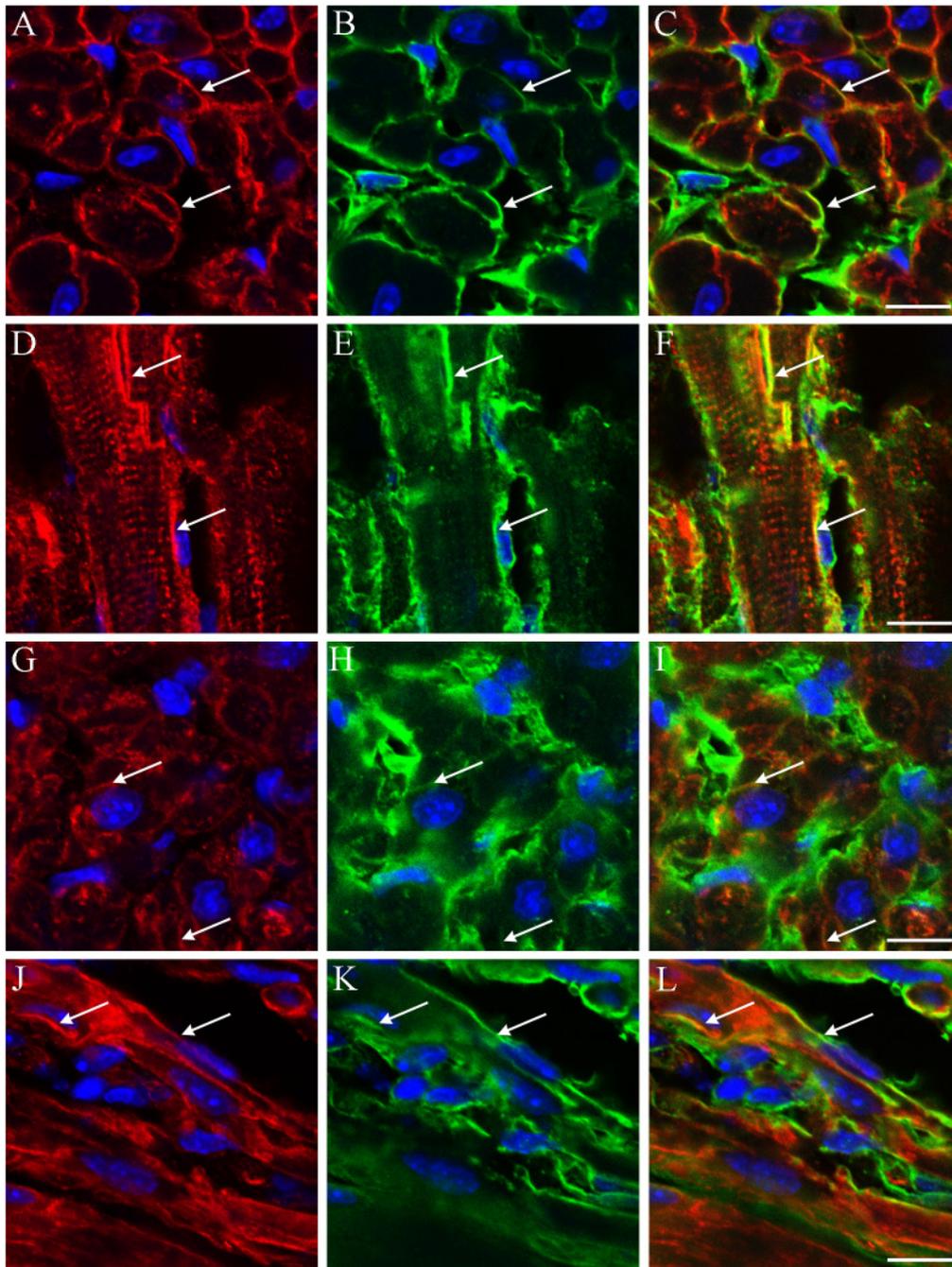


Abb. 5-40: Popdc1 und TREK1 kolokalisieren partiell in den verschiedenen Geweben des Herzens

Im Atrium (A-C), im Ventrikel (D-F), im SAN (G-I) sowie im ventrikulären Reizleitungssystem (im His-Bündel) (J-L) sind Popdc1 und TREK1 kolokalisiert. Pfeile weisen auf Kolokalisierungen hin. (A,D,G und J) Popdc1-Färbung, (B,E,H und K) TREK1-Färbung (C,F,I und L) Übereinanderlagerung von (A) und (B), (D) und (F), (G) und (H) sowie (J) und (K). Maßstab: 10 μ m

Weiterhin wurde geschaut, ob sich die Lokalisation von TREK1 in den *Popdc1*-Nullmutanten im Sinusknoten verändert. Dazu wurden die Sinusknoten von Wildtyp und *Popdc1*-Mäusen mit TREK1 und Popdc1 gefärbt. Es zeigte sich keine Veränderung der TREK1-Distribution in den *Popdc1*-Mäusen.

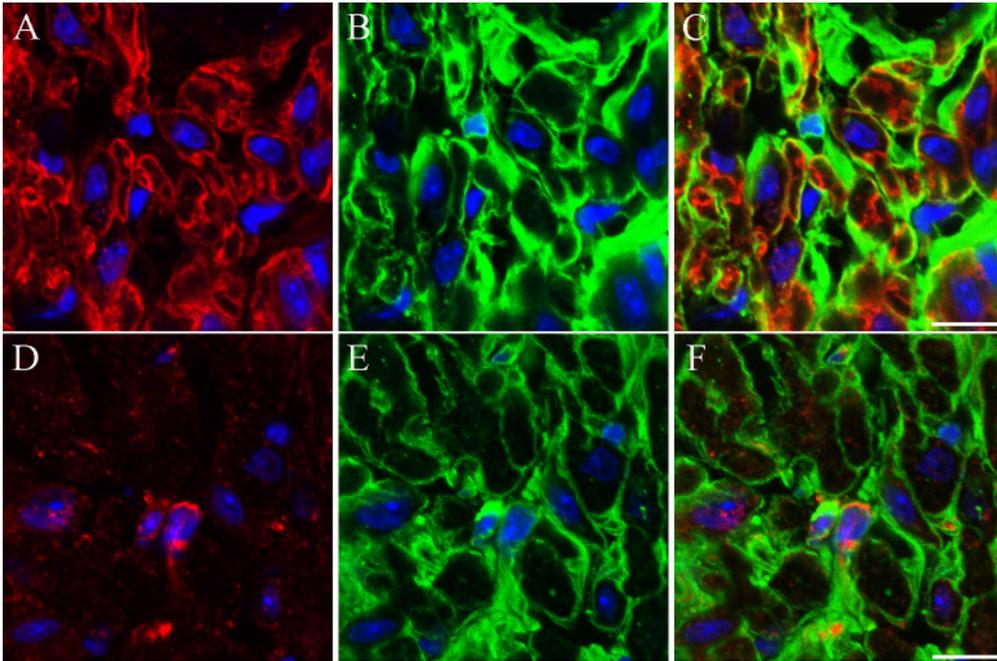


Abb. 5-41: Die Lokalisation von TREK1 in Sinusknotenzellen von Wildtyp- und *Popdc1*-Mäusen
Die Verteilung von TREK1 (B, E) ist zwischen Wildtyp (A-C) und *Popdc1*-Maus (D-F) unverändert. In (A) und (D) ist die Färbung von Popdc1 und in (C) und (F) ist die übereinandergelagerte Färbung abgebildet. Maßstab: 10µm.

5.4.3 Die Lokalisation von Popdc1 und TREK1 in isolierten Myozyten

In isolierten kardialen Myozyten wurde Popdc1 wie oben schon beschrieben in den lateralen Membranen, in den Glanzstreifen als auch in den T-Tubuli detektiert. Auch TREK1 zeigte eine ähnliche Lokalisation. So wurde das Protein in den T-Tubuli lokalisiert (Abb. 5-42 Abb. B, E und E''') sowie auch partiell in der Membran (Abb. 5-42 B, C, E und E''') und war mit Popdc1 dort auch kolokalisiert (Abb. 5-42 C-F'''). In Abb. 5-42 D-F, D'-F' und D'''-F''' wurde jeweils die gleiche Zelle dargestellt. In Abb. 5-42 D-F wurde die Kardiomyozyte in kleiner Vergrößerung abgebildet während in Abb. 5-42 D'-F' und Abb. 5-42 D'''-F''' dieselbe Kardiomyozyte vergrößert gezeigt wird. Der Unterschied zwischen Abb. 5-42 D'-F' und Abb. 5-42 D'''-F''' ist, dass die Kardiomyozyte in verschiedenen Ebenen dargestellt wurde. In Abb. 5-42 D'-F' wurde die Zelle mehr zur Oberfläche hin abgebildet. Hier schien es so, dass TREK1 (Abb. 5-42 E') entlang einer Längsbänderung angeordnet war. Auch Popdc1 wurde in dieser Längsbänderung lokalisiert (Abb. 5-42 D') und zeigte auch Kolokalisation mit TREK1 (Abb. 5-42 F'). In Abb. 5-42 D'''-F''' ist eine tiefere Ebene dargestellt. In dieser Ebene war TREK1 in den T-Tubuli lokalisiert und zeigte eine räumliche Nähe zu Popdc1.

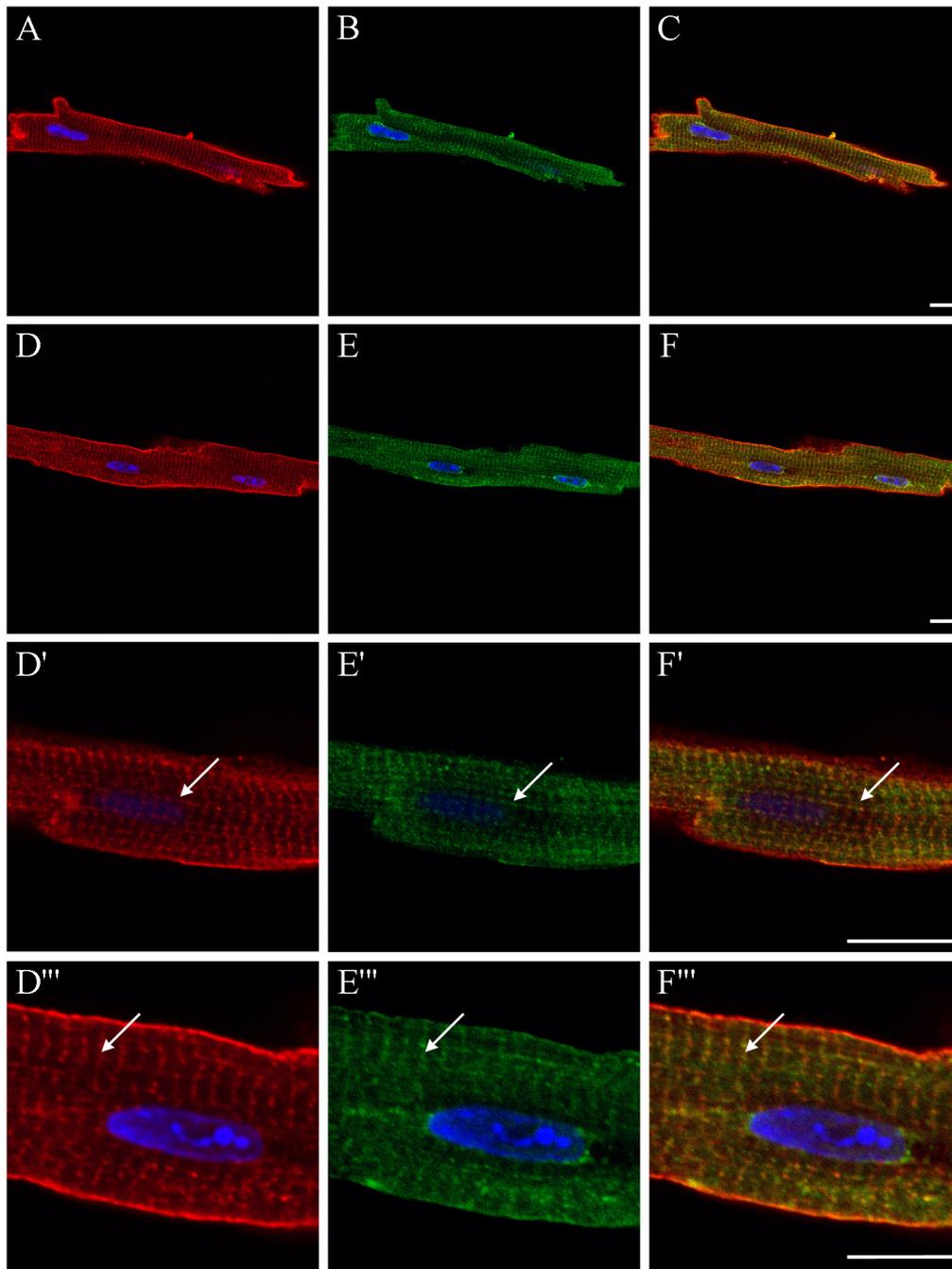


Abb. 5-42: Die Lokalisation von Popdc1 und TREK1 in isolierte kardialen Myozyten

Popdc1 (A, D, D' und D''') zeigt die typische Popdc1-Distribution entlang der lateralen Membran und den T-Tubuli. TREK1 (B, E, E' und E''') zeigt auch eine Lokalisation in den T-Tubuli (B und E sowie E''' weißer Pfeil) und auch teilweise in den lateralen Membranen. Diese Lokalisationen überlappen mit der Popdc1-Distribution (C, F, F' und F'''). An der Oberfläche ist die TREK1 eher in einer Längsbänderung zu erkennen (E'), die mit Popdc1 kolokalisiert (F'). Maßstab: 10 μ m

Um die visuelle Kolokalisation von Popdc1 und TREK1 zu verifizieren, wurden die Profile der Proteinverteilung entlang der Quer- und der Längsbänderung gemessen (Abb. 5-43). Bei den abgebildeten Zellen handelt es sich um die Zellen, die bereits in Abb. 5-42 C bzw. F dargestellt wurden. Die Profile zeigen, dass Popdc1 und TREK1 stark überlappende

Expressionsdomänen besitzen. Dies gilt sowohl für das Profil entlang der T-Tubuli als auch für das Profil entlang der Längsbänderung (Abb. 5-43 C'' sowie F'').

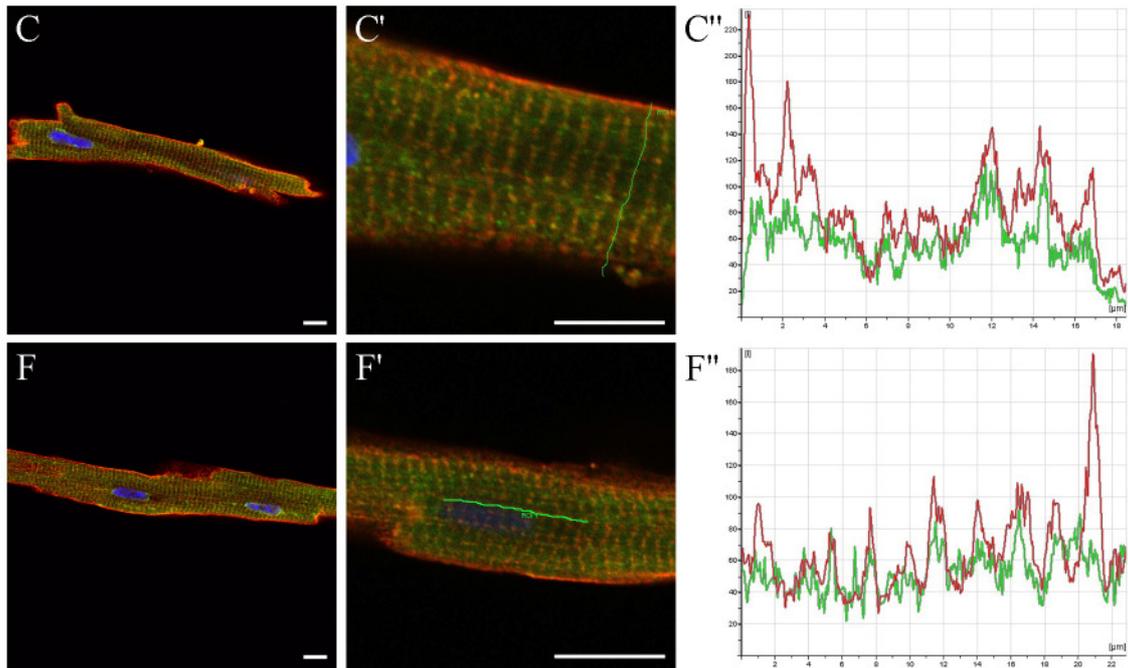


Abb. 5-43: Profile der Popdc1- und TREK1-Distribution

Popdc1 (rot) und TREK1 (grün) zeigen eine ähnliche Verteilung in den T-Tubuli (C' und C'') sowie in der Längsbänderung (F und F'). Die Peaks der Profile in C'' und F'' sind überlappend. Die Profile wurden entlang der grünen dünnen Linie gemessen. Maßstab: 10 µm

5.4.4 Lokalisation von Popdc1-myc und TREK1-flag in Cos7-Zellen

Um die Frage der Kolo-kalisation beider Proteine weiter zu untersuchen, wurde Popdc1 mit einem fusionierten Myc-Epitop in Cos7-Zellen transfiziert. Popdc1-myc war perinukleär, vermutlich im ER lokalisiert. Teilweise fand man auch eine Lokalisation an der Plasmamembran (Abb. 5-44 A-C). Transfektion mit einem TREK1-flag-Fusionsprotein zeigte eine Lokalisierung dieses Proteins in Filopodien, die bekanntermaßen von TREK1 induziert werden (Lauritzen et al., 2005) (Abb. 5-44 D-F).

