

Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. F. Hofmann)

**Identifizierung, funktionelle Charakterisierung und
Gewebesverteilung
des murinen
hyperpolarisationsaktivierten zyklonukleotidgesteuerten
Kationenkanals mHCN1**

Michael Andreas Jeglitsch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann
2. Priv.-Doz. Dr. A. L. Ludwig

Die Dissertation wurde am 08. 10. 2002 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.12.2002
angenommen.

Mit eingearbeiteten Änderungen genehmigt.
München 12.02.2003

Für meine Eltern

Inhalt

<u>1. Einleitung</u>	7
1.1. Biophysikalische Eigenschaften von I_h	7
1.1.1. Aktivierung durch Hyperpolarisation	7
1.1.2. Modulation durch zyklische Nukleotide	9
1.1.3. Selektivität für Natrium und Kalium	9
1.2. I_h in verschiedenen Geweben	10
1.2.1. I_h im Erregungsbildungs- und -leitungssystem des Herzens	10
1.2.2. I_h in der Arbeitsmuskulatur des Herzens	12
1.2.3. I_h in neuronalem Gewebe	12
1.2.4. I_h in sonstigen Geweben	13
1.3. Ziel dieser Arbeit	14
<u>2. Material und Methoden</u>	15
2.1. Arbeit mit Bakterien	15
2.1.1. Verwendeter Stamm	15
2.1.2. Nährmedien und Antibiotika	15
2.1.3. Kultivierung	16
2.2. Verwendete Plasmide	16
2.3. Transformation von Bakterien	17
2.3.1. Präparation von kompetenten Bakterienzellen	17
2.3.2. Transformation von <i>E. coli</i>	18
2.4. Reinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren	18
2.4.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	18
2.4.2. Präzipitation	19
2.4.3. Phenol/Chloroform-Extraktion	19
2.5. Isolierung von Plasmid-DNA	19
2.5.1. Kochschnelltest nach Holmes und Quigly	19
2.5.2. Alkalische Lyse mit Säulenchromatographie	20
2.6. Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten	20
2.6.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	21
2.6.2. Agarose-Gelelektrophorese	21
2.6.3. Elektroelution	22
2.7. Enzymatische Modifikation von DNA	22
2.7.1. Restriktionsenzyme	22
2.7.2. Alkalische Phosphatase	23
2.7.3. Auffüllreaktion	23
2.7.4. T4-DNA-Ligase	23
2.8. Polymerasekettenreaktion (PCR)	24
2.9. Sequenzierung von DNA	25
2.9.1. Sequenzreaktion mit radioaktiv markierten Nukleotiden	25
2.9.2. Automatische Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Primern	27
2.10. Herstellung ^{32}P -markierter Sonden	28
2.11. Northern blot-Analyse	28

2.12.	<i>In situ</i> -Hybridisierung	30
2.12.1.	Verwendete Lösungen	30
2.12.2.	Herstellung der RNA-Sonden	31
2.12.3.	Anfertigung von Gewebeschnitten	32
2.12.4.	Standardprotokoll der <i>In situ</i> -Hybridisierung	33
2.12.5.	Filmemulsion	34
2.12.6.	Histologische Färbungen	35
2.12.7.	Mikroskopie und Photographie	35
2.13.	Arbeit mit eukaryoten Zellen	35
2.13.1.	Eukaryote Zelllinie	36
2.13.2.	Nährmedium	36
2.13.3.	Kultur	36
2.13.4.	Transfektion von eukaryoten Zellen nach der Calciumphosphat-Methode	37
2.14.	Elektrophysiologische Untersuchungen	38
3.	<u>Ergebnisse</u>	39
3.1.	Klonierung der cDNA von mHCN1 aus dem Gehirn der Maus	39
3.2.	Elektrophysiologische Charakterisierung von mHCN1	43
3.2.1.	Aktivierung durch Hyperpolarisation	43
3.2.2.	Modulation durch zyklische Nukleotide	44
3.2.3.	Ionenleitfähigkeit	45
3.3.	Untersuchung der Gewebsexpression von mHCN1-3	45
3.3.1.	Northern Blot	45
3.3.2.	<i>In situ</i> -Hybridisierung	46
4.	<u>Diskussion</u>	52
4.1.	Struktur von mHCN1	52
4.2.	Ionenselektivität	53
4.3.	Modulation durch zyklische Nukleotide	54
4.4.	Aktivierung durch Hyperpolarisation	55
4.5.	<i>In situ</i> -Hybridisierung	56
4.5.1.	<i>In situ</i> -Hybridisierung im Herzen	56
4.5.2.	<i>In situ</i> -Hybridisierung im Gehirn	56
5.	<u>Zusammenfassung</u>	61
6.	<u>Anhang</u>	63
6.1.	Nomenklatur von HCN-Kanälen	63
6.2.	Verwendete Primer	64
6.3.	Verwendete Abkürzungen	65
7.	<u>Literaturverzeichnis</u>	66
	Danksagung	73
	Lebenslauf	74

1. Einleitung

Viele rhythmische Körperfunktionen wie der Herzschlag, der Schlaf-Wach-Rhythmus und die Ausschüttung von Hormonen erfordern das Vorhandensein biologischer Schrittmacher. Vergleichbar mit einem Metronom geben diese Schrittmacher einerseits einen möglichst konstanten Takt vor, müssen andererseits aber in der Lage sein, die Taktfrequenz als Antwort auf veränderte innere oder äußere Anforderungen zu variieren. Wie bewältigt die Natur diese Aufgabe?

