

Bedeutung des Schrittmacherkanals HCN4 im embryonalen Herzen der Maus

Juliane Stieber

Institut für Pharmakologie und Toxikologie, TU München

► Hyperpolarization-activated, Cyclic Nucleotide-gated (HCN)-Kanäle sind eine Ionenkanalfamilie mit 4 bekannten Subtypen, die in einer Vielzahl von Geweben an der Regulation des Membranpotenzials beteiligt sind (1–3). Der Ionenstrom dieser Kanäle wird als Schrittmacherstrom I_h („hyperpolarization“) bzw. I_f („funny“) bezeichnet. In den Zellen des kardialen Reizleitungssystems, die regelmäßig Aktionspotenziale generieren, führt eine Hyperpolarisation der Zellmembran am Ende eines Aktionspotenzials zum Kationeneinstrom durch HCN-Kanäle. Dadurch wird das Membranpotenzial wieder angehoben, bis das Schwellenpotenzial für die Auslösung des nächsten Aktionspotenzials erreicht ist. Speziell im Sinusknoten, dem eigentlichen Schrittmacher des Herzens, wurde eine starke Expression

des HCN4 gefunden (4, 5) was darauf schließen lässt, dass dieser HCN-Subtyp für die Generierung eines regelmäßigen Herzschlages wichtig ist. Darüber hinaus wird HCN4 durch cAMP moduliert (6). Eine β -adrenerge Stimulierung führt deswegen über eine verstärkte HCN4-Aktivierung zu einem beschleunigten Herzschlag.

Um zu prüfen, welche Funktionen der postulierte „Schrittmacherkanal“ HCN4 im Herzen hat, wurden HCN4-defiziente Mäuse mittels des Cre-LoxP-Systems hergestellt (7). Es zeigte sich, dass sowohl globale als auch herzspezifische HCN4-Knockout Mäuse bereits während der Embryonalentwicklung sterben. Bis etwa zum Entwicklungstag 9.5–10.5 entwickeln sich Wildtyp (WT) und Knockout (KO)-Embryonen gleich, wie in *Abb. 1A* zu sehen ist. HCN4-KO-Embry-