Bei einer gleichzeitigen Transfektion beider Konstrukte veränderte sich die subzelluläre Distribution von Popdc1. In Abb. 5-45 A-C sind drei Beispiele gezeigt von Zellen, die mit Popdc1 und TREK1 kotransfiziert wurden und eine veränderte Popdc1-myc-Lokalisation aufweisen. Popdc1 wurde nun vorwiegend in der Membran detektiert. Des Weiteren war Popdc1 in den TREK1-induzierten Filopodien zu finden. Im zytoplasmatischen Bereich war Popdc1-myc nach Kotransfektion mit TREK1-flag nicht mehr überwiegend perinukleär verteilt, wie in den einzeln transfizierten Zellen, sondern zeigte eine Lokalisierung in einer kurzen streifenähnlichen Strukturen, bei denen es sich vermutlich um Aktin-reiche Strukturen

handelt. TREK1-flag zeigte bei Kotransfektion mit Popdc1-myc eine ähnliche Verteilung wie bei einer Einzeltransfektion (Abb. 5-45 D-F).

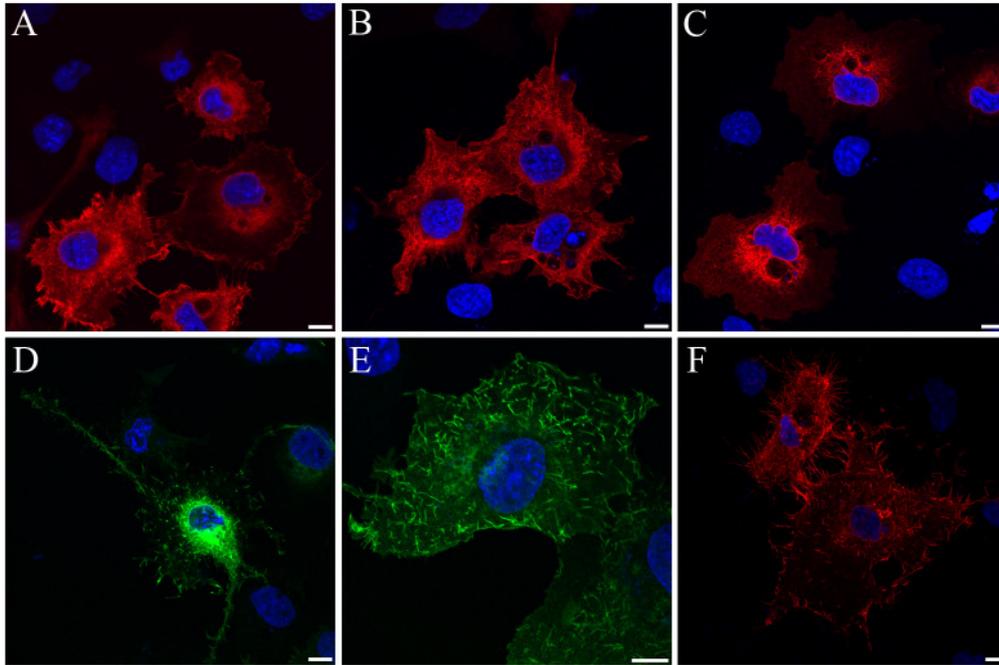


Abb. 5-44: Die Lokalisation von Popdc1-myc und TREK1-flag in Cos7-Zellen.

(A-C) zeigt drei Beispiele von Cos7-Zellen, die mit Popdc1-myc transfiziert wurden, während (D-F) Cos7-Zellen zeigt, die mit TREK1-Flag transfiziert wurden. Popdc1-myc zeigt eine überwiegend perinukleäre Verteilung, TREK1-flag ist manchmal perinukleär aber in vielen Zellen in den filopodienartigen Strukturen lokalisiert. Maßstab 10µm (Abbildungen in Zusammenarbeit mit Roland Schindler, Universität Würzburg)

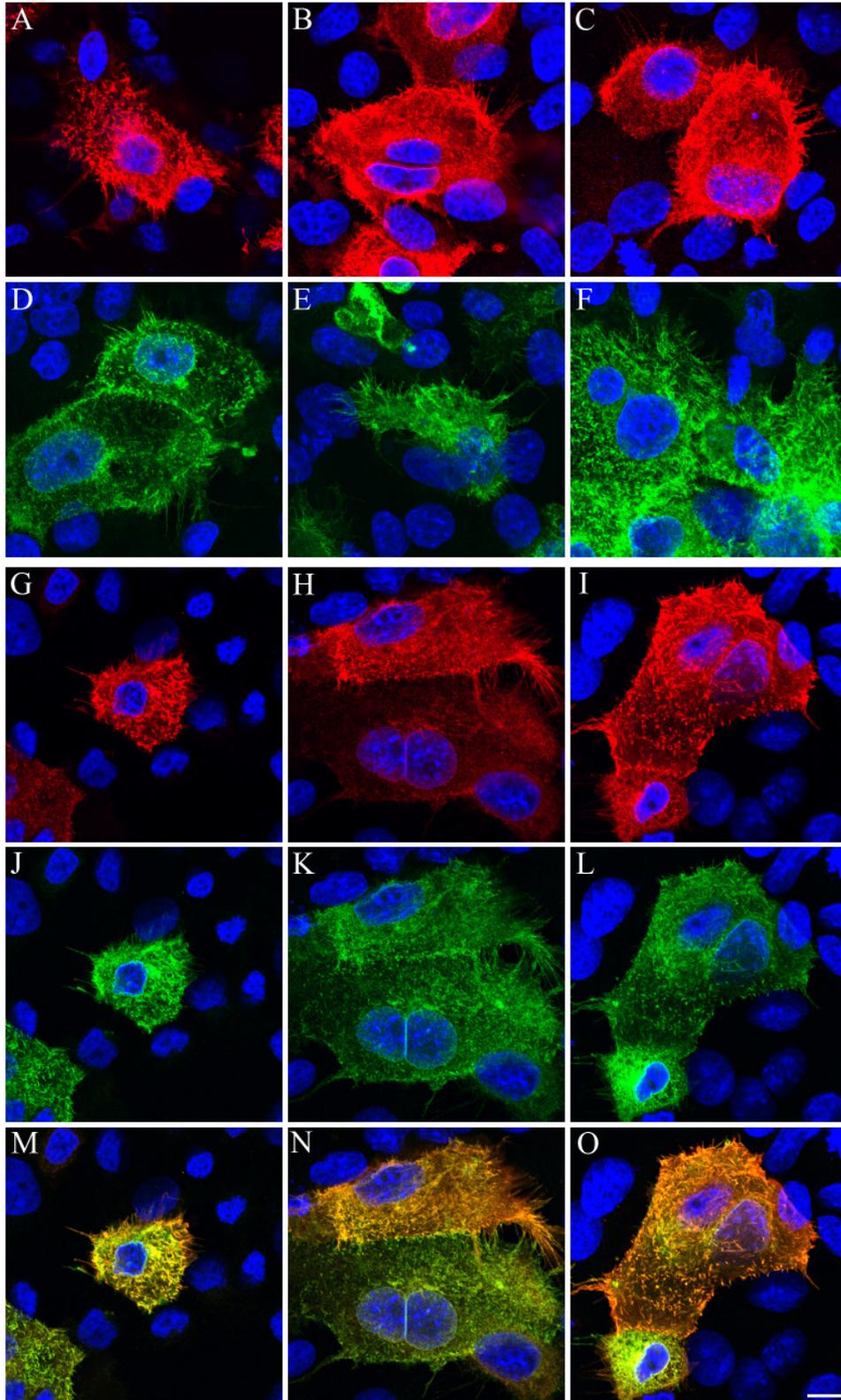


Abb. 5-45: Popdc1-myc und TREK1-flag kolokalisieren nach Kotransfektion beider Konstrukte

In (A-C) sind Cos7-Zellen dargestellt, in denen nur Popdc1-myc nachgewiesen wurde. Die Bilder (D-F) zeigen die Lokalisation von TREK1-flag in kotransfizierten Zellen. Beide Proteine wurden in den Zellausläufern sowie in den Streifen-ähnlichen Strukturen detektiert. Die Bilder (G-O) zeigen Doppelfärbungen von Popdc1-myc und TREK1-flag, wobei (G-I) die Lokalisierung von Popdc1-myc, (J-L) die Lokalisierung von TREK1-flag zeigt und (M-O) die Überlagerung von G und J in M, von H und K in N sowie I und L in O beider Proteine zeigt. Maßstab 10µm.

5.4.5 Interaktionsstudien für Popdc1 und TREK1

Da Popdc1 und TREK1 nach Kotransfektion eine Kolo-kalisation aufweisen, wurde überprüft, ob diese beiden Proteine direkt miteinander interagieren. Dazu wurden 293t-Zellen mit Popdc1-myc und TREK1-flag transfiziert und eine Immunopräzipitation mit anti Myc- bzw. anti Flag-Antikörpern durchgeführt, die kovalent an die Agarosen gekoppelten waren. Hinterher wurden die Proteine mittels eines anti Myc- bzw. anti Flag-Western Blots nachgewiesen. Es zeigte sich, dass Popdc1 durch TREK1 koimmunopräzipitiert werden konnte, wobei aber nur eine Bande, der sonst zu beobachtbaren Dreierbande, ein starkes Signal auf dem Western Blot machte (Abb. 5-46 oben). Eine Koimmunopräzipitation von TREK1 mit Popdc1 konnte bis jetzt nicht nachgewiesen werden (Abb. 5-46 unten).

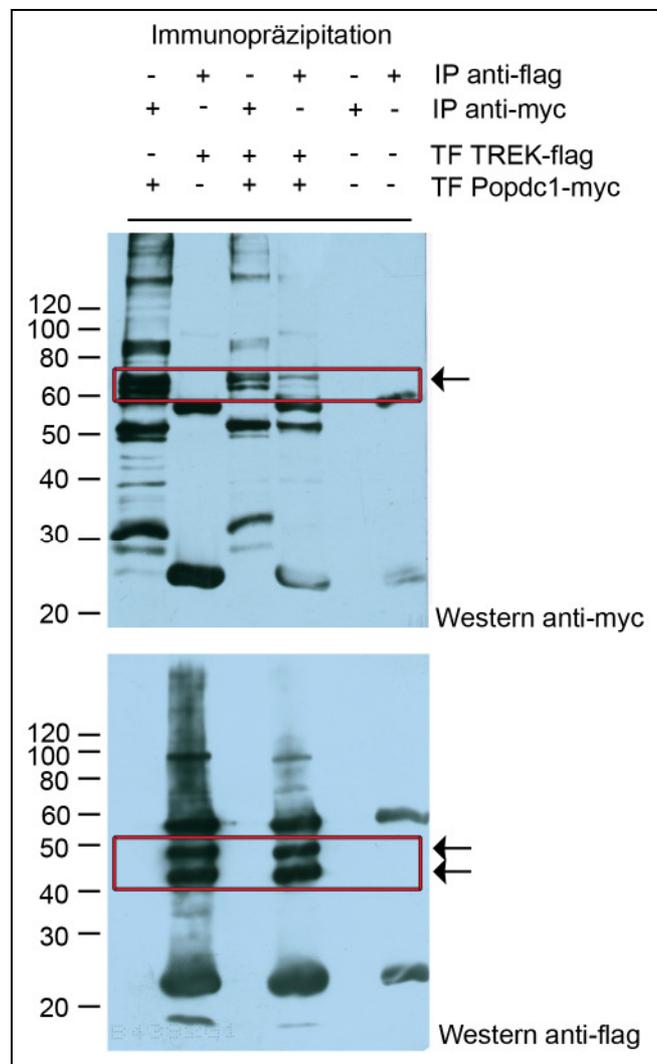


Abb. 5-46: Popdc1 koimmunopräzipitiert mit TREK1

Popdc1-myc und TREK1-flag wurden einzeln oder zusammen in 293t-Zellen exprimiert. Nach der Lyse wurden Immunpräzipitationen mit anti-Myc- bzw. anti-Flag-gekoppelten Agarosen mit anschließenden Western Blots (oben gegen Myc, unten gegen Flag) durchgeführt. Pfeile und rote Kästen weisen auf die Proteinbanden von Popdc1 bzw. TREK1 hin. IP: Immunopräzipitation

Die Untersuchungen an Popdc1 und TREK1 zeigten, dass die beiden Proteine miteinander interagieren. So zeigten Gefrierschnitte der verschiedenen Herzbereiche eine Kollokalisierung beider Proteine. Kotransfektion von TREK1-flag mit Popdc1-myc veränderte die subzelluläre Distribution von Popdc1. Popdc1 wurde in Anwesenheit von TREK1 in Filopodien nachgewiesen. Koimmunopräzipitationsversuche und elektrophysiologische Messungen des TREK1-Stroms in Froschoozyten in Anwesenheit von Popdc1 weisen auch auf eine Interaktion beider Proteine hin. Möglicherweise induziert TREK1 also eine Membrandomäne in die Popdc1 rekrutiert wird.

6 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der kardiale Phänotyp der *Popdc1*-Nullmutanten untersucht. Die *Popdc1*-Mäuse zeigten eine altersabhängige stressinduzierte Sinusbradykardie, die vermutlich auf einen Verlust an Sinusknotenzellen im inferioren Bereich des Sinusknotens zurückzuführen ist. Eine starke Expression von *Popdc1* wurde in Myozyten des kardialen Reizleitungssystems und im Atrium detektiert. In ventrikulären Myozyten ist *Popdc1* in der Plasmamembran, in den Glanzstreifen und im T-tubulären System exprimiert und mit verschiedenen Ionenkanälen und Transportern kolokalisiert. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit eine funktionelle Interaktion von *Popdc1* mit dem Zwei-Poren-Kanal TREK1 gezeigt werden. *Popdc1* scheint ein Modulator der Stressadaption des Sinusknotens zu sein. Das *Popdc1*-Protein weist eine strukturelle Ähnlichkeit zu Bindungsproteinen für zyklische Nukleotide auf. Eine Bindung von cAMP und cGMP an *Popdc1* konnte in kardialen Gewebekomplexen und in transfizierten Zellen demonstriert werden.

6.1 Die *Popdc1*-Maus zeigt ein geringeres Körpergewicht und Herzgewicht sowie einen geringeren Fettanteil

Bei den in dieser Arbeit verwendeten *Popdc1*-Mäusen wurde das erste kodierende Exon durch ein *LacZ*-Reportergen ausgetauscht. Die homozygoten Mäuse haben eine normale Lebensspanne und sind fertil. Das *LacZ*-Expressionsmuster von homo- und heterozygoten Mäusen zeigt starke Expression im Herzen fötaler und neonataler Mäuse, im Myotom und in den myogenen Vorläuferzellen der Extremitäten sowie in den Glattmuskelzellen diverser Organe (Andrée et al., 2002). Basierend auf dem bradykarden Phänotyp der *Popdc2*-Nullmutante (Froese et al., eingereicht) sollte in dieser Arbeit der kardiale Phänotyp der *Popdc1*-Mäuse charakterisiert werden.

Visuell auffällig an den *Popdc1*-Mäusen war, dass 8 Monate alte homozygote Tiere wesentlich dünner aussahen als Wildtypwurfgeschwister. Wurde die Bauchdecke der Mäuse geöffnet, so konnte festgestellt werden, dass die homozygoten *Popdc1*-Mäuse einen geringeren Fettanteil aufwiesen. Entsprechend war das Körpergewicht reduziert. 8 Monate alte homozygote männliche und weibliche Mäuse waren ca. um $\frac{1}{3}$ bzw. um $\frac{1}{4}$ leichter als der Wildtypwurfgeschwister. Auch das Herzgewicht war in den homozygoten männlichen und weiblichen Mäusen erniedrigt. Die Erniedrigung des Herzgewichts war aber nicht so stark wie die Reduktion des Körpergewichts, trotzdem war diese Reduktion statistisch signifikant. Der Quotient aus Herzgewicht und Körpergewicht war in homozygoten Mäusen bei beiden

Geschlechtern erhöht. Basierend auf Markergenanalysen wurde bereits früher eine pathologische Hypertrophie in den *Popdc1*-Mäusen ausgeschlossen (Andrée et al., 2002). Ähnliche Reduktionen des Körpergewichts bei identischer Herzgröße wurden in der *Popdc2*-Maus beobachtet. Der Quotient aus Herz- und Körpergewicht war signifikant erhöht. Bei der *Popdc2*-Maus bestand eine milde Hypertrophie, die auch molekular durch eine erhöhte Expression von Hypertrophie-Markergenen bestätigt werden konnte (Froese, Doktorarbeit, 2007). Eine Erklärung für diesen Unterschied zwischen den beiden *Popdc*-Nullmutanten könnte sein, dass die *Popdc1*-LacZ-Expression postnatal im Ventrikel zurückgeht (Andrée et al., 2002), während die *Popdc2*-LacZ-Expression persistiert (Froese, Doktorarbeit, 2007).

6.2 Popdc1 im Reizleitungssystem

6.2.1 Die elektrophysiologischen Untersuchungen an der *Popdc1*-Maus

Die elektrophysiologischen Untersuchungen an der *Popdc1*-Maus wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Larissa Fabritz, Universitätsklinikum Münster durchgeführt. Mittels telemetrischen EKGs wurde in der *Popdc1*-Maus ein stressinduzierter kardialer Phänotyp entdeckt. Dieser Phänotyp konnte mit verschiedenen Stressstimuli wie mentaler Stress (Luftstrom), physische Belastung (Schwimmen) und pharmakologische β -adrenerge Rezeptorstimulation gezeigt werden. Unter diesen Stressbedingungen zeigten die *Popdc1*-Mäuse einen geringeren Anstieg der Herzrate als die Wildtypiere. Auffällig war, dass dieser Phänotyp altersabhängig auftrat. So konnten bei 3 Monate alten *Popdc1*-Mäusen keine unterschiedlichen Herzraten beobachtet werden. Erst im Alter von 5,5 Monaten war zum Teil ein Unterschied in den Herzraten sichtbar, der sich im höheren Alter von 8 Monaten stärker ausprägte. Die Reduktion der Herzraten bei den *Popdc1*-Mäusen war auf Sinuspausen zurückzuführen, die im höheren Alter stark zunahm.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die *Popdc1*-Mäuse eine altersabhängige stressinduzierte Sinusbradykardie aufwiesen. Dieser Phänotyp konnte auch bei den *Popdc2*-Mäusen beobachtet werden. Auch in diesen Mäusen entwickelte sich der Phänotyp altersabhängig. Beide Gene agieren wohlmöglich in einem parallelen oder redundant im gleichen Signalweg. Dabei kontrollieren sie die Stressadaptation des kardialen Schrittmachers. Beide Mauslinien sind somit Tiermodelle für das Sick-Sinus-Syndrom (SSS), einer Erkrankung, die bei alternden Menschen recht häufig vorkommt. Dieses Sinusknotensyndrom umfasst mehrere Herzrhythmusstörungen, wie Sinusbradykardien, Sinusarrest, sinoatrialen Block und ein alternierendes Muster an Bradykardien und Tachykardien. Dabei sind primäre Herzerkrankungen wie Ischämie oder Kardiomyopathie als

Ursache bekannt (Adan and Crown, 2003). Allerdings ist auch klar eine familiäre Komponente bei dem SSS akzeptiert und mit dieser Erkrankung in Zusammenhang gebracht wurden Mutationen in Genen, die für Ionenkanäle oder die für Membranproteine kodieren, die für den Transport und die Komplexbildung von Ionenkanälen verantwortlich sind (Adan and Crown, 2003; Dobrzynski et al., 2007).