Die schnellsten Rhythmen (mit Periodendauern von Millisekunden bis Sekunden) im menschlichen Körper wie oszillierende Neurone oder der Herzschlag werden elektrisch, d.h. durch den Fluß von Ionen über Membranen gesteuert. Das komplexe Zusammenspiel vieler Ionenkanäle regelt dabei den zeitlichen Ablauf der Ströme und Potentiale.

Vor etwa 20 Jahren wurde zunächst in verschiedenen Neuronen und kurz darauf im Herzen ein Strom identifiziert, der bei der Erzeugung rhythmischer Erregungen eine Schlüsselrolle zu spielen scheint (Fain et al. 1978, Brown et al. 1979, Yanagihara und Irisawa 1980, DiFrancesco 1981, Atwell und Wilson 1980, Bader und Bertrand 1984, Barnes and Hille 1989, Halliwell and Adams 1982). Wegen seiner ungewöhnlichen Eigenschaften wurde er im Herzen I_f (f für „funny“), in Neuronen I_q (q für „queer“) genannt. Heute wird I_f/I_q meist etwas nüchterner als I_h (h für „hyperpolarization-activated“) bezeichnet. Trotz eingehender elektrophysiologischer Charakterisierung von I_h war bis vor kurzem die molekulare Struktur der zugrundeliegenden Ionenkanäle unbekannt.

Im folgenden soll kurz erläutert werden, welche Eigenschaften von I_h seine Erstentdecker veranlaßten, ihn als den „komischen“ oder „seltsamen“ Strom zu bezeichnen.

1.1. Biophysikalische Eigenschaften von I_h

I_h zeigt in allen Geweben drei Charakteristika: *Aktivierung durch Hyperpolarisation, Modulation durch zyklische Nukleotide und Selektivität für Natrium und Kalium.*

1.1.1. Aktivierung durch Hyperpolarisation

Im Gegensatz zu anderen Strömen wird I_h nicht durch Depolarisation, sondern durch Hyperpolarisation auf Potentiale negativ zu -50 bis -70 mV ausgelöst. Je stärker die Hyperpolarisation, desto stärker ist der (kationische) Einwärtsstrom, bis er bei Potentialen im

Bereich von -110 bis -130 mV seine größte Amplitude erreicht. Im Bereich von -75 bis -85 mV ist die Stromstärke etwa halbmaximal ($V_{1/2}$).

I_h wird in den meisten Geweben relativ langsam aktiviert, wobei stärkere Hyperpolarisation auch zu einer Zunahme der Aktivierungsgeschwindigkeit führt. Nach anfänglicher Verzögerung nähert sich der Strom langsam dem Maximalwert an, so daß die Aktivierung insgesamt einen sigmoidalen Zeitverlauf zeigt (Abb. 1.1.a). Der zweite Teil der Kurve läßt sich gut mit einer (in Ausnahmefällen mit zwei) Exponentialfunktion (-en) annähern, wobei die Zeitkonstante je nach Gewebe zwischen 60 ms (Hippocampus, Maccaferri et al. 1993) und 2500 ms (Sinusknoten, Maruoka et al 1994, Liu Z. et al. 1996) liegt. (Angaben beziehen sich auf das jeweilige $V_{1/2}$.) I_h weist keine Inaktivierung auf.