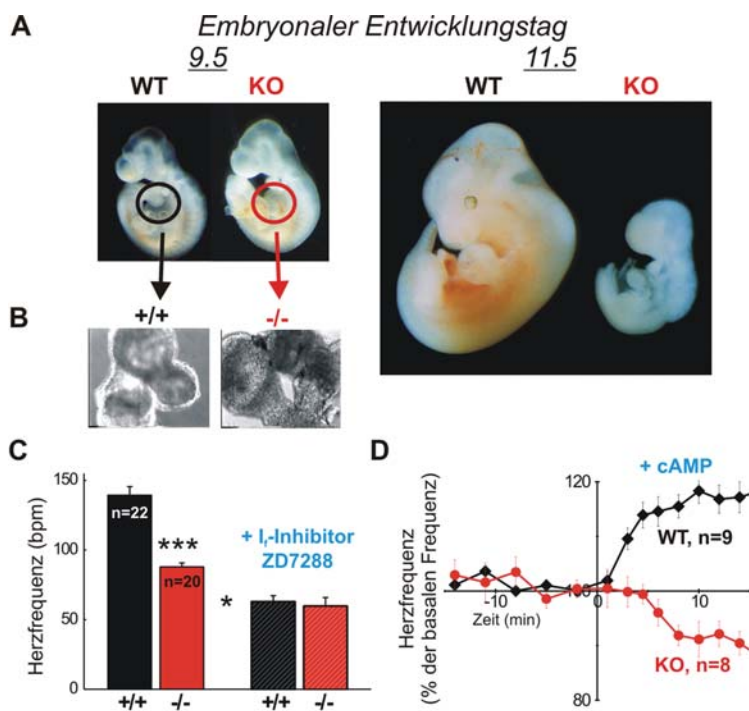


Abb. 1: Analyse von isolierten Herzen aus Wildtyp und HCN4-KO-Embryonen. (A) Vergleich von Wildtyp (WT) und HCN4-Knockout (KO) Embryonen am Entwicklungstag 9.5 pc und 11.5 pc. (B) Explanatorische embryonale WT und KO-Heerden, Entwicklungstag 9.5 (aus den eingekreisten Arealen im entsprechenden Bild in (A)). (C) Schlagfrequenz von WT (schwarz) und KO (rot) Herzen bei 37°C, 24 Stunden nach Isolierung, vor und nach Zugabe des I_f -Inhibitors ZD7288; *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$. (D) Zeitabhängige Änderung der Schlagfrequenz isolierter WT- und KO-Heerden nach Zugabe von 200 μ M 8-Br-cAMP zum Zeitpunkt 0. Basale Frequenz vor Zugabe von cAMP = 100 %.



Deutsche Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT)

Präsidentin:

Prof. Dr. Heidi Foth
Martin-Luther-Universität
Institut für Umwelttoxikologie
Franzosenweg 1a
D-06097 Halle
Tel.: 0345-557-1630
Fax: 0345-557-1871
heidi.foth@medizin.uni-halle.de

Geschäftsführer:

Prof. Dr. Albrecht Wendel
Lehrstuhl Biochemische Pharmakologie
Fach M667
Universitätsstraße 10
D-78457 Konstanz
Tel.: 07531-88-4522
Fax: 07531-88-3099
wendel.dgpt@uni-konstanz.de

Schatzmeisterin:

Prof. Dr. Norma Selve
Geschäftsführer Arzneimittelentwicklung
IBFB Pharma GmbH
Deutscher Platz 5d
D-04103 Leipzig
Tel.: 0175-4141 119
selve@dgpt-online.de

Vorsitzender der Gesellschaft für Experimentelle Pharmakologie:

Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Westfälischen Wilhelms-Universität
Domagkstr. 12
D-48149 Münster
Tel.: 0251-83555-10
Fax: 0251-83555-01
schmitw@uni-muenster.de

Vorsitzender der Gesellschaft für Klinische Pharmakologie:

Prof. Dr. Martin Paul
Charité Universitätsklinikum Berlin
Campus Benjamin Franklin
Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Garystr. 5
D-14195 Berlin
Tel.: 030-8445-1701
Fax: 030-8445-1761
martin.paul@charite.de

Vorsitzende der Gesellschaft für Toxikologie:

Prof. Dr. Heidi Foth
Martin-Luther-Universität
Institut für Umwelttoxikologie
Franzosenweg 1a
D-06097 Halle
Tel.: 0345-557-1630
Fax: 0345-557-1871
heidi.foth@medizin.uni-halle.de

DGPT-Geschäftsstelle:

Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie
Achenbachstraße 43
D-40237 Düsseldorf
Tel.: 0211-600 692-77
Fax: 0211-600 692-78
mitglieder@dgpt-online.de

DGPT-Homepage:

<http://www.dgpt-online.de>

DGPT-Bankverbindung:

Mitgliedsbeiträge (als Kontoinhaber bitte DGPT eintragen!):
Commerzbank AG Frankfurt
Kto.-Nr. 25 74 044 00
BLZ: 500 400 00
Bitte nicht für die Zahlung von Tagungsgebühren verwenden!