Da das SSS typischerweise bei älteren Menschen auftritt und die *Popdc1*- und *Popdc2*-Nullmutanten den SSS-ähnliche Phänotyp erst mit zunehmenden Alter entwickeln, können die Tiere als Krankheitsmodell für dieses Syndrom dienen. Sie könnten nicht nur eingesetzt werden, die Pathologie dieser Erkrankung eingehender zu studieren, sondern auch für die Entwicklung neuer (pharmakologischer) Therapien hilfreich sein.

Andere Mausmodelle neben *Popdc1* und *Popdc2*, die eine Sinusknotendysfunktion zeigen, sind u.a. die *SCN5a*-Mäuse. Heterozygote *SCN5a*-Mäuse haben Natriumkanaldefekte, so dass es zu sinoatrialen Blockaden, Sinusbradykardien und einer verlangsamten Reizleitung kommt. Des Weiteren zeigen diese Mäuse eine beeinträchtigte atrioventrikuläre und intramyokardiale Reizleitung und eine ventrikuläre Tachykardie. Interessanterweise ist das Protein in der Peripherie des Sinusknotens lokalisiert (Lei et al., 2005; Papadatos et al., 2002). Die Haploinsuffizienz in *SCN5a* wird mit der vererbaren Lenégre Krankheit assoziiert, bei der es progressiv während des Alterns zu Erregungsleitungsdefekten kommt (Probst et al., 2003). Diese altersabhängigen Erregungsleitungsdefekte sind auf eine voranschreitende Fibrose und ein myokardialer Umbau sowie auf eine veränderte Anordnung von Gap Junctions zurückzuführen (Royer et al., 2005; van Veen et al., 2005). In *Popdc2*-Mäusen konnte im inferioren Teil des älteren Sinusknotens ein erhöhter Anteil an Bindegewebe durch Masson's Trichrom-Färbung dargestellt werden (Froese et al., eingereicht). In der *Popdc1*-Maus konnte in diesem Bereich ein Verlust an Sinusknotenzellen festgestellt werden. Ob dieser Verlust einhergehend mit einem Anstieg des Bindegewebsanteils ist, muss noch näher untersucht werden. Erste Daten weisen aber darauf hin, dass es sich hier ähnlich wie bei der *Popdc2*-Maus verhält. In den beiden *Popdc*-Mäusen würde es dann folglich zu einer altersabhängigen Fibrose im Sinusknotengewebe kommen ähnlich wie bei der *SCN5a*-Haploinsuffizienz.

Auch Defekte in Calciumkanälen führen zu Sinusknotendysfunktionen. So zeigen Mäuse, bei denen die $Ca_v1.3$ - Isoform des spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} -Kanals deletiert wurden, Sinusbradykardien mit verlängerten PR-Intervallen und Arrhythmien. Diese Kanäle spielen eine wichtige Rolle in der Generierung der Schrittmacheraktivität, da sie an der diastolischen Depolarisation beteiligt sind (Mangoni et al., 2003; Platzer et al., 2000; Zhang et al., 2002). *Popdc1*-Mäuse zeigten auch nach Stressinduktionen keinen signifikanten Unterschied in den

PQ-Intervallen auf, so dass diese Mäuse einen anderen Typ des Sick-Sinus-Syndroms repräsentieren. Der Knockout von $Ca_v3.1$, einem T-Typ Ca^{2+} -Kanal, zeigt ebenfalls eine verlangsamte Schrittmacheraktivität und AV-Erregungsleitung. Die Reduktion der Schrittmacheraktivität wird bei diesen Mäusen durch eine Verlangsamung der diastolischen Repolarisation in den Sinusknotenzellen verursacht (Mangoni et al., 2006). Ein weiterer Kanal, der für das Schrittmacherpotential in Sinusknotenzellen verantwortlich ist, ist der HCN4-Kanal. HCN4 wurde aufgrund seiner Fähigkeit, zyklische Nukleotide binden zu können, bis vor kurzem für den zentralen Regulator der Schrittmacherfunktion gehalten. Die konditionale Deletion von *HCN4* in adulten Mäusen zeigt aber, dass die Herzrate nach β -adrenerger Stimulation in diesen Mäusen nicht verändert wird. Stattdessen zeigen diese Mäuse kardiale Arrhythmien mit periodisch auftretenden Sinuspausen unter Grundbedingungen und einen Verlust des I_f -Stroms. Daraus wurde geschlossen, dass HCN4 nur für die Beibehaltung des stabilen kardialen Rhythmus' verantwortlich ist (Herrmann et al., 2007). In den HCN4-Mäusen zeigt sich ein Defekt in der Grundaktivität des Herzens, während die *Popdc1*-Mäuse eine stressinduzierte Sinusbradykardie aufwiesen.

Die hier genannten Herzrhythmusstörungen basieren alle auf Kanaldefekte. Für *Popdc1* wurde durch Strommessungsversuche an *Popdc1*-injizierten Froschoozyten ausgeschlossen, dass dieses Protein einen Kanal bildet. Es konnte aber gezeigt werden, dass *Popdc1* die Aktivität von Ionenkanälen modulieren kann und diese Modulation könnte neben den beobachteten strukturellen Veränderungen für die beobachteten Herzrhythmusstörungen in der Nullmutante verantwortlich sein.

Gene, die nicht für Ionenkanäle kodieren aber trotzdem mit einer Sinusknotendysfunktion assoziiert sind, wurden auch identifiziert. Ankyrin B (ANK-B) ist ein Adaptorprotein, welches Kanäle an die Membran bringt und für die Membranorganisation von Kanalproteinen und Transportern wichtig ist. Heterozygote *Ank2*-Mäuse zeigen ähnliche Arrhythmien wie Patienten, bei denen das *Ank2*-Gen mutiert ist (Le Scouarnec et al., 2008; Mohler et al., 2003). *Klotho* ist ein Membranprotein, welches in der Ca^{2+} -Homöostase involviert ist und mit Membranproteinen wie Na/K-ATPase interagiert (Imura et al., 2007). Die Expression von *Klotho* im Herzen ist auf den Sinusknoten beschränkt und ist für die Sinusknotenfunktion essentiell. So ist in isolierten Sinusknoten von homozygoten *Klotho*-Mäusen der chronotrope Effekt von Isoproterenol weniger stark ausgeprägt als bei Wildtypmäusen (Takeshita et al., 2004). Anders als in den *Popdc1*-Mäusen (siehe 6.2.2) ist aber in der *Klotho*-Maus keine strukturelle Veränderung im Sinusknoten zu vermerken (Takeshita et al., 2004). *Klotho*-Mäuse zeigen viele altersabhängige Beschwerden und eine kurze Lebensspanne. Bis zu einem Alter

von 3 Wochen entwickeln die Mäuse sich normal, werden dann fortschreitend inaktiv und sterben schließlich im Alter von 8 bis 9 Wochen (Kuro-o et al., 1997), während die Altersabhängigkeit bei den *Popdc1*-Mäusen erst in einem viel höheren Alter auftritt.

Im Unterschied zu den hier genannten bekannten Mausmodellen mit einer Sinusknotendysfunktion, die durch ein einzelnes Gen hervorgerufen wird, scheint der *Popdc1*- bzw. *Popdc2*-Phänotyp durch die vermutlich redundante Funktion der beiden Gene abgeschwächt zu werden. Die Aktivität der redundanten Gene in jüngeren Tieren könnte als Schutzmechanismus dienen und den Verlust eines einzelnen Gens kompensieren. Erst im Alter schlägt der bradykardiale Phänotyp durch. Während des Alterns wird von unserer Arbeitsgruppe eine Reduktion der Expression, der Translation, der Prozessierung oder der Veränderung der Membranlokalisation der Mitglieder der *Popdc*-Familie postuliert. In dieser Situation könnte der Verlust eines Gens in einer frühzeitigen Abnahme der *Popdc*-Proteinfunktion führen, so dass es zu einer Unterschreitung eines Schwellenwertes und in der Folge zu der beobachteten stressinduzierten Sinusknotendysfunktion im Alter von 8 Monaten kommt. Dies hätte zur Folge, dass Altern und der Verlust von *Popdc1* bzw. *Popdc2* die Schwere des myokardialen Phänotyps beeinflussen. Somit müsste folglich bei der Doppel- bzw. Dreifachmutante der sinobradikardiale Phänotyp viel früher bzw. nicht mehr altersabhängig aufgrund der fehlenden Redundanz der Gene auftreten. Dieses sollte baldmöglichst untersucht werden.

Die Untersuchungen der PQ-Intervalle bei *Popdc1*-Mäusen unter Schwimmstress zeigten, dass bei Herzraten von 600 und 450 Schlägen pro Minute kein Unterschied zu den Wildtypmäusen vorlag. Auffällig war aber, dass bei den Nullmutanten Herzfrequenzen von 150 Schlägen pro Minute auftraten, die bei wildtypischen Mäusen nicht detektiert werden konnten. Diese *in vivo* Untersuchungen schlossen einen AV-Block bei den *Popdc1*-Mäusen aus. Ein ähnlicher Test wurde auch an den *Popdc2*-Mäusen durchgeführt. Hier wurde der Stress durch Isoproterenolgabe simuliert. Auch die *Popdc2*-Mäuse zeigten kein verlängertes PQ-Intervall bei 600 Schlägen pro Minute (Froese, Doktorarbeit), was die Ähnlichkeit beider Mutanten bekräftigt. Andersherum konnte in isolierten Herzen bei den *Popdc1*-Mäusen ein erhöhter Wenckebachpunkt festgestellt werden. Der Wenckebachpunkt ist diejenige Frequenz bei Vorhofstimulation mit steigender Frequenz, bei der keine 1:1-Überleitung mehr erfolgt. Nach β -adrenerger Stimulation war der Wenckebachpunkt erhöht und die ventrikuläre Herzrate verlangsamt, was auf eine veränderte Erregungsleitung im AV-Knoten hinweist. Allerdings sind diese Daten als preliminär zu betrachten, da nur eine geringe Anzahl an

Tieren untersucht wurde. Die Diskrepanz bezüglich der Erregungsweiterleitung in den Ventrikeln können eventuell mit den unterschiedlichen Untersuchungsmethoden in Verbindung gebracht werden. Die PQ-Intervalle wurden an lebenden Mäusen mit implantiertem EKG gemessen, während der Wenckebachpunkt und die ventrikuläre Herzrate an isolierten Herzen bestimmt wurden.

Auch in Zebrafisch *Popdc2*-Morphanten und *Popdc1*-Morphanten konnten kardiale Erregungsleitungsdefekte beobachtet werden. In den *Popdc2*-Morphanten konnten neben einem AV-Block und Herzratenveränderungen nach 5 dpf ab Stadium 7 dpf zusätzlich Pausen in der atrialen und ventrikulären Kontraktionen beobachtet werden (Froese et al., eingereicht). Bei den *Popdc1*-Morphanten traten die Herzarrhythmien schon nach 3 dpf auf. Bei einigen *Popdc1*-Morphanten konnte das alternierende Auftreten von Bradykardien und Tachykardien beobachtet werden (pers. Kommunikation Franziska Günthner). Diese Beobachtungen an Zebrafischmorphanten lassen den Schluss zu, dass die *Popdc1*- bzw. *Popdc2*-Gene eine Funktion bei der ventrikulären Reizleitung (AV-Knoten) und im Sinusknoten haben.

Der Umstand, dass sowohl die *Popdc1*- und die *Popdc2*-Maus, als auch die *Popdc1*- und *Popdc2*-Morphanten beim Zebrafisch einen Reizleitungsphänotyp aufweisen, weist auf konservierte Funktionen der *Popdc*-Gene in der Erregungsbildung- und -leitung des Herzens hin.

6.2.2 Das Volumen und die Oberfläche des Sinusknotens von *Popdc1*-Mäusen

In Anlehnung an die beobachtete Volumenreduktion des Sinusknotens in der *Popdc2*-Maus gegenüber dem des Wildtyps sollten die Volumina und die Oberflächen der *Popdc1*-Sinusknoten im Verhältnis zu den Wildtypsinusknoten bestimmt werden. Dazu kamen zwei unterschiedliche Rekonstruktionsmethoden zum Einsatz: bei der ersten Methode wurde die Expressionsdomäne für HCN4 von jedem 3. Schnittes eingelesen und der Sinusknoten aus diesen Daten rekonstruiert. Es wurden insgesamt 48 Schnitte verwendet, da der Sinusknoten ca. 1,5 mm lang ist (Liu et al., 2007). Bei dieser Methode wurde der Bereich der HCN4-positiven Zellen mit einberechnet, der nicht parallel zur Crista terminalis verlief, so dass die Schnitte nicht in den inferioren Bereich hineingelangten. In diesem Bereich konnten in der zweiten Methode ein Verlust an HCN4-positiven Zellen verzeichnet werden, wie dies bereits für die *Popdc2*-Maus beschrieben wurde (Froese et al., eingereicht). Diese Studie hat aber trotzdem eine Aussage: So war im anterioren Bereich keine oder nur geringfügige Veränderungen im Volumen- und Oberflächengröße zu vermerken. Der Verlust an

Sinusknotengewebe ist im inferioren Teil zu verzeichnen, was mit der zweiten Rekonstruktionsmethode des Sinusknoten festgestellt wurde.

Hier wurde der gesamte Sinusknoten mit Hilfe der *whole mount*-Färbung für HCN4 angefärbt und mit einer konfokalen Laserscanningmikroskopie analysiert. Mit dieser Methode konnte eine Reduktion im Volumen und in der Oberfläche von 42% bzw. 43% bei den *Popdc1*-Mäusen festgestellt werden. Dieser Verlust war größer als bei den *Popdc2*-Mäusen, bei der die Reduktion ca. 1/3 ist auf der Basis einer 3D-Rekonstruktion ermittelt wurde. Da hierbei zwei verschiedene Methoden zur Anwendung kamen, müssen die Unterschiede im Zellverlust zwischen den Mausmutanten nicht unbedingt stark divergieren. Auf der anderen Seite handelt es sich um zwei unterschiedliche Proteine, die zwar der gleichen Familie entstammen und stark konserviert sind, aber trotzdem eine gewisse Varianz aufweisen können.

Im Sinusknoten ist der Ausgangspunkt für die Entstehung des Aktionspotentials nicht statisch sondern dynamisch und ändert sich je nach den vorherrschenden physiologischen Bedingungen. So ändert sich der Ort des Schrittmacherzentrums als Antwort auf verschiedenste Stimuli. Nach β -adrenerger Stimulation des Kaninchensinusknoten verlagert sich das Schrittmacherzentrum in den inferioren Bereich des Sinusknotens (Boyett et al., 2000). Das ist der Bereich, bei dem in der *Popdc1*- und der *Popdc2*- Maus der Verlust von HCN4-positiven Zellen festgestellt wurde. Dies ist vermutlich der Grund dafür, dass bei den *Popdc1*-Mäusen die Antwort auf Stress, beeinträchtigt war, während unter Grundbedingungen die Tiere keinen elektrophysiologischen Phänotyp aufwiesen.

6.2.3 Die Expression von *Popdc1* im Reizleitungssystem

Die LacZ-Färbung an adulten *Popdc1*-Mäusen zeigte, dass die Expression des Reportergens im ventrikulären Reizleitungssystem gegenüber dem ventrikulären Myokard erhöht ist. Starke Expression konnte im AV-Knoten-His-Bündelbereich und auch in den Bündelverzweigungen beobachtet werden. Auch im Sinusknoten konnte eine LacZ-Expression detektiert werden, die aber der im Atrium äquivalent bzw. demgegenüber nur sehr leicht erhöht erschien. Die Expression des *LacZ*-Reportergens war im Atrium gegenüber dem Ventrikel erhöht. Die LacZ-Expression im kardialen Reizleitungssystem der *Popdc2*-Maus ist auch gegenüber der im Arbeitsmyokard erhöht. Insgesamt ist die Expressionsstärke von LacZ in diesen Mäusen höher als in den *Popdc1*-Mäusen. Die LacZ-Expressionsstärke zeigt aber keine Unterschiede in den Kammern (Froese, Doktorarbeit, 2007; Froese et al., eingereicht). Das überlappende Expressionsmuster von *Popdc1* und *Popdc2* deutet auf eine redundante Funktion der *Popdc*-

Proteinfamilie hin, die wahrscheinlich auch von Popdc3 gezeigt werden würde. Das LacZ-Muster des *Popdc1*-Gens im kardialen Reizleitungssystem korreliert mit der Acetylcholinesterase-Färbung, welche das Reizleitungsgewebe markiert, als auch mit der Popdc1-Immunhistochemie. Die Immunhistochemie zeigte auch, dass das Popdc1-Signal im Atrium gegenüber dem Ventrikel erhöht war. Eine ähnliche Beobachtung konnte auch im Hühnerherzen gemacht werden. Hier ist auch die Expression im Atrium gegenüber dem Ventrikel erhöht (Torlopp et al., 2006). Weiterhin zeigte die Popdc1-Immunhistochemie, dass die Signalstärke im ventrikulären Reizleitungssystem gegenüber dem Ventrikel augenscheinlich erhöht ist.

Doppelfärbungen von Popdc1 und dem HCN4-Kanal, welcher die Schrittmacherzellen im SAN und AVN markiert, zeigten eine Kolo-kalisation beider Proteine im Sinusknotenbereich und im ventrikulären Reizleitungssystem. Auffällig an den Färbungen war, dass die Lokalisation von HCN4 auf das Reizleitungssystem beschränkt war, während die Lokalisation von Popdc1 auch im Arbeitsmyokard detektiert wurde. Während die Signalstärke im Atrium sich nicht bzw. kaum von der im Sinusknoten unterschied, war die Signalstärke im ventrikulären Septum gegenüber dem Reizleitungsgewebe erniedrigt. Dies spiegelt die Expressionsstärke des *Popdc1-LacZ*-Reporters wieder.

Mit einem weiteren Marker - Cx40 - der im atrialen Myokard und im ventrikulären Reizleitungssystem exprimiert wird, konnte auch eine Lokalisation beider Proteine in denselben Bereichen des Herzens festgestellt werden. So sind beide Proteine in den atrialen Myozyten in den Membranen lokalisiert. Cx40 zeigt eine punkartige Distribution während Popdc1 eher gleichmäßig über die Membran verteilt ist. Diese punkartige Verteilung von Cx40 wurde auch im His-Bündel und in den Bündelverzweigungen detektiert. Popdc1 zeigte in den Cx40 positiv markierten Bereichen ein erhöhtes Signal gegenüber dem ventrikulären Myokard. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Popdc1 im gesamten Herzmyokard exprimiert wird und die Expression im ventrikulären Reizleitungssystem erhöht ist. Dort lokalisiert Popdc1 mit bekannten Markern des Reizleitungssystems.

6.3 Popdc1-Lokalisation im Arbeitsmyokard

Wie unter 6.2.3 erwähnt wurde Popdc1 nicht nur im Reizleitungssystem lokalisiert sondern auch im Arbeitsmyokard. Auffällig war hier, dass Popdc1 ein stärkeres Signal im atrialen als im ventrikulären Myokard zeigte und dass die Expression im ventrikulären Reizleitungssystem gegenüber dem ventrikulären Myokard erhöht war. Eine gleichartige

Beobachtung wurde auch im Hühnerembryo gemacht (Torlopp et al., 2006). Die Signalstärke zwischen Sinusknoten und Atrium schien ähnlich.

Im atrialen Myokard sowie in isolierten atrialen Myozyten wurde *Popdc1* in den lateralen Membranen detektiert. Auch im ventrikulären Myokard sowie in isolierten ventrikulären Myozyten war dort eine *Popdc1*-Expression zu beobachten. Zusätzlich konnte innerhalb der Zelle eine Querbänderung detektiert werden. Diese Querbänderung konnte in Herzen 1 bis 8 Tage alten Mäuse noch nicht detektiert werden. Erst in Herzen von älteren Tieren wurde diese Querbänderung mit dem *Popdc1*-Antikörper erkannt. Diese Daten sprechen dafür, dass es sich bei dieser Querbänderung um T-Tubuli handelt. Das T-Tubuli-Netzwerk ist in Mäusen erst im Alter von 10 bis 14 Tagen maturiert (Forbes et al., 1984). Es ist in den meisten atrialen Myozyten nicht ausgebildet (Ayettey and Navaratnam, 1978; Cordeiro et al., 2001). Des Weiteren sind in Amphibien, Reptilien und Vögeln keine T-Tubuli entwickelt (Bossen and Sommer, 1984; Bossen et al., 1978). Im Huhn wird *Popdc1* im Arbeitsmyokard nur in den lateralen Membranen und im Glanzstreifen detektiert (Torlopp, 2005). Im menschlichen Herzgewebe konnte *Popdc1* in einem ähnlichen Muster wie im murinen Herzgewebe detektiert werden.

Popdc1 zeigte mit α -sarkomerischen Aktinin, einem Marker für die Z-Linien, keine großen Überlagerungen. Es schien eher so, dass sich die Proteine in ihrer Verteilung ergänzten, so dass *Popdc1* meist in den Aussparungen der α -sarkomerischen Aktinin-Färbung lag. Anders sah das Verteilungsmuster von *Popdc1* mit T-Tubuli-Markern aus. Hier war eine Überlappung des *Popdc1*-Signals mit NCX1, mit $Ca_v1.2$ sowie mit Caveolin 3 zu beobachten. Auch mit dem unspezifischen Membranmarker WGA konnte eine Kollokalisierung festgestellt werden. Um eine genaue Lokalisation von *Popdc1* in den Mikrodomänen der T-Tubuli zu bestimmen, muss aber die lichtmikroskopische Auflösung verbessert werden. Die Kollokalisierung von *Popdc1* mit NCX1, $Ca_v1.2$ und Caveolin 3 lässt auch auf eine Funktion von *Popdc1* in der Erregungs-Kontraktions-Kopplung deuten. Diese könnte in der Eigenschaft von *Popdc1* liegen, Kanäle und deren Stromleitungseigenschaften bzw. die Präsenz von Proteinen in der Membran zu modulieren (siehe auch 6.6.2). Koimmunopräzipitationsversuche mit bekannten Na^+ -, Ca^{2+} - und K^+ -Kanälen in den T-Tubuli (Brette and Orchard, 2003) nach Kotransfektion in geeignete Zellen könnten eine Interaktion darlegen. Außerdem könnte mit Hilfe der *Popdc1*-Maus gezeigt werden, ob eine Veränderung der Lokalisation dieser Proteine bei Verlust von *Popdc1* erfolgt. *Popdc1* kollokalisierte außerdem mit TREK1 in den T-Tubuli und veränderte dessen Konduktivität. Dies ist ein erstes Indiz dafür, dass *Popdc1* Kanalaktivitäten

moduliert (siehe auch 6.6). Ein Protein, welches Kanäle an die Membran transportiert ist Ank-B (siehe auch 6.2.1). Ank-B übernimmt eine solche Aufgabe in den T-Tubuli. Die Mutation von Ankyrin-B resultiert in einer Störung der zellulären Organisation der Natriumpumpe (NKA), des Natrium/Calcium-Austauschers (NCX1) und des Inositol-1,4,5-Triphosphatrezeptors (InsP₃-Rezeptor). Dies hat zur Folge, dass der Transport dieser Proteine in die T-Tubuli wie auch der Proteinlevel reduziert ist. Die *Ank-B*-Mutation führt zu einer veränderten Ca²⁺-Signalgebung in adulten Myozyten (Mohler et al., 2003).

Das *Popdc1*-Protein konnte im ventrikulären Myokard auch in den Glanzstreifen detektiert werden. Als Marker für den Glanzstreifen wurden N-Cadherin und Cx43 verwendet. Während N-Cadherin Protein der Adhärenzverbindungen ist, ist Cx43 ein Gap Junction Protein. Bei einer größeren Auflösung konnte erkannt werden, dass Cx43 und *Popdc1* nicht direkt kolokalisiert sind, sondern dass *Popdc1* neben Cx43 lokalisiert ist und eher eine nichtkomplementäre Distribution mit Cx43 zeigte. Dies ist sehr interessant, da für *Popdc1* eine Interaktion mit ZO1 in epithelialen Zellen gezeigt wird und für *Popdc1* eine Rolle in Etablierung und Erhaltung der Integrität epithelialer Zellen postuliert wird (Osler et al., 2005). In Kardiomyozyten könnte ZO1 auch ein Interaktionspartner für *Popdc1* sein. In diesen konnte gezeigt werden, dass ZO1 direkt mit Cx43 interagiert und die Plaquegröße der Gap Junctions moduliert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ZO1 in der Peripherie von Cx43 lokalisiert ist und die beiden Proteine nicht vollständig kolokalisieren (Hunter et al., 2005; Toyofuku et al., 1998). Somit zeigt ZO1 eine ähnliche Distribution um Cx43 wie *Popdc1*. Ein Verlust an *Popdc1* könnte eine Veränderung der Größe und Ausbildung von Gap Junctions hervorrufen. Dies müsste in weiteren Versuchen noch analysiert werden. Der *Popdc2*-Knockout zeigt keine bedeutenden Veränderung in Größe und Quantität der Gap Junctions (Froese et al., eingereicht), die Interaktion zwischen *Popdc2* und ZO1 wurde bisher aber auch noch nicht gezeigt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Popdc1* nicht im Epikard und nicht in den Glattmuskelzellen der Gefäße lokalisiert ist. Für diese Studie wurde ein neuer kommerziell erhältlicher Antikörper von der Firma Santa Cruz verwendet. Die immunhistochemischen Färbungen mit diesem Antikörper widersprechen den Ergebnissen von Reese et al. (Reese et al., 1999). In dieser Publikation wurde mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern *Popdc1* im Epikard und in den Glattmuskelzellen der Koronararterien (Reese et al., 1999), während von unserer Arbeitsgruppe und der Arbeitsgruppe von Melinda Duncan gezeigt wurde, dass

Popdc1 nur im Myokard detektierbar ist (Breher et al., 2004; DiAngelo et al., 2001; Torlopp et al., 2006; Vasavada et al., 2004). Es kann sein, dass die von Reese et al. verwendeten Antikörper eine Kreuzreaktion mit anderen Proteinen besitzen bzw. von diesen Antikörpern andere Spleißvarianten erkannt werden. Eigene Experimente mithilfe eines Antiserums, das uns von der Arbeitsgruppe Bader zur Verfügung gestellt wurde, zeigten im Western Blot und in Immunfärbungen, Signale bei der Nullmutante. Dies spricht für eine Kreuzreaktion des Antikörpers.

Aufgrund der Redundanz in der *Popeye*-Genfamilie, sollte die Distribution der anderen beiden Popdc-Proteine in den Myozyten noch näher bestimmt werden. Dies könnte weitere Aufschlüsse darüber geben, ob die Popdc-Proteine redundante Aufgaben übernehmen oder ob sie auch spezifische Aufgaben haben. Mittels Immunfluoreszenz könnte z.B. in der *Popdc2*-Maus überprüft werden, ob die Popdc1-Lokalisation verändert wird bzw. ob der Verlust eines *Popdc*-Gens eine Erhöhung des Signals zur Folge hat. Dies wäre ein Beweis dafür, dass *Popdc1* die Aufgabe von *Popdc2* übernimmt. Weiterhin könnte mittels RT-PCR bestimmt werden, ob die Expression der anderen beiden Familienmitgliedern nach Knockout eines Gens hochreguliert wird, was wieder das Argument der Redundanz und der Substitution bekräftigen würde. Erste Immunfluoreszenzfärbungen von Popdc3 zeigten eine Lokalisation des Proteins in den Glanzstreifen im ventrikulären Myokard. Eine Färbung mit einem Antikörper gegen Popdc2 war bisher nicht erfolgreich.

6.4 Popdc1 ist ein glykosyliertes Transmembranprotein und bildet Dimere

Die Glykosylierung und damit die Funktionalität der beiden vorhergesagten Glykosylierungsstellen (Knight et al., 2003) wie auch die Dimerisierung des Popdc1 konnten durch eigene Versuche bestätigt werden (Knight et al., 2003; Vasavada et al., 2004). Ein Dimerisierungsmotiv für Popdc1 wurde in der konservierten *Popeye*-Domäne entdeckt und die Homodimerisierung von Popdc1 wurde mit einem GST pull-down assay sowie Protein Mapping gezeigt (Kawaguchi et al., 2008; Ripley et al., 2004). Da das Dimerisierungsmotiv nur eine geringe Konservierung zwischen den Popdc-Proteinen zeigt, können die Popdc-Proteine wahrscheinlich nicht untereinander heterodimerisieren. Dies müsste aber noch experimentell gezeigt werden, weil sich sonst daraus weitreichende Konsequenzen für die Funktionsweise von Popdc-Proteinen ergeben.

Durch subzelluläre Fraktionierung von embryonalen Hühnerherzlysaten in Zytosol, Kerne und Membranen konnte gezeigt werden, dass Popdc1 in der Membranfraktion vorkommt.

Weiterhin wurde weitere Fraktionierung in membranassoziierte Proteine und Transmembranproteine bestätigt, dass es sich bei Popdc1 um ein Transmembranprotein handelt. In früheren Studien konnte die Orientierung des Popdc1-Proteins in der Membran bestimmt werden. Demnach liegt der C-Terminus intrazellulär und der glykosylierte N-Terminus extrazellulär (Breher, Diplomarbeit, 2003). Diese Orientierung ist auch schon durch die Glykosylierung vorherbestimmt. Da diese im Endoplasmatischen Retikulum stattfindet, was dem extrazellulären Raum entspricht.

Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass es sich bei Popdc1 um ein Transmembranprotein handelt. Aufgrund der großen Homologie zu den andern Familienmitgliedern kann davon ausgegangen werden, dass Popdc1 hier als Prototyp die anderen Popdc-Proteine darstellt. Zusammenfassend handelt es sich bei Popdc1 um ein glykosyliertes Protein mit 2 Glykosylierungsstellen am N-Terminus. Dieser liegt extrazellulär. Drei Transmembranen durchspannen die Plasmamembran, so dass der C-Terminus intrazellulär liegt. Der C-Terminus trägt die hochkonservierte *Popeye*-Domäne, die unter anderem ein Dimerisierungsmotiv besitzt. Die hohe Konservierung der *Popeye*-Domäne und deren intrazelluläre Lokalisation lassen vermuten, dass diese hochgradig für die Funktion der Popdc-Proteine in der Zelle verantwortlich ist, weshalb im folgenden Abschnitt nochmals genauer auf diese eingegangen wird.

6.5 Die *Popeye*-Domäne und deren Eigenschaft zyklische Nukleotide zu binden

Die *Popeye*-Domäne besteht aus ca. 150 Aminosäuren. Sie ist für die *Popdc*-Familie charakteristisch und nur dort vorhanden. Innerhalb der *Popeye*-Domäne sind 17 Aminosäuren invariant. Auffällig unter diesen konservierten Aminosäuren sind die beiden Motive DSPE und FQVT. Durch Darstellung der *Popeye*-Domäne mittels Bändermodell und Oberflächenstruktur konnte gezeigt werden, dass diese invarianten Aminosäuren an der Oberfläche der *Popeye*-Domäne liegen und für potentielle Interaktionspartner frei zugänglich sind. Zu diesen gehören zyklische Nukleotide, denn für die Sekundärstruktur der *Popeye*-Domäne wurde mittels Psipred eine strukturelle Ähnlichkeit zur cAMP-Bindungsdomäne der PKA vorausgesagt. Beide Sekundärstrukturen haben einen β -Faltblattstapel aus 8 β -Faltblättern, die von α -Helices eingefasst werden. Die Phosphatbindungskassette der PKA zeigt aber keinerlei Homologien zu der vermuteten Phosphatbindungskassette von Popdc1, die die beiden oben erwähnten Motive DSPE und FQVT beinhaltet. Bekannte Phosphatbindungskassetten weisen einen konservierten Argininrest auf. Dieser interagiert mit

der Phosphatgruppe des cAMPs (Berman et al., 2005). Eine weitere konservierte Aminosäure in der Phosphatbindungskassette bekannter zyklische Nukleotidbindungsproteine ist Glutaminsäure. Der Glutamatrest bindet an die Hydroxylgruppe der Riboseuntereinheit des zyklischen Nukleotids (Berman et al., 2005). Während der Argininrest nicht in der Phosphatbindungskassette der Popdc-Proteine vorhanden ist, ist der Glutaminsäurerest in der *Popeye*-Domäne konserviert. Auch Epac weist eine andere Phosphatbindungskassette auf. Hier gibt es den konservierten Argininrest aber der Glutaminsäurerest ist nicht vorhanden (Enserink et al., 2002). Die putative Phosphatbindungskassette der Popdc-Proteine ist somit eine nicht-kanonische. Neben dieser nicht-kanonischen Phosphatbindungskassette in Popdc Proteine sind weitere nicht-kanonische Phosphatbindungskassetten bekannt, wie u.a. in den HCN- und PDZ-GEF-Proteinen in Eukaryoten. Einige dieser Proteine mit nicht-kanonischer Phosphatbindungskassette binden nicht an zyklische Nukleotide und haben andere Aufgaben übernommen. Deshalb war es wichtig in dieser Arbeit die Bindung biochemisch zu demonstrieren. Auch bei Prokaryoten finden sich nicht-kanonische Phosphatbindungskassetten, z.B. in den Transkriptionsregulatoren FixK, FnR, ArcR, NnR und ARSR (Kannan et al., 2007).

In cAMP-Präzipitationsversuchen konnte gezeigt werden, dass Popdc1 wie auch die anderen Familienmitglieder in der Lage sind an cAMP zu binden. Ausreichend für die Bindung war der C-Terminus, welcher die *Popeye*-Domäne enthält. Eine Elution von der cAMP-Agarose erfolgte mit freiem cAMP und cGMP aber nicht mit ATP, was die spezifische Bindung der Popdc-Proteine an zyklische Nukleotide demonstrierte. Die Bindung an die cAMP-Agarose konnte auch mittels freien zyklischen Nukleotiden kompetitiert werden.