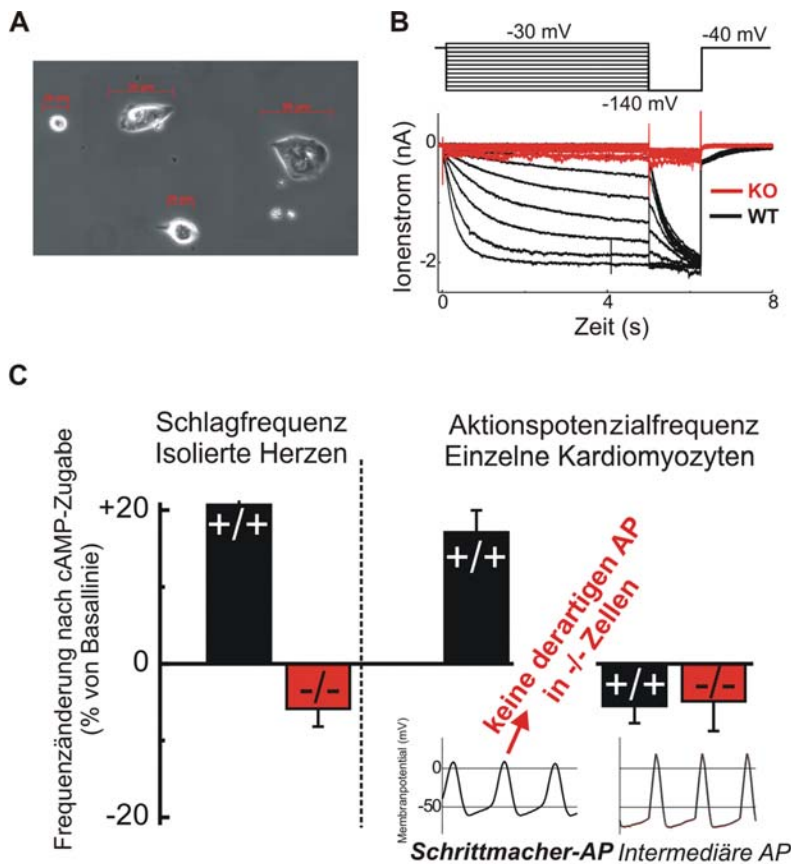


Abb. 2: Analyse von isolierten embryonalen Kardiomyozyten aus Wildtyp und HCN4-KO-Hezen. (A) Isolierte Kardiomyozyten aus einem WT-Hez. Die dargestellten Zelltypen (morphologisch) erhält man sowohl aus WT als auch aus KO-Hezen. (B) Ionenstrom (I_f), gemessen an kleinen Kardiomyozyten, die mittels der Patch-Clamp-Technik auf hyperpolarisierte Membranpotenziale zwischen -140 und -30 mV geklemmt wurden (Protokoll über den Stromspuren). Nur WT-Zellen (schwarze Spur) hatten große Kationeneintröme. Morphologisch gleich aussehende Zellen aus KO-Hezen hatten nur einen sehr geringen I_f (rote Spur). (C) Herzfrequenzänderung und Aktionspotentialänderung bei WT und KO nach Zugabe von 8-Br-cAMP. KO-Kardiomyozyten mit typischen Schrittmacher-APs wurden nicht gefunden.

onen wachsen in den folgenden Tagen jedoch nicht weiter. Die Herzen der KO-Embryonen haben sich bis zum Tag 9.5 anatomisch normal entwickelt (Abb. 1B). Deshalb konnten wir die Herzfunktion bis zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung untersuchen.

Am Tag 9.5 explantierte HCN4-KO-Hezen kontrahierten nur etwa halb so schnell wie WT-Hezen (mittlere Herzfrequenzen 87 bpm bzw. 146 bpm, Abb. 1C). Die Zugabe von I_f -Inhibitoren, wie z.B. ZD7288, senkten die Herzfrequenzen von beiden Genotypen durch die Blockierung sämtlicher HCN-Subtypen auf etwa denselben basalen Wert von 60 bpm. Dies lässt darauf schließen, dass HCN4 ein wichtiger Ionenkanal für die Generierung eines schnellen Herzschlages ist. Eine basale Herzfrequenz kann jedoch auch ohne bzw. mit blockierten HCN-Kanälen aufrecht erhalten werden. Zugabe von cAMP zu den isolierten Herzen (Abb. 1D) bewirkte nur bei WT-Hezen eine Beschleunigung des Herzschlages, die KO-Hezen zeigten keine Steigerung. HCN4 ist demnach tatsächlich für die Ver-

mittlung einer β -adrenergen Stimulierung am Herzen notwendig.