Mutationen in den hochkonservierten Motiven der *Popeye*-Domäne zeigten eine veränderte Bindungseigenschaft des Popdc1-Proteins. So band die Popdc1^{P202A}-Mutante besser an die cAMP-Agarose als Popdc1 WT. Mit einer geringeren Affinität als das Wildtyp-Popdc1-Protein binden Popdc1^{E203A}, Popdc1^{V217F} und Popdc1^{D200A} an cAMP. Ein ähnliches Ergebnis lieferten Bindungsversuche der mutierten Popdc1-Proteine mit cGMP (Kuhtz, Diplomarbeit, 2008). Die analogen Mutationen in Popdc2 zeigten das gleiche Bindungsverhalten, wie es gerade für Popdc1 beschrieben wurde (Meister, Diplomarbeit, 2008). Daraus lässt sich schließen, dass die beiden hochkonservierten Motive DSPE und FQVT für die Bindung der zyklischen Nukleotide essentiell sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es sich bei der Popdc-Familie um einen neuen Zweig der zyklischen Nukleotid-bindenden Proteine handelt. Aufgrund der Unterschiede in der Phosphatbindungskassetten (PBC) der Popdc-Proteine zu anderen bekannten PBCs,

besteht die Chance, Popdc-spezifische Agonisten oder Antagonisten zu entwickeln, die möglicherweise zur Therapie von Herzrhythmusstörungen geeignet sein könnten. Auch könnte mit diesen gezeigt werden, in welchem Kontext die Popdc-Familie zu den anderen cNMP-bindenden Proteinen steht. Zu ihnen gehören bei den Eukaryoten die Proteinkinase, die zyklischen Nukleotid-regulierten Kanäle HCN und CNG und der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Epac. Wichtig v.a. ist zu klären in welcher Beziehung Popdc-Proteine zu PKA und Epac stehen, da diese beiden Proteine die Aktivität vieler Ionenkanäle modulieren und hauptsächlich für die cAMP-Signalgebung verantwortlich gemacht werden. So phosphoryliert z.B. PKA verschiedene Proteine, die in der Signaltransduktion von Ca^{2+} eine Rolle spielen wie den spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} -Kanal (Kamp and Hell, 2000), den Ryanodin-Rezeptor (Marx et al., 2000) und Phospholamban (Brittsan and Kranias, 2000; Kiss et al., 1997). Auch Epac ist in diesen Prozess involviert. So wird die Phospholipase C_ϵ , die eine Rolle in der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung in Kardiomyozyten spielt, durch Epac kontrolliert (Oestreich et al., 2007). Außerdem aktiviert Epac über die Ca^{2+} /Calmodulin-Kinase (CaMKII) die Phosphorylierung vom Ryanodin-Rezeptor (Pereira et al., 2007). So regulieren 2 verschiedene cAMP-Mediatoren im selben Feld bzw. sogar dasselbe Protein wie den Ryanodin-Rezeptor. Eine ähnliche Kontrolle könnte auch bei TREK1 vorliegen. Dieser Kanal wird von PKA phosphoryliert (Fink et al., 1996). Die Kanaleigenschaft von TREK1 konnte auch durch Popdc1 modifiziert, was auch auf einen dualen cAMP-vermittelten Signalweg schließen lässt. Epac ist z.B. neben PKA in die Formierung von Gap Junctions involviert (Somekawa et al., 2005). Weitere Funktionen von Epac liegen in cAMP-vermittelten zellulären Funktionen wie Zelladhäsion, Zell-Zell-Verbindungen, Exozytose/Sekretion, Zelldifferenzierung und Proliferation, Genexpression, Apoptose, Phagozytose und kardiale Hypertrophie (Cheng et al., 2008).

Um eine gezielte Kontrolle der PKA-vermittelten Phosphorylierung des Zielproteins zu gewährleisten, wird mit Hilfe der Gerüstproteins AKAP (A-kinase anchor protein) dieses mit der Proteinkinasen (PKA), Phosphodiesterasen (PDE) und Phosphatasen in räumliche Nähe gebracht, was zu einer Kompartimentierung der zyklischen Nukleotid-Signalgebung führt. Neben der Interaktion mit PKA besitzen AKAPs Targeting-Domänen, die die zelluläre Lokalisation über Protein-Protein bzw. Protein-Lipid-Interaktionen determinieren. Außerdem assoziieren sie mit Signalenzymen bzw. anderen Proteinen und können an weitere Adaptorproteine und Gerüstproteine binden. AKAPs bilden somit signalprozessierende Einheiten (Dodge-Kafka et al., 2006; McConnachie et al., 2006). Ein im Herzen vorkommendes AKAP ist das 225kDa große mAKAP. Der mAKAP-Komplex besteht aus der

PKA, der PDE4D3, dem Ryanodin-Rezeptor, den Phosphatasen PP2A, PP1 und PP2B, Nesprin-1 α , der extrazellulär Signal-regulierten Kinase 5 (ERK5) und deren „Upstream“-Aktivator Mitogen-aktivierte Proteinkinase/ERK-Kinase und interessanterweise Epac (Dodge-Kafka et al., 2006). Dies deutet auf eine enge Regulierung des cAMP-Signals hin und zeigt, dass cAMP im selben Komplex an PKA und Epac binden kann und so Zielproteine auf duale Weise moduliert. Ob Popdc1 auch in einem solchen makromolekularen Komplex mit PKA sitzt oder sogar zusammen mit PKA und Epac ist noch zu klären.

Weiterhin sollte für Popdc1 die Dissoziationskonstante (K_d) von cAMP bestimmt werden, um dieses Protein in den physiologischen Kontext von PKA und Epac zu bringen. Die Dissoziationskonstante von PKA *in vitro* ist 2,9 μ M (Dao et al., 2006) und ist ähnlich der von Epac1, die bei 2,8 μ M liegt (Christensen et al., 2003). Epac2 besitzt zwei cAMP-Bindungsdomänen und die Bindungskonstanten liegen bei 87 und 1.2 μ M (de Rooij et al., 2000). Zur Bestimmung der Bindungskonstante könnte die Isothermale-Titrations-Kalorimetrie (ITC) benutzt werden wie bei (de Rooij et al., 2000) oder die beiden Methoden mit Tritium markierten cAMP von (Christensen et al., 2003; Dao et al., 2006).

6.6 Die Interaktion von Popdc1 und TREK1

Bekanntermaßen sind viele kardiale Ionenkanäle in makromolekularen Komplexen enthalten. Diese bestehen aus der porenformenden Untereinheit, die mit Hilfsproteinen assoziiert ist, regulatorischen Enzymen und Proteinen, die im Membrantargeting und in der Komplexbildung involviert sind (Mohler and Wehrens, 2007). Potentielle Partner für Popdc1 waren die Zwei-Poren-Kaliumkanäle TREK1 und TASK1. Beide sind stark im Herzen exprimiert und werden durch adrenerge Stimulation moduliert (Fink et al., 1996; Leonoudakis et al., 1998; Lopes et al., 2000; Patel and Honore, 2001; Patel et al., 1999). Um eine Interaktion von Popdc1 und TREK1 und Modulation des TREK1-Stroms zu untersuchen wurden verschiedene Ansätze durchgeführt. Unter anderem wurden elektrophysiologische Messungen von Popdc1 und TASK bzw. TREK1 durchgeführt, die Lokalisation von Popdc1 und TREK1 im nativen Gewebe und in transient transfizierten Cos7-Zellen bestimmt und Koimmunopräzipitationsexperimente durchgeführt.

6.6.1 Popdc1 und TREK1 kolokalisieren

Die Distribution von Popdc1 und TREK1 im kardialen Gewebe, in isolierten Myozyten und in transfizierten Cos7-Zellen zeigte ein ähnliches Muster. Beide Proteine waren im Gewebe und in transfizierten Zellen kolokalisiert. Die Kotransfektionsdaten von Popdc1 und TREK1

konnten durch FRET-Analysen von Popdc1-ECFP und TREK1-EYFP preliminär bestätigt werden (Beobachtung Roland Schindler). Interessanterweise ist bei den beiden Kotransfektionsansätzen (fluoreszierende Fusionsproteine vs. Immunodetektion) zu beobachten, dass die Lokalisation von Popdc1 durch TREK1 beeinflusst wurde und Popdc1 nach Kotransfektion mit TREK1 in Filopodien rekrutiert wurde. Diese werden von TREK1 nach Transfektion durch Interaktion mit dem Aktinzytoskelett induziert (Lauritzen et al., 2005). Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich Popdc1 und TREK1 im gleichen makromolekularen Komplex befinden. Die Expression von TREK1 schien im kardialen Reizleitungssystem nicht erhöht. In ventrikulären Myozyten konnte auch ein schwaches Signal von TREK1 in den T-Tubuli detektiert werden und die Profile von Popdc1 und TREK1 wiesen ein überlappendes Muster auf. Im Herzgewebe schien TREK1, aber nicht Popdc1 auch in Nichtmuskelzellen vorzukommen. Die Kolo-kalisation beider Proteine lässt auf eine enge räumliche Nähe schließen, was wie bereits erwähnt durch die FRET Analyse bestätigt wurde.

6.6.2 Popdc1 moduliert den TREK1-Strom und wird von TREK1 immuopräzipitiert

Die Messungen des TREK1 Kanals in Froschoozyten wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Wischmeyer, Physiologisches Institut, Universität Würzburg. Bei diesen Messungen konnte ausgeschlossen werden, dass Popdc1 selber einen Kanal bildet. Es konnte aber gezeigt werden, dass Popdc1 den TREK1-Strom verdoppelte, während der TASK1-Strom durch Popdc1 nicht verändert wurde. Eine Modulation des TREK1-Stroms erfolgte auch durch die anderen Familienmitglieder, war aber nicht so stark ausgeprägt. Eine Mutation in der cAMP-Bindungstasche von Popdc1 führte nur zu einer geringeren Erhöhung des TREK1-Stroms. Auch die Inhibition von TREK durch cAMP wurde in Anwesenheit von den Popdc-Proteinen erhöht. Dabei zeigte Popdc1 nach β -adrenerger Stimulation die größte Inhibierung, während Popdc2 keinen Einfluss zu haben schien und Popdc3 und die Punktmutante einen mittleren Einfluss auf die Inhibierung von TREK1 hatten. Eine cAMP-Bindung könnte die Konformation von Popdc-Proteinen ändern und so die Kanaleigenschaften von TREK1 verändern.

In Interaktionsstudien von Popdc1 und TREK1 konnte bisher nur in eine Richtung eine Interaktion beider Proteine gezeigt werden. Nach Transfektion beider Konstrukte in 293t-Zellen konnte im Western Blot ein Popdc1-Signal in der Spur der TREK1-Immunopräzipitation nachgewiesen werden. Gleiche Ergebnisse wurden auch mit Cos7-Zellen gemacht. Auch in diesem Fall konnte die Interaktion nur in eine Richtung demonstriert werden (Beobachtung Roland Schindler). Diese Versuche zeigten, dass Popdc1 und TREK1

miteinander interagieren und die Kanaleigenschaft von TREK1 verändern. Diese Eigenschaft von TREK1 ist bekannt und eine Modulation der Kanaleigenschaften wird auch von anderen TREK1-Interaktionspartnern hervorgerufen. Eine Interaktion mit AKAP150 transformiert z.B. den wenig-aktiven nach außen gerichteten Strom in einen robusten Strom, der daraufhin insensitiv gegenüber Arachidonsäure, Streckung und Ansäuerung reagiert. Die Assoziation mit AKAP150 integriert den TREK1-Kanal in ein Gerüst, wo beide G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren und TREK1 simultan andocken (Sandoz et al., 2006). Ein weiteres Protein, was an eine andere Stelle an TREK1 bindet, ist Mtap2. Dieses Protein ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, welches den TREK1-Strom durch die Vergrößerung der Kanaldichte in der Membran in Zusammenarbeit mit AKAP 150 steigert (Sandoz et al., 2008). Ob *Popdc1* auch ein Baustein dieses Komplexes ist, oder auf eine andere Weise mit TREK1 interagiert, muss noch nachgewiesen werden. Bisher konnte in TREK1 und *Popdc1* kotransfizierten Zellen aber keine offensichtliche Veränderung der TREK1-Membranpräsenz festgestellt werden. In Sinusknotenzellen von *Popdc1*-Mäusen konnte ebenso keine Veränderung der TREK1-Präsenz erkannt werden. Umgekehrt aber wurde *Popdc* in die von TREK1-induzierten Filopodien rekrutiert (Lauritzen et al., 2005).

Die *Popdc1*-TREK1-Interaktion könnte einen direkten Einfluss auf das Membranpotential haben und somit auch auf die Auslösung eines Aktionspotentials. TREK1 ist in der Regulation der Aktionspotentialdauer (Gurney and Manoury, 2009; Honoré, 2007) und an der Aufrechterhaltung des Ruhepotentials beteiligt (Lesage and Lazdunski, 2000). Des Weiteren ist gezeigt, dass TREK1 durch β -adrenerge Signalwege inhibiert wird (Fink et al., 1996; Patel et al., 1998). Diese Inhibition verläuft nicht nur über den PKA/cAMP-Signalweg sondern kann auch über einen Epac-abhängigen Mechanismen erfolgen (Liu et al., 2008). Eine Inhibition des TREK1-Kanals nach β -adrenerger Stimulation hat eine Erhöhung des Ruhepotentials zur Folge, denn die Kaliumionen können die Membran nicht mehr passieren und ein Aktionspotential wird leichter ausgelöst. In Sinusknotenzellen gibt es kein stabiles Ruhepotential, denn die Zellen depolarisieren vor Erreichen des Ruhepotentials wieder. TREK1 könnte aber in Regulation der Herzfrequenzadaptation nach β -adrenerger Stimulation involviert sein. In Anwesenheit von *Popdc1* war die Inhibierung des TREK1-Stroms erhöht. Dies könnte in einer stärkeren chronotropen Antwort des kardialen Schrittmachers resultieren. Fällt die Interaktion zwischen *Popdc1* und TREK1 durch den Knockout weg, ist die Inhibierung des TREK1-Kanals vermindert. Das Ruhepotential ist niedriger als unter Wildtypbedingungen und ein Aktionspotential wird schwerer ausgelöst, was die oben

erwähnten Sinusbradykardien erklären könnte. Um diese Daten auch *in vivo* zu verifizieren, sollte bei den *TREK1*-Nullmutanten überprüft werden, ob sie einen ähnlichen kardialen Phänotyp wie die *Popdc1*-Mäuse zeigen. Außerdem sollte überprüft werden, ob der *TREK1*-Strom in den Nullmutanten erniedrigt ist.

Neben der Interaktion von *TREK1* mit *Popdc1*, könnte *Popdc1* noch mit anderen Ionenkanälen interagieren bzw. mit Proteinen, die in Kanalorganisation oder in den Membrantransport involviert sind. Einer dieser Kandidaten könnte ein Protein sein, mit dem *Popdc1* in den T-Tubuli kolokalisiert. Aber bislang sind nur wenige Interaktionspartner von *Popdc1* bekannt. Eines ist das wie oben schon genannte *ZO1* (Osler et al., 2005), ein anderes bekanntes Interaktionsprotein ist *GEFT*, der GTP-Austauschfaktor der Rho/Rac/Cdc42-Familie. *GEFT* wird von *Popdc1* negativ reguliert, so dass es zu einer reduzierten Aktivierung der GTPasen-Signalgebung kommt (Smith et al., 2008). *GEFT* wird hoch in erregbarem Gewebe, wie Gehirn, Herz und Muskel exprimiert. Eine Überexpression von *GEFT* führt zu Veränderungen der Zellmorphologie und zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts. Dies beinhaltet die Formierung von Mikrospiques, Filopodien und Lamellipodien. Außerdem wird von *GEFT* die Zellproliferation und Transformation reguliert (Guo et al., 2003). Filopodien werden auch von *TREK1* nach Transfektion durch Interaktion mit dem Aktinzytoskelett induziert (Lauritzen et al., 2005) und *Popdc1* wurde nach Kotransfektion in diese Strukturen rekrutiert. Wie *Popdc1* in dieser konträren Situation reguliert wird bzw. wie *Popdc1* hier *TREK1* und *GEFT* reguliert, steht noch offen.

6.7 Das Arbeitsmodell von *Popdc1*

In dem folgenden Modell (Abb. 6-1) wird die mögliche Funktion von *Popdc1* sowie dessen Biochemie zusammengefasst: Das glykosylierte Protein inseriert mit drei Transmembrandomänen als Dimer in die Plasmamembran. Der interzelluläre C-Terminus trägt die *Popeye*-Domäne, die cAMP binden kann. Dieses wird nach β -adrenerger Stimulation durch die Adenylatzyklase gebildet. Unter Ruhebedingungen erhöht *Popdc1* den *TREK1*-Strom. Bindet aber cAMP an *Popdc1* nach β -adrenerger Stimulation, kommt es zu einer verstärkten Inhibierung des *TREK1*-Kanals. Möglicherweise verändert die cAMP-Bindung die Konformation von *Popdc1* und moduliert die Interaktion mit *TREK1*. Dadurch ändert sich der Strom durch diesen Kanal. Das hat zur Folge, dass sich die Schrittmacherfunktion des Sinusknotens verändert. Des Weiteren scheint *Popdc1* einen Einfluss auf das Überleben von Sinusknotenzellen zu haben, der durch den Verlust von HCN4-positiven Zellen im inferioren

Bereich in den *Popdc1*-Mäusen gezeigt wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in der *Popdc2*-Maus erzielt.

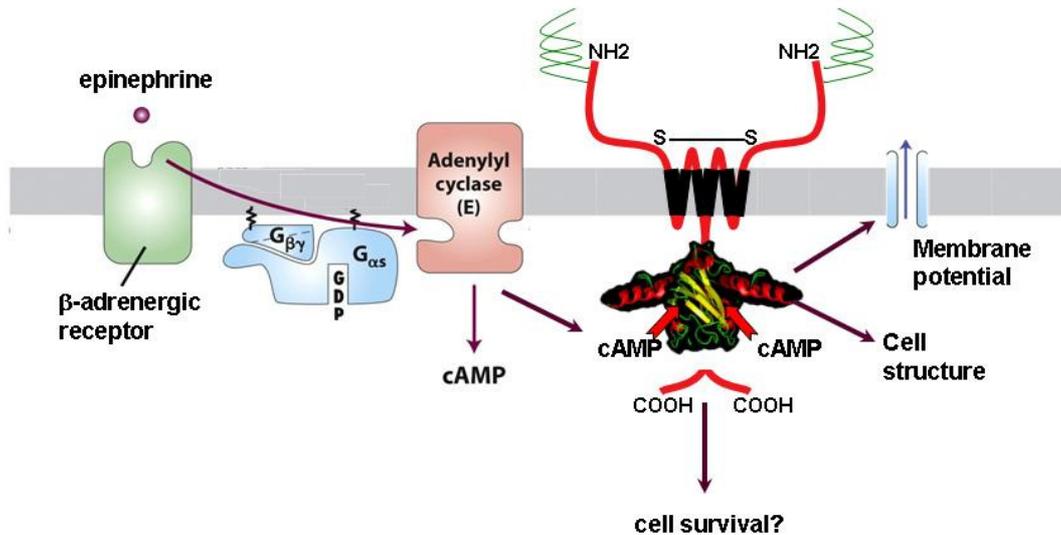


Abb. 6-1: Die schematische Darstellung der *Popdc1*-Biochemie und Funktion (Prof. Dr. Thomas Brand)
Popdc1 durchspannt als integrales Membranprotein die Lipiddoppelschicht. Es bildet ein Dimer. Der N-Terminus liegt extrazellulär und ist glykosyliert. Der C-Terminus ist intrazellulär und kann an cAMP binden, welches nach β-adrenerger Stimulation gebildet wird. *Popdc1* moduliert das Membranpotential über den TREK1-Kanal als auch die Zellstruktur und das Zellüberleben.

Die *Popdc1*-Maus zeigt im Expressionsmuster, in der Elektrophysiologie und in der Biochemie sehr viele Ähnlichkeiten mit der *Popdc2*-Maus. Da die Gene eine funktionelle Redundanz aufweisen, wäre es von großem Interesse, zuerst einmal den Phänotyp der *Popdc3*-Maus als auch anschließend den Doppel- und Dreifachknockout zu charakterisieren. Bei dem letzteren wären massive wenn nicht sogar letale Herzrhythmusstörungen zu erwarten, da kein anderes Familienmitglied in der Lage mehr wäre, das andere zu substituieren. Für Doppelmutanten gibt es bereits erste Daten. Diese Mäuse weisen eine deutlich verstärkte Sensitivität gegenüber adrenergen Hormonen auf (Beobachtungen Sonja Kreissl und Sebastian Maier). In einem Versuch wurden Mäuse mit Isoproterenol behandelt, dabei überlebte keine der Doppelmutanten diese Behandlung. Interessant wären auch Untersuchungen an Mäusen, die eine D200A-Punktmutation in der Phosphatbindungskassette tragen, um den Stress-Effekt näher zu beschreiben.

Es ist noch nicht untersucht worden, ob der kardiale Phänotyp der *Popdc1*-Mäuse, die älter sind als 8 Monate noch weiter verstärkt wird. Deshalb wären elektrophysiologische Untersuchungen an noch älteren *Popdc1*-Tieren auch sehr interessant. Eine Frage wäre, ob neben den bekannten stressinduzierte Sinusbradykardien weitere Herzarrhythmien dazukämen bzw. ob sich die Anzahl der Sinuspausen noch weiter erhöhen. Erste Hinweise gibt es von

älteren *Popdc2*-Mäusen. In diesen wurden ventrikuläre Arrhythmien festgestellt (Beobachtung Sonja Kreissl und Sebastian Maier).

Aufgrund der erhöhten Expression von *Popdc1* im ventrikulären Reizleitungssystem sollte dieses näher untersucht werden. Strukturelle Veränderungen z.B. im His-Bündel und in den Bündelverzweigungen könnten mit Hilfe der *Cx40^{EGFP/+}* untersucht werden (Miquerol et al., 2004). Dazu müsste die *Popdc1*-Maus in diese eingekreuzt werden. Strukturelle Veränderungen im Sinus- und AV-Knoten könnten so leichter beobachtet werden. Untersuchungen zur Interaktion von Popdc-Proteinen mit Ionenkanälen oder anderen Membranproteinen sollten ausgeweitet werden, um das Spektrum der Interaktionspartner zu definieren und eine kausale Verbindung zwischen der beobachteten Degenerationen des kardialen Schrittmacherzentrums und der primären biochemischen Funktion von *Popdc1* zu erarbeiten.

7 Literaturverzeichnis

- Adan, V., Crown, L. A., 2003. Diagnosis and treatment of sick sinus syndrome. *Am Fam Physician*. 67, 1725-1732.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2007. Molecular Biology of the Cell. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York.
- Alcolea, S., Theveniau-Ruissy, M., Jarry-Guichard, T., Marics, I., Tzouanacou, E., Chauvin, J. P., Briand, J. P., Moorman, A. F., Lamers, W. H., Gros, D. B., 1999. Downregulation of connexin 45 gene products during mouse heart development. *Circ Res*. 84, 1365-1379.
- Andrée, B., Fleige, A., Arnold, H. H., Brand, T., 2002. Mouse Pop1 is required for muscle regeneration in adult skeletal muscle. *Mol Cell Biol*. 22, 1504-1512.
- Andrée, B., Hillemann, T., Kessler-Ickson, G., Schmitt-John, T., Jockusch, H., Arnold, H. H., Brand, T., 2000. Isolation and characterization of the novel popeye gene family expressed in skeletal muscle and heart. *Dev Biol*. 223, 371-382.
- Ayettey, A. S., Navaratnam, V., 1978. The T-tubule system in the specialized and general myocardium of the rat. *J Anat*. 127, 125-140.
- Balijepalli, R. C., Foell, J. D., Hall, D. D., Hell, J. W., Kamp, T. J., 2006. Localization of cardiac L-type Ca(2+) channels to a caveolar macromolecular signaling complex is required for beta(2)-adrenergic regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 7500-7505.
- Berman, H. M., Ten Eyck, L. F., Goodsell, D. S., Haste, N. M., Kornev, A., Taylor, S. S., 2005. The cAMP binding domain: an ancient signaling module. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102, 45-50.
- Bers, D. M., 2001. Excitation-contraction coupling and cardiac contraction. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Mass.
- Bers, D. M., 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 415, 198-205.
- Bleeker, W. K., Mackaay, A. J., Masson-Pevet, M., Bouman, L. N., Becker, A. E., 1980. Functional and morphological organization of the rabbit sinus node. *Circ Res*. 46, 11-22.
- Bohn, G., Moosmang, S., Conrad, H., Ludwig, A., Hofmann, F., Klugbauer, N., 2000. Expression of T- and L-type calcium channel mRNA in murine sinoatrial node. *FEBS Lett*. 481, 73-76.
- Bossen, E. H., Sommer, J. R., 1984. Comparative stereology of the lizard and frog myocardium. *Tissue Cell*. 16, 173-178.
- Bossen, E. H., Sommer, J. R., Waugh, R. A., 1978. Comparative stereology of the mouse and finch left ventricle. *Tissue Cell*. 10, 773-784.
- Boyett, M. R., Honjo, H., Kodama, I., 2000. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc Res*. 47, 658-687.
- Boyett, M. R., Inada, S., Yoo, S., Li, J., Liu, J., Tellez, J., Greener, I. D., Honjo, H., Billeter, R., Lei, M., Zhang, H., Efimov, I. R., Dobrzynski, H., 2006. Connexins in the sinoatrial and atrioventricular nodes. *Adv Cardiol*. 42, 175-197.
- Brand, T., 2005. The Popeye domain-containing gene family. *Cell Biochem Biophys*. 43, 95-103.
- Breher, S. S., Molekulare Charakterisierung der *Popeye*-Familie im Huhn. Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Zell- und Molekularbiologie, Vol. Diplomarbeit. Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, 2003.
- Breher, S. S., Mavridou, E., Brenneis, C., Froese, A., Arnold, H. H., Brand, T., 2004. Popeye domain containing gene 2 (Popdc2) is a myocyte-specific differentiation marker during chick heart development. *Dev Dyn*. 229, 695-702.

- Brette, F., Orchard, C., 2003. T-tubule function in mammalian cardiac myocytes. *Circ Res.* 92, 1182-1192.
- Brette, F., Orchard, C., 2007. Resurgence of cardiac t-tubule research. *Physiology (Bethesda).* 22, 167-173.
- Brittsan, A. G., Kranias, E. G., 2000. Phospholamban and cardiac contractile function. *J Mol Cell Cardiol.* 32, 2131-2139.
- Canaves, J. M., Taylor, S. S., 2002. Classification and phylogenetic analysis of the cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit family. *J Mol Evol.* 54, 17-29.
- Catterall, W. A., 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron.* 26, 13-25.
- Cheng, H., Cannell, M. B., Lederer, W. J., 1994. Propagation of excitation-contraction coupling into ventricular myocytes. *Pflugers Arch.* 428, 415-417.
- Cheng, X., Ji, Z., Tsalkova, T., Mei, F., 2008. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 40, 651-662.
- Christensen, A. E., Selheim, F., de Rooij, J., Dremier, S., Schwede, F., Dao, K. K., Martinez, A., Maenhaut, C., Bos, J. L., Genieser, H. G., Doskeland, S. O., 2003. cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. *J Biol Chem.* 278, 35394-35402.
- Clark, R. B., Tremblay, A., Melnyk, P., Allen, B. G., Giles, W. R., Fiset, C., 2001. T-tubule localization of the inward-rectifier K(+) channel in mouse ventricular myocytes: a role in K(+) accumulation. *J Physiol.* 537, 979-992.
- Cohen, S. A., Levitt, L. K., 1993. Partial characterization of the rH1 sodium channel protein from rat heart using subtype-specific antibodies. *Circ Res.* 73, 735-742.
- Coppen, S. R., Dupont, E., Rothery, S., Severs, N. J., 1998. Connexin45 expression is preferentially associated with the ventricular conduction system in mouse and rat heart. *Circ Res.* 82, 232-243.
- Coppen, S. R., Kodama, I., Boyett, M. R., Dobrzynski, H., Takagishi, Y., Honjo, H., Yeh, H. I., Severs, N. J., 1999a. Connexin45, a major connexin of the rabbit sinoatrial node, is co-expressed with connexin43 in a restricted zone at the nodal-crista terminalis border. *J Histochem Cytochem.* 47, 907-918.
- Coppen, S. R., Severs, N. J., Gourdie, R. G., 1999b. Connexin45 (alpha 6) expression delineates an extended conduction system in the embryonic and mature rodent heart. *Dev Genet.* 24, 82-90.
- Cordeiro, J. M., Spitzer, K. W., Giles, W. R., Ershler, P. E., Cannell, M. B., Bridge, J. H., 2001. Location of the initiation site of calcium transients and sparks in rabbit heart Purkinje cells. *J Physiol.* 531, 301-314.
- Dao, K. K., Teigen, K., Kopperud, R., Hodneland, E., Schwede, F., Christensen, A. E., Martinez, A., Doskeland, S. O., 2006. Epac1 and cAMP-dependent protein kinase holoenzyme have similar cAMP affinity, but their cAMP domains have distinct structural features and cyclic nucleotide recognition. *J Biol Chem.* 281, 21500-21511.
- Davidson, B., Levine, M., 2003. Evolutionary origins of the vertebrate heart: Specification of the cardiac lineage in *Ciona intestinalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 11469-11473.
- Davis, L. M., Rodefeld, M. E., Green, K., Beyer, E. C., Saffitz, J. E., 1995a. Gap junction protein phenotypes of the human heart and conduction system. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 6, 813-822.
- Davis, L. M., Saffitz, J. E., Beyer, E. C., 1995b. Modulation of connexin43 expression: effects on cellular coupling. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 6, 103-114.
- De Maziere, A. M., van Ginneken, A. C., Wilders, R., Jongasma, H. J., Bouman, L. N., 1992. Spatial and functional relationship between myocytes and fibroblasts in the rabbit sinoatrial node. *J Mol Cell Cardiol.* 24, 567-578.

- de Rooij, J., Rehmann, H., van Triest, M., Cool, R. H., Wittinghofer, A., Bos, J. L., 2000. Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *J Biol Chem.* 275, 20829-20836.
- Delorme, B., Dahl, E., Jarry-Guichard, T., Marics, I., Briand, J. P., Willecke, K., Gros, D., Theveniau-Ruissy, M., 1995. Developmental regulation of connexin 40 gene expression in mouse heart correlates with the differentiation of the conduction system. *Dev Dyn.* 204, 358-371.
- Di Maio, A., Karko, K., Snopko, R. M., Mejia-Alvarez, R., Franzini-Armstrong, C., 2007. T-tubule formation in cardiac myocytes: two possible mechanisms? *J Muscle Res Cell Motil.* 28, 231-241.
- DiAngelo, J. R., Vasavada, T. K., Cain, W., Duncan, M. K., 2001. Production of monoclonal antibodies against chicken Pop1 (BVES). *Hybrid Hybridomics.* 20, 377-381.
- DiFrancesco, D., Ferroni, A., Mazzanti, M., Tromba, C., 1986. Properties of the hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J Physiol.* 377, 61-88.
- DiFrancesco, D., Tromba, C., 1988a. Inhibition of the hyperpolarization-activated current (if) induced by acetylcholine in rabbit sino-atrial node myocytes. *J Physiol.* 405, 477-491.
- DiFrancesco, D., Tromba, C., 1988b. Muscarinic control of the hyperpolarization-activated current (if) in rabbit sino-atrial node myocytes. *J Physiol.* 405, 493-510.
- Diller, T. C., Madhusudan, Xuong, N. H., Taylor, S. S., 2001. Molecular basis for regulatory subunit diversity in cAMP-dependent protein kinase: crystal structure of the type II beta regulatory subunit. *Structure.* 9, 73-82.
- Dobrzynski, H., Boyett, M. R., Anderson, R. H., 2007. New insights into pacemaker activity: promoting understanding of sick sinus syndrome. *Circulation.* 115, 1921-1932.
- Dobrzynski, H., Marples, D. D., Musa, H., Yamanushi, T. T., Henderson, Z., Takagishi, Y., Honjo, H., Kodama, I., Boyett, M. R., 2001. Distribution of the muscarinic K⁺ channel proteins Kir3.1 and Kir3.4 in the ventricle, atrium, and sinoatrial node of heart. *J Histochem Cytochem.* 49, 1221-1234.
- Dobrzynski, H., Nikolski, V. P., Sambelashvili, A. T., Greener, I. D., Yamamoto, M., Boyett, M. R., Efimov, I. R., 2003. Site of origin and molecular substrate of atrioventricular junctional rhythm in the rabbit heart. *Circ Res.* 93, 1102-1110.
- Dodge-Kafka, K. L., Langeberg, L., Scott, J. D., 2006. Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of A-kinase anchoring proteins. *Circ Res.* 98, 993-1001.
- Dolber, P. C., Beyer, E. C., Junker, J. L., Spach, M. S., 1992. Distribution of gap junctions in dog and rat ventricle studied with a double-label technique. *J Mol Cell Cardiol.* 24, 1443-1457.
- Enserink, J. M., Christensen, A. E., de Rooij, J., van Triest, M., Schwede, F., Genieser, H. G., Doskeland, S. O., Blank, J. L., Bos, J. L., 2002. A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat Cell Biol.* 4, 901-906.
- Ezerman, E. B., Ishikawa, H., 1967. Differentiation of the sarcoplasmic reticulum and T-system in developing chick skeletal muscle in vitro. *J. Cell Biol.* 35, 405-420.
- Fink, M., Duprat, F., Lesage, F., Reyes, R., Romey, G., Heurteaux, C., Lazdunski, M., 1996. Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *EMBO J.* 15, 6854-6862.
- Forbes, M. S., Hawkey, L. A., Sperelakis, N., 1984. The transverse-axial tubular system (TATS) of mouse myocardium: its morphology in the developing and adult animal. *Am J Anat.* 170, 143-162.
- Forbes, M. S., van Neil, E. E., 1988. Membrane systems of guinea pig myocardium: ultrastructure and morphometric studies. *Anat Rec.* 222, 362-379.

- Frank, J. S., Mottino, G., Reid, D., Molday, R. S., Philipson, K. D., 1992. Distribution of the Na(+)-Ca²⁺ exchange protein in mammalian cardiac myocytes: an immunofluorescence and immunocolloidal gold-labeling study. *J Cell Biol.* 117, 337-345.
- Froese, A., The Popeye domain containing gene 2 (Popdc2). Generation and functional characterization of a null mutant in mice and promoter analysis. Vol. Doktorarbeit, Julius - Maximilians - Universität Würzburg, Würzburg, 2007.
- Froese, A., Brand, T., 2008. Expression pattern of Popdc2 during mouse embryogenesis and in the adult. *Dev Dyn.* 237, 780-787.
- Froese, A., Breher, S. S., Schlueter, J., Waldeyer, C., Kirchmaier, B., Kutzt, J., Torlopp, A., Vauti, F., Arnold, H. H., Müller, T., Winkler, C., Schwerte, T., Kirchhof, P., Fabritz, L., Brand, T., eingereicht. Popdc2 is a novel cAMP-binding protein with a stress-related role in cardiac pacemaking. *eingereicht.*
- Graham, V., Zhang, H., Willis, S., Creazzo, T. L., 2006. Expression of a two-pore domain K⁺ channel (TASK-1) in developing avian and mouse ventricular conduction systems. *Dev Dyn.* 235, 143-151.
- Gros, D. B., Jongsma, H. J., 1996. Connexins in mammalian heart function. *Bioessays.* 18, 719-730.
- Guo, X., Stafford, L. J., Bryan, B., Xia, C., Ma, W., Wu, X., Liu, D., Songyang, Z., Liu, M., 2003. A Rac/Cdc42-specific exchange factor, GEFT, induces cell proliferation, transformation, and migration. *J Biol Chem.* 278, 13207-13215.
- Gurney, A., Manoury, B., 2009. Two-pore potassium channels in the cardiovascular system. *Eur Biophys J.* 38, 305-318.
- Haddock, P. S., Coetzee, W. A., Cho, E., Porter, L., Katoh, H., Bers, D. M., Jafri, M. S., Artman, M., 1999. Subcellular [Ca²⁺]_i gradients during excitation-contraction coupling in newborn rabbit ventricular myocytes. *Circ Res.* 85, 415-427.
- Hagendorff, A., Schumacher, B., Kirchhoff, S., Luderitz, B., Willecke, K., 1999. Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in Connexin40-deficient mice analyzed by transesophageal stimulation. *Circulation.* 99, 1508-1515.
- Hagiwara, Y., Nishina, Y., Yorifuji, H., Kikuchi, T., 2002. Immunolocalization of caveolin-1 and caveolin-3 in monkey skeletal, cardiac and uterine smooth muscles. *Cell Struct Funct.* 27, 375-382.
- Han, W., Bao, W., Wang, Z., Nattel, S., 2002. Comparison of ion-channel subunit expression in canine cardiac Purkinje fibers and ventricular muscle. *Circ Res.* 91, 790-797.
- Harzheim, D., Pfeiffer, K. H., Fabritz, L., Kremmer, E., Buch, T., Waisman, A., Kirchhof, P., Kaupp, U. B., Seifert, R., 2008. Cardiac pacemaker function of HCN4 channels in mice is confined to embryonic development and requires cyclic AMP. *EMBO J.* 27, 692-703.
- Haufe, V., Chamberland, C., Dumaine, R., 2007. The promiscuous nature of the cardiac sodium current. *J Mol Cell Cardiol.* 42, 469-477.
- Haufe, V., Cordeiro, J. M., Zimmer, T., Wu, Y. S., Schiccitano, S., Benndorf, K., Dumaine, R., 2005. Contribution of neuronal sodium channels to the cardiac fast sodium current I_{Na} is greater in dog heart Purkinje fibers than in ventricles. *Cardiovasc Res.* 65, 117-127.
- He, J., Conklin, M. W., Foell, J. D., Wolff, M. R., Haworth, R. A., Coronado, R., Kamp, T. J., 2001. Reduction in density of transverse tubules and L-type Ca(2+) channels in canine tachycardia-induced heart failure. *Cardiovasc Res.* 49, 298-307.
- Heinzel, F. R., Bito, V., Volders, P. G., Antoons, G., Mubagwa, K., Sipido, K. R., 2002. Spatial and temporal inhomogeneities during Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum in pig ventricular myocytes. *Circ Res.* 91, 1023-1030.