Im weiteren versuchten wir die Effekte, die am ganzen Herzen zu sehen waren, auf Zellebene zu erklären. Ähnlich wie beim adulten Herzen fanden wir bereits beim frühen embryonalen Mausherz (Tag 9.5) einen Bereich, der HCN4 hoch exprimiert. In diesem Bereich entwickeln sich vermutlich Schrittmacherzellen, charakterisiert durch die Schrittmacher-Aktionspotenziale (AP). Bei der Isolierung von Kardiomyozyten aus embryonalen Herzen (Tag 9.5) erhielten wir verschiedene Zelltypen; ein bestimmter, kleiner Zelltyp (\varnothing 10–20 μ m, Abb. 2A), der ca. 5–10 % der Gesamtpopulation ausmachte, zeigte bei elektrophysiologischen Messungen einen verhältnismässig großen I_f (Abb. 2B) und typische Schrittmacher-AP (Abb. 2C). Dieser Zelltyp war in KO-Kardiomyozyten-Präparationen nicht zu finden. Morphologisch gab es zwar gleich aussehende Zellen, diese hatten jedoch nur einen sehr kleinen I_f , der nicht von HCN4-Kanälen generiert wurde, sowie intermediäre bzw.

atriale APs, die es in gleicher Häufigkeit auch bei WT-Kardiomyozyten gab. Interessanterweise gab es eine gute Korrelation zwischen den Herzfrequenzänderungen (ganze Herzen, Abb. 2C, links) und den AP-Frequenzänderungen (Kardiomyozyten, Abb. 2C, rechts) nach cAMP Zugabe. Ebenso wie die WT-Hezen, ließen sich nur Kardiomyozyten mit großem I_f und Schrittmacher-AP positiv stimulieren, und zwar jeweils um +20 %. Die den „echten“ Schrittmacherzellen morphologisch ähnlichen, intermediären Zellen ließen sich weder im WT noch im KO positiv stimulieren. Genau dieses Bild boten auch die KO-Hezen.

Aus diesen Ergebnissen schließen wir, dass HCN4 essenziell für die Ausbildung und Funktion von Schrittmacherzellen ist. Fehlt HCN4, kann das embryonale Herz nur mit einer sehr niedrigen Frequenz, die sich nicht hochregulieren lässt, schlagen. Bis zum Entwicklungstag 9.5 ist diese basale Herzfrequenz ausreichend zum Überleben, eine weitere Entwicklung, die höhere Frequenzen mit folgender besserer Durchblutung des Organismus verlangt, ist jedoch nicht möglich.

Literatur

- [1] Robinson, R.B. & Siegelbaum, S.A. (2003): Hyperpolarization-activated cation currents: From molecules to physiological function. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 453–80.
- [2] Ludwig, A., Budde, T., Stieber, J., Moosmang, S., Wahl, C., Holthoff, K., Langebartels, A., Wotjak, C., Munsch, T., Zong, X., et al. (2003): Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *EMBO J.* 22: 216–224.
- [3] Stieber, J., Hofmann, F., Ludwig, A. (2004): Pacemaker channel and sinus node arrhythmia. *Trends Cardiovasc. Med.* 14:1–6.
- [4] Ishii, T.M., Takano, M., Xie, L.-H., Noma, A., Ohmori, H. (1999): Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit sinoatrial node. *J. Biol. Chem.* 274 (18), 12835–39.
- [6] Stieber, J., Thomer, A., Much, B., Schneider, A., Biel, M., Hofmann, F. (2003): Molecular Basis for the Different Activation Kinetics of the Pacemaker Channels HCN2 and HCN4. *J. Biol. Chem.* 278: 33672–33680.
- [7] Stieber, J., Herrmann, S., Feil, S., Feil, R., Biel, M., Hofmann, F., Ludwig, A. (2003): The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *PNAS* 100 (25): 15235–15240.

Korrespondenzadresse:

Dr. med. Juliane Stieber
 Institut f. Pharmakologie und Toxikologie
 Technische Universität München
 Biedersteiner Str. 29
 D-80802 München
 Tel.: 089-4140-3286
 Fax: 089-4140-3261
 stieber@ipt.med.tu-muenchen.de