- Herrmann, S., Stieber, J., Stockl, G., Hofmann, F., Ludwig, A., 2007. HCN4 provides a 'depolarization reserve' and is not required for heart rate acceleration in mice. *EMBO J.* 26, 4423-4432.
- Hervieu, G. J., Cluderay, J. E., Gray, C. W., Green, P. J., Ranson, J. L., Randall, A. D., Meadows, H. J., 2001. Distribution and expression of TREK-1, a two-pore-domain potassium channel, in the adult rat CNS. *Neuroscience.* 103, 899-919.
- Heurteaux, C., Guy, N., Laigle, C., Blondeau, N., Duprat, F., Mazzuca, M., Lang-Lazdunski, L., Widmann, C., Zanzouri, M., Romey, G., Lazdunski, M., 2004. TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J.* 23, 2684-2695.
- Hitz, M. P., Pandur, P., Brand, T., Kuhl, M., 2002. Cardiac specific expression of Xenopus Popeye-1. *Mech Dev.* 115, 123-126.
- Honoré, E., 2007. The neuronal background K²P channels: focus on TREK1. *Nat Rev Neurosci.* 8, 251-261.
- Hulme, J. T., Lin, T. W., Westenbroek, R. E., Scheuer, T., Catterall, W. A., 2003. Beta-adrenergic regulation requires direct anchoring of PKA to cardiac CaV1.2 channels via a leucine zipper interaction with A kinase-anchoring protein 15. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 13093-13098.
- Hunter, A. W., Barker, R. J., Zhu, C., Gourdie, R. G., 2005. Zonula occludens-1 alters connexin43 gap junction size and organization by influencing channel accretion. *Mol Biol Cell.* 16, 5686-5698.
- Huppelsberg, J., Walter, K., 2005. Kurzlehrbuch Physiologie. Thieme, Stuttgart.
- Imura, A., Tsuji, Y., Murata, M., Maeda, R., Kubota, K., Iwano, A., Obuse, C., Togashi, K., Tominaga, M., Kita, N., Tomiyama, K., Iijima, J., Nabeshima, Y., Fujioka, M., Asato, R., Tanaka, S., Kojima, K., Ito, J., Nozaki, K., Hashimoto, N., Ito, T., Nishio, T., Uchiyama, T., Fujimori, T., 2007. alpha-Klotho as a regulator of calcium homeostasis. *Science.* 316, 1615-1618.
- Isom, L. L., 2001. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist.* 7, 42-54.
- James, T. N., Sherf, L., Fine, G., Morales, A. R., 1966. Comparative ultrastructure of the sinus node in man and dog. *Circulation.* 34, 139-163.
- Jones, S. A., Morton, M. J., Hunter, M., Boyett, M. R., 2002. Expression of TASK-1, a pH-sensitive twin-pore domain K(+) channel, in rat myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283, H181-185.
- Kamp, T. J., Hell, J. W., 2000. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res.* 87, 1095-1102.
- Kannan, N., Wu, J., Anand, G. S., Yooseph, S., Neuwald, A. F., Venter, J. C., Taylor, S. S., 2007. Evolution of allostery in the cyclic nucleotide binding module. *Genome Biol.* 8, R264.
- Kawaguchi, M., Hager, H. A., Wada, A., Koyama, T., Chang, M. S., Bader, D. M., 2008. Identification of a novel intracellular interaction domain essential for Bves function. *PLoS ONE.* 3, e2261.
- Kieval, R. S., Bloch, R. J., Lindenmayer, G. E., Ambesi, A., Lederer, W. J., 1992. Immunofluorescence localization of the Na-Ca exchanger in heart cells. *Am J Physiol.* 263, C545-550.
- Kirby, M. L., 2007. Cardiac development. Oxford University Press, Inc., New York.
- Kirchhoff, S., Nelles, E., Hagedorff, A., Kruger, O., Traub, O., Willecke, K., 1998. Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Curr Biol.* 8, 299-302.
- Kiss, E., Edes, I., Sato, Y., Luo, W., Liggett, S. B., Kranias, E. G., 1997. beta-Adrenergic regulation of cAMP and protein phosphorylation in phospholamban-knockout mouse hearts. *Am J Physiol.* 272, H785-90.

- Knight, R. F., Bader, D. M., Backstrom, J. R., 2003. Membrane topology of Bves/Pop1A, a cell adhesion molecule that displays dynamic changes in cellular distribution during development. *J Biol Chem.* 278, 32872-32879.
- Knollmann, B. C., Kirchhof, P., Sirenko, S. G., Degen, H., Greene, A. E., Schober, T., Mackow, J. C., Fabritz, L., Potter, J. D., Morad, M., 2003. Familial hypertrophic cardiomyopathy-linked mutant troponin T causes stress-induced ventricular tachycardia and Ca²⁺-dependent action potential remodeling. *Circ Res.* 92, 428-436.
- Koh, S. D., Monaghan, K., Sergeant, G. P., Ro, S., Walker, R. L., Sanders, K. M., Horowitz, B., 2001. TREK-1 regulation by nitric oxide and cGMP-dependent protein kinase. An essential role in smooth muscle inhibitory neurotransmission. *J Biol Chem.* 276, 44338-44346.
- Korner, H., Sofia, H. J., Zumft, W. G., 2003. Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev.* 27, 559-592.
- Kreuzberg, M. M., Sohl, G., Kim, J. S., Verselis, V. K., Willecke, K., Bukauskas, F. F., 2005. Functional properties of mouse connexin30.2 expressed in the conduction system of the heart. *Circ Res.* 96, 1169-1177.
- Kreuzberg, M. M., Willecke, K., Bukauskas, F. F., 2006. Connexin-mediated cardiac impulse propagation: connexin 30.2 slows atrioventricular conduction in mouse heart. *Trends Cardiovasc Med.* 16, 266-272.
- Krüger, O., Plum, A., Kim, J. S., Winterhager, E., Maxeiner, S., Hallas, G., Kirchhoff, S., Traub, O., Lamers, W. H., Willecke, K., 2000. Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development.* 127, 4179-4193.
- Kuhlmann, M. T., Kirchhof, P., Klocke, R., Hasib, L., Stypmann, J., Fabritz, L., Stelljes, M., Tian, W., Zwiener, M., Mueller, M., Kienast, J., Breithardt, G., Nikol, S., 2006. G-CSF/SCF reduces inducible arrhythmias in the infarcted heart potentially via increased connexin43 expression and arteriogenesis. *J Exp Med.* 203, 87-97.
- Kuhtz, J., Struktur-Funktionsanalyse der Popeye-Domäne des Popdc1-Protein der Maus: "site-directed" Mutagenese, cAMP-Bindung und phänotypische Charakterisierung. Vol. Diplomarbeit. Julius - Maximilians - Universität Würzburg, Würzburg, 2008.
- Kumai, M., Nishii, K., Nakamura, K., Takeda, N., Suzuki, M., Shibata, Y., 2000. Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development.* 127, 3501-3512.
- Kupersmidt, S., Yang, T., Anderson, M. E., Wessels, A., Niswender, K. D., Magnuson, M. A., Roden, D. M., 1999. Replacement by homologous recombination of the minK gene with lacZ reveals restriction of minK expression to the mouse cardiac conduction system. *Circ Res.* 84, 146-152.
- Kuro-o, M., Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., Utsugi, T., Ohyama, Y., Kurabayashi, M., Kaname, T., Kume, E., Iwasaki, H., Iida, A., Shiraki-Iida, T., Nishikawa, S., Nagai, R., Nabeshima, Y. I., 1997. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature.* 390, 45-51.
- Lauritzen, I., Chemin, J., Honore, E., Jodar, M., Guy, N., Lazdunski, M., Jane Patel, A., 2005. Cross-talk between the mechano-gated K2P channel TREK-1 and the actin cytoskeleton. *EMBO Rep.* 6, 642-648.
- Le Scouarnec, S., Bhasin, N., Vieyres, C., Hund, T. J., Cunha, S. R., Koval, O., Marionneau, C., Chen, B., Wu, Y., Demolombe, S., Song, L. S., Le Marec, H., Probst, V., Schott, J. J., Anderson, M. E., Mohler, P. J., 2008. Dysfunction in ankyrin-B-dependent ion channel and transporter targeting causes human sinus node disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 15617-15622.
- Lei, M., Goddard, C., Liu, J., Leoni, A. L., Royer, A., Fung, S. S., Xiao, G., Ma, A., Zhang, H., Charpentier, F., Vandenberg, J. I., Colledge, W. H., Grace, A. A., Huang, C. L.,

2005. Sinus node dysfunction following targeted disruption of the murine cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *J Physiol*. 567, 387-400.
- Lei, M., Jones, S. A., Liu, J., Lancaster, M. K., Fung, S. S., Dobrzynski, H., Camelliti, P., Maier, S. K., Noble, D., Boyett, M. R., 2004. Requirement of neuronal- and cardiac-type sodium channels for murine sinoatrial node pacemaking. *J Physiol*. 559, 835-848.
- Leonoudakis, D., Gray, A. T., Winegar, B. D., Kindler, C. H., Harada, M., Taylor, D. M., Chavez, R. A., Forsayeth, J. R., Yost, C. S., 1998. An open rectifier potassium channel with two pore domains in tandem cloned from rat cerebellum. *J Neurosci*. 18, 868-877.
- Lesage, F., Lazdunski, M., 2000. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol*. 279, F793-801.
- Li, Z. B., Wang, X. L., 2006. [Recent advances in the study of arachidonic acid-sensitive and mechano-gated tandem-pore-domain potassium channels--TREK]. *Yao Xue Xue Bao*. 41, 193-196.
- Lin, S., Zhao, D., Bownes, M., 2002. The function of a novel gene (*Z14/ DMBves*) in *Drosophila* oogenesis. *43rd Annual Drosophila Research Conference, California*.
- Lin, S., Zhao, D., Bownes, M., 2007. Blood vessel/epicardial substance (*bves*) expression, essential for embryonic development, is down regulated by *Grk/EFGR* signalling. *Int J Dev Biol*. 51, 37-44.
- Liu, H., Enyeart, J. A., Enyeart, J. J., 2008. ACTH inhibits *bTREK-1* K⁺ channels through multiple cAMP-dependent signaling pathways. *J Gen Physiol*. 132, 279-294.
- Liu, J., Dobrzynski, H., Yanni, J., Boyett, M. R., Lei, M., 2007. Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels. *Cardiovasc Res*. 73, 729-738.
- Liu, W., Saint, D. A., 2004. Heterogeneous expression of tandem-pore K⁺ channel genes in adult and embryonic rat heart quantified by real-time polymerase chain reaction. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 31, 174-178.
- Lopes, C. M., Gallagher, P. G., Buck, M. E., Butler, M. H., Goldstein, S. A., 2000. Proton block and voltage gating are potassium-dependent in the cardiac leak channel *Kcnk3*. *J Biol Chem*. 275, 16969-16978.
- Maier, S. K., Westenbroek, R. E., McCormick, K. A., Curtis, R., Scheuer, T., Catterall, W. A., 2004. Distinct subcellular localization of different sodium channel alpha and beta subunits in single ventricular myocytes from mouse heart. *Circulation*. 109, 1421-1427.
- Maier, S. K., Westenbroek, R. E., Schenkman, K. A., Feigl, E. O., Scheuer, T., Catterall, W. A., 2002. An unexpected role for brain-type sodium channels in coupling of cell surface depolarization to contraction in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 4073-4078.
- Maier, S. K., Westenbroek, R. E., Yamanushi, T. T., Dobrzynski, H., Boyett, M. R., Catterall, W. A., Scheuer, T., 2003. An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100, 3507-3512.
- Maingret, F., Honore, E., Lazdunski, M., Patel, A. J., 2002. Molecular basis of the voltage-dependent gating of *TREK-1*, a mechano-sensitive K(+) channel. *Biochem Biophys Res Commun*. 292, 339-346.
- Maingret, F., Lauritzen, I., Patel, A. J., Heurteaux, C., Reyes, R., Lesage, F., Lazdunski, M., Honore, E., 2000. *TREK-1* is a heat-activated background K(+) channel. *EMBO J*. 19, 2483-2491.
- Maingret, F., Patel, A. J., Lesage, F., Lazdunski, M., Honore, E., 1999. Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the *TREK-1* potassium channel. *J Biol Chem*. 274, 26691-26696.

- Maltsev, V. A., Lakatta, E. G., 2008. Dynamic interactions of an intracellular Ca²⁺ clock and membrane ion channel clock underlie robust initiation and regulation of cardiac pacemaker function. *Cardiovasc Res.* 77, 274-284.
- Maltsev, V. A., Vinogradova, T. M., Lakatta, E. G., 2006. The emergence of a general theory of the initiation and strength of the heartbeat. *J Pharmacol Sci.* 100, 338-369.
- Mangoni, M. E., Couette, B., Bourinet, E., Platzer, J., Reimer, D., Striessnig, J., Nargeot, J., 2003. Functional role of L-type Cav1.3 Ca²⁺ channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 5543-5548.
- Mangoni, M. E., Traboulsie, A., Leoni, A. L., Couette, B., Marger, L., Le Quang, K., Kupfer, E., Cohen-Solal, A., Vilar, J., Shin, H. S., Escande, D., Charpentier, F., Nargeot, J., Lory, P., 2006. Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking CaV3.1/alpha1G T-type calcium channels. *Circ Res.* 98, 1422-1430.
- 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.
- Marx, S. O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosemblyt, N., Marks, A. R., 2000. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell.* 101, 365-376.
- McConnachie, G., Langeberg, L. K., Scott, J. D., 2006. AKAP signaling complexes: getting to the heart of the matter. *Trends Mol Med.* 12, 317-323.
- McKay, D. B., Steitz, T. A., 1981. Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution suggests binding to left-handed B-DNA. *Nature.* 290, 744-749.
- Medhurst, A. D., Rennie, G., Chapman, C. G., Meadows, H., Duckworth, M. D., Kelsell, R. E., Gloger, II, Pangalos, M. N., 2001. Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res Mol Brain Res.* 86, 101-114.
- Meister, P., Mutagenese der Phosphat-Bindungskassette von Popdc2. Vol. Diplomarbeit. Julius- - Maximilians - Universität Würzburg, Würzburg, 2008.
- Millar, N., 2001. Biology statistics made simple using Excel. *School Science Review.* 83, 23-34.
- Miquerol, L., Meysen, S., Mangoni, M., Bois, P., van Rijen, H. V., Abran, P., Jongsma, H., Nargeot, J., Gros, D., 2004. Architectural and functional asymmetry of the His-Purkinje system of the murine heart. *Cardiovasc Res.* 63, 77-86.
- Mohler, P. J., Davis, J. Q., Bennett, V., 2005. Ankyrin-B coordinates the Na/K ATPase, Na/Ca exchanger, and InsP3 receptor in a cardiac T-tubule/SR microdomain. *PLoS Biol.* 3, e423.
- Mohler, P. J., Schott, J. J., Gramolini, A. O., Dilly, K. W., Guatimosim, S., duBell, W. H., Song, L. S., Haurogne, K., Kyndt, F., Ali, M. E., Rogers, T. B., Lederer, W. J., Escande, D., Le Marec, H., Bennett, V., 2003. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature.* 421, 634-639.
- Mohler, P. J., Wehrens, X. H., 2007. Mechanisms of human arrhythmia syndromes: abnormal cardiac macromolecular interactions. *Physiology (Bethesda).* 22, 342-350.
- Moosmang, S., Stieber, J., Zong, X., Biel, M., Hofmann, F., Ludwig, A., 2001. Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem.* 268, 1646-1652.
- Nattel, S., Maguy, A., Le Bouter, S., Yeh, Y. H., 2007. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev.* 87, 425-456.
- Nelson, D. A., Benson, E. S., 1963. On the structural continuities of the transverse tubular system of rabbit and human myocardial cells. *J Cell Biol.* 16, 297-313.

- Nerbonne, J. M., Kass, R. S., 2005. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev.* 85, 1205-1253.
- Nishii, K., Kumai, M., Egashira, K., Miwa, T., Hashizume, K., Miyano, Y., Shibata, Y., 2003. Mice lacking connexin45 conditionally in cardiac myocytes display embryonic lethality similar to that of germline knockout mice without endocardial cushion defect. *Cell Commun Adhes.* 10, 365-369.
- Oestreich, E. A., Wang, H., Malik, S., Kaproth-Joslin, K. A., Blaxall, B. C., Kelley, G. G., Dirksen, R. T., Smrcka, A. V., 2007. Epac-mediated activation of phospholipase C(epsilon) plays a critical role in beta-adrenergic receptor-dependent enhancement of Ca²⁺ mobilization in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 282, 5488-5495.
- Oosthoek, P. W., Viragh, S., Lamers, W. H., Moorman, A. F., 1993. Immunohistochemical delineation of the conduction system. II: The atrioventricular node and Purkinje fibers. *Circ Res.* 73, 482-491.
- Osler, M. E., Chang, M. S., Bader, D. M., 2005. Bves modulates epithelial integrity through an interaction at the tight junction. *J Cell Sci.* 118, 4667-4678.
- Papadatos, G. A., Wallerstein, P. M., Head, C. E., Ratcliff, R., Brady, P. A., Benndorf, K., Saumarez, R. C., Trezise, A. E., Huang, C. L., Vandenberg, J. I., Colledge, W. H., Grace, A. A., 2002. Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 6210-6215.
- Parnes, D., Jacoby, V., Sharabi, A., Schlesinger, H., Brand, T., Kessler-Icekson, G., 2007. The *Popdc* gene family in the rat: molecular cloning, characterization and expression analysis in the heart and cultured cardiomyocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1769, 586-592.
- Parton, R. G., Way, M., Zorzi, N., Stang, E., 1997. Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. *J Cell Biol.* 136, 137-154.
- Patel, A. J., Honore, E., 2001. Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends Neurosci.* 24, 339-346.
- Patel, A. J., Honore, E., Lesage, F., Fink, M., Romey, G., Lazdunski, M., 1999. Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat Neurosci.* 2, 422-426.
- Patel, A. J., Honore, E., Maingret, F., Lesage, F., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., 1998. A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *EMBO J.* 17, 4283-4290.
- Pereira, L., Metrich, M., Fernandez-Velasco, M., Lucas, A., Leroy, J., Perrier, R., Morel, E., Fischmeister, R., Richard, S., Benitah, J. P., Lezoualc'h, F., Gomez, A. M., 2007. The cAMP binding protein Epac modulates Ca²⁺ sparks by a Ca²⁺/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes. *J Physiol.* 583, 685-694.
- Platzter, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H., Striessnig, J., 2000. Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels. *Cell.* 102, 89-97.
- Probst, V., Kyndt, F., Potet, F., Trochu, J. N., Mialet, G., Demolombe, S., Schott, J. J., Baro, I., Escande, D., Le Marec, H., 2003. Haploinsufficiency in combination with aging causes SCN5A-linked hereditary Lenegre disease. *J Am Coll Cardiol.* 41, 643-652.
- Pucéat, M., Korichneva, I., Cassoly, R., Vassort, G., 1995. Identification of band 3-like proteins and Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in isolated cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 270, 1315-1322.
- Razani, B., Woodman, S. E., Lisanti, M. P., 2002. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev.* 54, 431-467.

- Reaume, A. G., de Sousa, P. A., Kulkarni, S., Langille, B. L., Zhu, D., Davies, T. C., Juneja, S. C., Kidder, G. M., Rossant, J., 1995. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science*. 267, 1831-1834.
- Reese, D. E., Zavaljevski, M., Streiff, N. L., Bader, D., 1999. bves: A novel gene expressed during coronary blood vessel development. *Dev Biol*. 209, 159-171.
- Rehmann, H., Prakash, B., Wolf, E., Rueppel, A., de Rooij, J., Bos, J. L., Wittinghofer, A., 2003a. Structure and regulation of the cAMP-binding domains of Epac2. *Nat Struct Biol*. 10, 26-32.
- Rehmann, H., Schwede, F., Doskeland, S. O., Wittinghofer, A., Bos, J. L., 2003b. Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. *J Biol Chem*. 278, 38548-38556.
- Rehmann, H., Wittinghofer, A., Bos, J. L., 2007. Capturing cyclic nucleotides in action: snapshots from crystallographic studies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8, 63-73.
- Ripley, A. N., Chang, M. S., Bader, D. M., 2004. Bves is expressed in the epithelial components of the retina, lens, and cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 45, 2475-2483.
- Ripley, A. N., Osler, M. E., Wright, C. V., Bader, D., 2006. Xbves is a regulator of epithelial movement during early *Xenopus laevis* development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 614-619.
- Royer, A., van Veen, T. A., Le Bouter, S., Marionneau, C., Griol-Charhbili, V., Leoni, A. L., Steenman, M., van Rijen, H. V., Demolombe, S., Goddard, C. A., Richer, C., Escoubet, B., Jarry-Guichard, T., Colledge, W. H., Gros, D., de Bakker, J. M., Grace, A. A., Escande, D., Charpentier, F., 2005. Mouse model of SCN5A-linked hereditary Lenegre's disease: age-related conduction slowing and myocardial fibrosis. *Circulation*. 111, 1738-1746.
- Sandoz, G., Tardy, M. P., Thummler, S., Feliciangeli, S., Lazdunski, M., Lesage, F., 2008. Mtap2 is a constituent of the protein network that regulates twik-related K⁺ channel expression and trafficking. *J Neurosci*. 28, 8545-8552.
- Sandoz, G., Thummler, S., Duprat, F., Feliciangeli, S., Vinh, J., Escoubas, P., Guy, N., Lazdunski, M., Lesage, F., 2006. AKAP150, a switch to convert mechano-, pH- and arachidonic acid-sensitive TREK K(+) channels into open leak channels. *EMBO J*. 25, 5864-5872.
- Schmidt, R. F., Lang, F., Thews, G., 2005. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
- Schram, G., Pourrier, M., Melnyk, P., Nattel, S., 2002. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res*. 90, 939-950.
- Scriven, D. R., Dan, P., Moore, E. D., 2000. Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys J*. 79, 2682-2691.
- Scriven, D. R., Klimek, A., Asghari, P., Bellve, K., Moore, E. D., 2005. Caveolin-3 is adjacent to a group of extradyadic ryanodine receptors. *Biophys J*. 89, 1893-1901.
- Shabb, J. B., Corbin, J. D., 1992. Cyclic nucleotide-binding domains in proteins having diverse functions. *J Biol Chem*. 267, 5723-5726.
- Shi, W., Wymore, R., Yu, H., Wu, J., Wymore, R. T., Pan, Z., Robinson, R. B., Dixon, J. E., McKinnon, D., Cohen, I. S., 1999. Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ Res*. 85, e1-6.
- Shimada, T., Kawazato, H., Yasuda, A., Ono, N., Sueda, K., 2004. Cytoarchitecture and intercalated disks of the working myocardium and the conduction system in the mammalian heart. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 280, 940-951.
- Smith, T. K., Bader, D. M., 2006. Characterization of Bves expression during mouse development using newly generated immunoreagents. *Dev Dyn*. 235, 1701-1708.

- Smith, T. K., Hager, H. A., Francis, R., Kilkenny, D. M., Lo, C. W., Bader, D. M., 2008. Bves directly interacts with GEFT, and controls cell shape and movement through regulation of Rac1/Cdc42 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 8298-8303.
- Smolich, J. J., 1995. Ultrastructural and functional features of the developing mammalian heart: a brief overview. *Reprod Fertil Dev.* 7, 451-461.
- Soeller, C., Cannell, M. B., 1999. Examination of the transverse tubular system in living cardiac rat myocytes by 2-photon microscopy and digital image-processing techniques. *Circ Res.* 84, 266-275.
- Somekawa, S., Fukuhara, S., Nakaoka, Y., Fujita, H., Saito, Y., Mochizuki, N., 2005. Enhanced functional gap junction neofunction by protein kinase A-dependent and Epac-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes. *Circ Res.* 97, 655-662.
- Takagishi, Y., Yasui, K., Severs, N. J., Murata, Y., 2000. Species-specific difference in distribution of voltage-gated L-type Ca(2+) channels of cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279, C1963-1969.
- Takeshita, K., Fujimori, T., Kurotaki, Y., Honjo, H., Tsujikawa, H., Yasui, K., Lee, J. K., Kamiya, K., Kitaichi, K., Yamamoto, K., Ito, M., Kondo, T., Iino, S., Inden, Y., Hirai, M., Murohara, T., Kodama, I., Nabeshima, Y., 2004. Sinoatrial node dysfunction and early unexpected death of mice with a defect of klotho gene expression. *Circulation.* 109, 1776-1782.
- Takeuchi, S., Takagishi, Y., Yasui, K., Murata, Y., Toyama, J., Kodama, I., 2000. Voltage-gated K(+)Channel, Kv4.2, localizes predominantly to the transverse-axial tubular system of the rat myocyte. *J Mol Cell Cardiol.* 32, 1361-1369.
- Talley, E. M., Solorzano, G., Lei, Q., Kim, D., Bayliss, D. A., 2001. Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J Neurosci.* 21, 7491-7505.
- Tellez, J. O., Dobrzynski, H., Greener, I. D., Graham, G. M., Laing, E., Honjo, H., Hubbard, S. J., Boyett, M. R., Billeter, R., 2006. Differential expression of ion channel transcripts in atrial muscle and sinoatrial node in rabbit. *Circ Res.* 99, 1384-1393.
- Terrenoire, C., Lauritzen, I., Lesage, F., Romey, G., Lazdunski, M., 2001. A TREK-1-like potassium channel in atrial cells inhibited by beta-adrenergic stimulation and activated by volatile anesthetics. *Circ Res.* 89, 336-342.
- Torlopp, A., Zelluläre Lokalisation und vergleichende Analyse der mRNA- und Proteinexpression von Popdc1 im Huhn. Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Zell- und Molekularbiologie. Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, 2005.
- Torlopp, A., Breher, S. S., Schluter, J., Brand, T., 2006. Comparative analysis of mRNA and protein expression of Popdc1 (Bves) during early development in the chick embryo. *Dev Dyn.* 235, 691-700.
- Toyofuku, T., Yabuki, M., Otsu, K., Kuzuya, T., Hori, M., Tada, M., 1998. Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 273, 12725-12731.
- van Rijen, H. V., van Veen, T. A., van Kempen, M. J., Wilms-Schopman, F. J., Potse, M., Krueger, O., Willecke, K., Opthof, T., Jongsma, H. J., de Bakker, J. M., 2001. Impaired conduction in the bundle branches of mouse hearts lacking the gap junction protein connexin40. *Circulation.* 103, 1591-1598.
- van Veen, T. A., Stein, M., Royer, A., Le Quang, K., Charpentier, F., Colledge, W. H., Huang, C. L., Wilders, R., Grace, A. A., Escande, D., de Bakker, J. M., van Rijen, H. V., 2005. Impaired impulse propagation in Scn5a-knockout mice: combined contribution of excitability, connexin expression, and tissue architecture in relation to aging. *Circulation.* 112, 1927-1935.

- Vasavada, T. K., DiAngelo, J. R., Duncan, M. K., 2004. Developmental expression of Pop1/Bves. *J Histochem Cytochem.* 52, 371-377.
- Wada, A. M., Reese, D. E., Bader, D. M., 2001. Bves: prototype of a new class of cell adhesion molecules expressed during coronary artery development. *Development.* 128, 2085-2093.
- Weber, I. T., Shabb, J. B., Corbin, J. D., 1989. Predicted structures of the cGMP binding domains of the cGMP-dependent protein kinase: a key alanine/threonine difference in evolutionary divergence of cAMP and cGMP binding sites. *Biochemistry.* 28, 6122-6127.
- Weber, I. T., Takio, K., Titani, K., Steitz, T. A., 1982. The cAMP-binding domains of the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase and the catabolite gene activator protein are homologous. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79, 7679-7683.
- Wong, C., Soeller, C., Burton, L., Cannell, M. B., 2002. Changes in transversetubular system architecture in myocytes from diseased human ventricles. *Abstract.* 82:a588.
- Xian Tao, L., Dyachenko, V., Zuzarte, M., Putzke, C., Preisig-Muller, R., Isenberg, G., Daut, J., 2006. The stretch-activated potassium channel TREK-1 in rat cardiac ventricular muscle. *Cardiovasc Res.* 69, 86-97.
- Yoo, S., Dobrzynski, H., Fedorov, V. V., Xu, S. Z., Yamanushi, T. T., Jones, S. A., Yamamoto, M., Nikolski, V. P., Efimov, I. R., Boyett, M. R., 2006. Localization of Na⁺ channel isoforms at the atrioventricular junction and atrioventricular node in the rat. *Circulation.* 114, 1360-1371.
- Zhang, Z., Xu, Y., Song, H., Rodriguez, J., Tuteja, D., Namkung, Y., Shin, H. S., Chiamvimonvat, N., 2002. Functional Roles of Ca(v)1.3 (alpha(1D)) calcium channel in sinoatrial nodes: insight gained using gene-targeted null mutant mice. *Circ Res.* 90, 981-987.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AVN	atrioventricular node/ Atrioventrikuläre (AV-) Knoten
bidest.	doppelt destilliert
bp	base pairs/ Basenpaare
bpm	beats per Minute/ Schläge pro Minute
BSA	Rinderserum Albumin
cAMP	Adenosin-3',5'-zyklisches-Monophosphat
cDNA	copy DNA
cGMP	Guanosin-3',5'-zyklisches-Monophosphat
ch	chick
CIP	calf intestine phosphatase
CNB	cyclic nucleotide binding domain/ zyklische
cNMP	cyclic nucleotide monophosphate/
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpf	days past fertilization/ Tage nach der Befruchtung
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescent substrate for the detection of light
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
EST	expressed sequence tag
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GST	Glutathion-S-Transferase
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure

8. Anhang

HRP	horseradish peroxidase/ Meerrettichperoxidase
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-Thio-Galaktopyranosid
IVC	Vena cava inferior/ untere Hohlvene
kb	Kilobasen
l	Liter
LB	Luria Bertami
M	Molar
6-MB-cAMP	N ⁶ -Monobutyryladenodin-3',5'-zyklisches-Monophosphat
MDP	maximale diastolisches Potential
ml/ μ l	Milli-/Mikroliter
mM	Millimolar
ng/ μ g/ mg	Nano-/ Mikro-/ Milligramm
nm/ μ m	Nano-/Mikrometer
NTP	Nukleosidtriphosphat Nukleotidbindungsdomäne
OD	optische Dichte
p.A.	zur Analyse
PAGE	Polyakrylamidgelelektrophorese
PBC	phosphate binding cassette/ Phosphatbindungskassette
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
RA	rechtes Atrium
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute/ Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-time-PCR
SAGE	serial analysis of gene expression
SAN	sinoatrial node/ Sinusknoten
SDS	Natriumdodecylsulfat
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SVC	Vena cava superior/ obere Hohlvene

8. Anhang

TEMED	Tetramethylethyldiamin
ÜS	Überstand
VRLS	ventrikuläres Reizleitungssystem
VS	ventrikuläres Septum
Vs/vs	versus
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid zyklisches Nukleotid Monophosphat

8.3 Publikationen

Breher, S. S., Mavridou, E., Brenneis, C., Froese, A., Arnold, H. H., Brand, T.: Popeye domain containing gene 2 (Popdc2) is a myocyte-specific differentiation marker during chick heart development. *Dev Dyn.* 229, 695-702. (2004)

Torlopp, A., Breher, S. S., Schlueter, J., Brand, T.: Comparative analysis of mRNA and protein expression of Popdc1 (Bves) during early development in the chick embryo. *Dev Dyn.* 235, 691-700. (2006)

Froese, A.*, Breher, S. S. *, Schlueter, J. *, Waldeyer, C., Kirchmaier, B., Kuhtz, J., Torlopp, A., Vauti, F., Arnold, H. H., Müller, T., Winkler, C., Schwerte, T., Kirchhof, P., Fabritz, L., Brand, T.: Popdc2 is a novel cAMP-binding protein with a stress-related role in cardiac pacemaking (eingereicht, * die Autoren sind gleichwertig an der Arbeit beteiligt)

Stephanie S. Breher, Christoph Waldeyer, Roland Schindler, Sonja Katharina Liebig, Sandra Laakmann, Bettina Kirchmaier, Erhard Wischmeyer, Sebastian K. Maier, Stefan Gattenlöhner, Joachim Neumann, Paulus Kirchhof, Larissa Fabritz, Thomas Brand: Popdc1 null mutants display age-dependent sinus node dysfunction (in Vorbereitung)

8.4 Präsentationen/Poster

Stephanie Breher, Thomas Brand: Biochemical characterization of POP1 protein and cloning of *Pop2* cDNAs from the chick embryo. (Poster) Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie und der Gesellschaft für Entwicklungsbiologie, 26.-29. März 2003

Stephanie Breher, Juliane Kuhtz, Christoph Waldeyer, Sonja, Katharina Liebig, Jan Schlüter, Larissa Fabritz, Paulus Kirchof and Thomas Brand: Structural and functional analysis of the Popeye domain containing 1 (Popdc1) gene in mice. (Vortrag) HeartRepair 2nd, Annual General Meeting, 17-19 April, 2008 Madrid

8.5 Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt habe.

Ich habe außer den mit dem Zulassungsbescheid urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Die Kooperationspartner sind alle benannt.

Braunschweig, im März 2009

Stephanie Breher

8.6 Danksagung

Zuerst möchte ich Prof. Dr. Thomas Brand für die Bereitstellung dieses herausfordernden und interessanten Themas meiner Doktorarbeit sowie für die Unterstützung während meiner Doktorandenzeit danken.

Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Thomas Müller für die Hilfe beim 3D-Modelling der *Popeye*-Domäne und für die Bereitschaft, das Koreferat dieser Arbeit zu übernehmen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Larissa Fabritz für die elektrophysiologischen Charakterisierung der *Popdc1*-Mäuse und bei Herrn Erhard Wischmeyer für die Analyse der *Popdc1*-TREK-1 Interaktion in Froschoozyten

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe möchte ich mich für deren Hilfsbereitschaft bedanken. Ein besonderer Dank geht an Reinhild Fischer und Elisabeth Meyer-Natus, die mir tatkräftig unter die Arme gegriffen haben, sowie Anneliese Striewe-Konz und Fabienne Lüttge. Weiterhin möchte ich Dr. Alexander Froese und Dr. Jan Schlüter für ihre Unterstützung bei wissenschaftlichen und technischen Fragen danken. Sascha möchte ich noch einen zusätzlichen Dank aussprechen, für die netten Grillabende mit seiner Familie in Braunschweig wie auch in Würzburg, die oft einen netten Abschluss des Tages bildeten. Roland Schindler möchte ich v.a. für seine kritischen Bemerkungen danken, die immer sehr hilfreich waren, und für die schönen Gespräche, die wir geführt haben. Juliane Kutz und Sabrina Angermeyer möchte ich für die tolle Zusammenarbeit im *Popdc1*-Projekt bedanken. Bettina Kirchmaier, Franziska Günthner, Sonja Kreissl, Patrick Meister und Angela Torlopp möchte ich einen Dank für die nette Atmosphäre im Labor, die kleinen Kaffeerunden im Schreibraum und die netten Unternehmungen auch außerhalb der Arbeit aussprechen.

Uli Borst möchte ich für ihre Unterstützung bei allen verwaltungstechnischen Fragen, für die netten Gespräche und für die vielen anderen „Kleinigkeiten“ danken.

Bei Dr. Tim Krüger, PD Dr. Manfred Alsheimer und PD Dr. Robert Hock möchte ich mich bedanken, dass sie mir bei Fragen bezüglich des CLSM sowie bei Dr. Norbert Wilken für Fragen bezüglich des PCs geholfen haben.

Meinen Freunden und dabei speziell meiner besten Freundin Michi möchte ich dafür danken, dass sie immer ein Ohr für mich hatten, mich aufmunterten und mir Mut zu sprachen.

In besonderer Weise möchte ich meiner Mutter, meiner Oma und meinem Freund Daniel danken, die mich in meiner Arbeit immer unterstützt und zu mir gehalten haben.