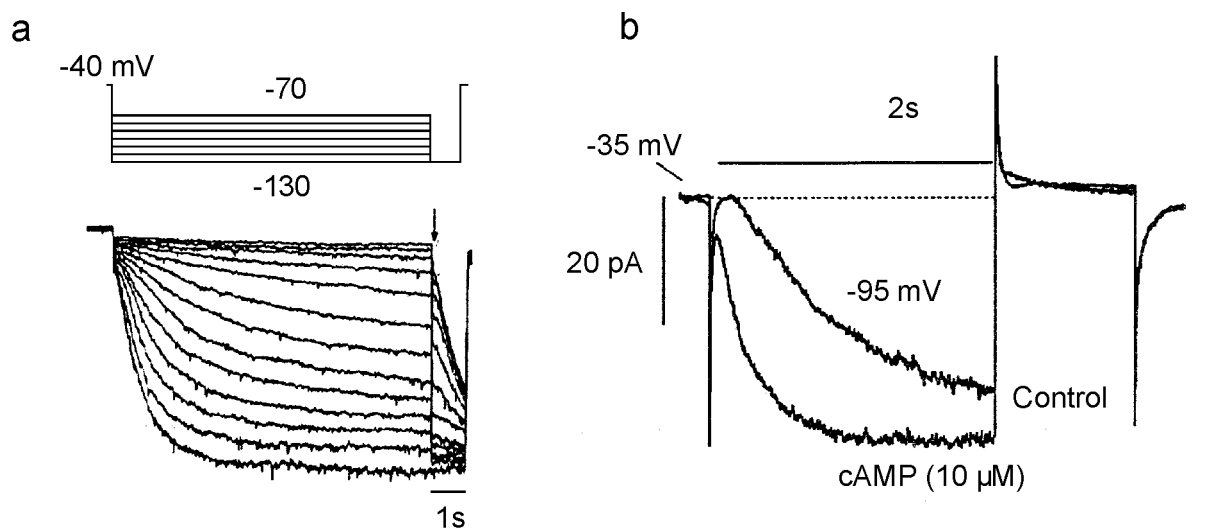


Abb. 1.1.

Elektrophysiologische Eigenschaften des nativen I_h .

a, oben, Strom-Spannungsprotokoll zur Messung von I_h in Kardiomyozyten. Ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV wurden 8 s lange Pulse im Bereich von -70 bis -130 mV angelegt. Es folgte ein 1 s langer Spannungssprung auf -130 mV (aus Baker et al. 1997), unten, resultierende Stromspuren.

b, Modulation des Stroms durch Zugabe von $10 \mu\text{M}$ cAMP (Haltepotential -35 mV, Testpotential -95 mV; Messung am inside-out Patch aus einer Sinusknotenzelle; aus DiFrancesco und Tortora 1991).

c, Verschiebung der Aktivierungskurve nach Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Isoprenalin (ISO) (Messung im Ganzzellmodus; aus Hoppe et al. 1998).

1.1.2. Modulation durch zyklische Nukleotide

Abbildung 1.1.b zeigt wie durch die Anwesenheit von cAMP die Stromstärke und die Aktivierungsgeschwindigkeit von I_h zunehmen. cAMP verschiebt also die sigmoidale Aktivierungskurve (Stromstärke bzw. Leitfähigkeit in Abhängigkeit vom Potential) von I_h zu positiveren Potentialen hin (s. Abb 1.1.c). Die maximale Leitfähigkeit bei voller Aktivierung durch Hyperpolarisation bleibt jedoch konstant (DiFrancesco und Mangoni 1994). Außer durch cAMP wird I_h auch noch durch andere zyklische Nukleotide moduliert. Allerdings erreichen cGMP und cCMP erst bei ca. 50-fach höherer Konzentration den Effekt von cAMP, so daß vermutet werden kann, daß cAMP der physiologische Modulator von I_h ist (K_a -Werte für halbmaximale Verschiebung der Aktivierungskurve: cAMP: $0,2\mu\text{M}$, cGMP: $8\mu\text{M}$, cCMP: $12\mu\text{M}$; (DiFrancesco und Tortora 1991)).

Es wurde gezeigt, daß die Modulation von I_h nicht auf einer Phosphorylierung durch eine cAMP-abhängige Proteinkinase beruht, sondern durch direkte Bindung von cAMP an den Kanal erfolgt (DiFrancesco und Tortora 1991), genauso wie es z.B. bei CNG-Kanälen der Fall ist (Zagotta und Siegelbaum 1996, Biel et al. 1999).

cAMP vermittelt als sogenannter second messenger die intrazelluläre Antwort auf viele verschiedene Hormone und Neurotransmitter. So steigt der intrazelluläre cAMP-Spiegel u.a. nach Stimulation von β -Adrenozeptoren, serotonergen und Histamin H_2 -Rezeptoren an. Stimulation muskarinischer Azetylcholinrezeptoren, Adenosin A_1 - und μ -Opiod-Rezeptoren führt dagegen zu einer Absenkung des cAMP-Spiegels. Damit kann I_h durch eine Vielzahl extrazellulärer Faktoren moduliert werden (s. Abb. 1.2.).

Es ist umstritten, ob I_h durch intrazelluläres Ca^{++} moduliert wird, da hierzu widersprüchliche Ergebnisse vorliegen (Hagiwara und Irisawa 1989, Zaza et al. 1991, Pape 1996, Budde et al. 1997, Schwindt et al. 1992). Neue Erkenntnisse weisen darauf hin, daß Ca^{++} bestimmte Adenylatzyklen (Cooper et al. 1994) stimuliert, die wiederum über einen erhöhten cAMP-Spiegel I_h verstärken (Lüthi und McCormick 1998 (a)).

1.1.3. Selektivität für Natrium und Kalium

Ein weiteres Charakteristikum von I_h ist die starke Selektivität für Na^+ und K^+ . Andere einwertige Kationen wie Li^+ oder Rb^+ werden von dem Kanal ausgesprochen schlecht geleitet (Ho et al. 1994). Diese Eigenschaft ist einzigartig, da kein anderer bekannter Kanal zwischen

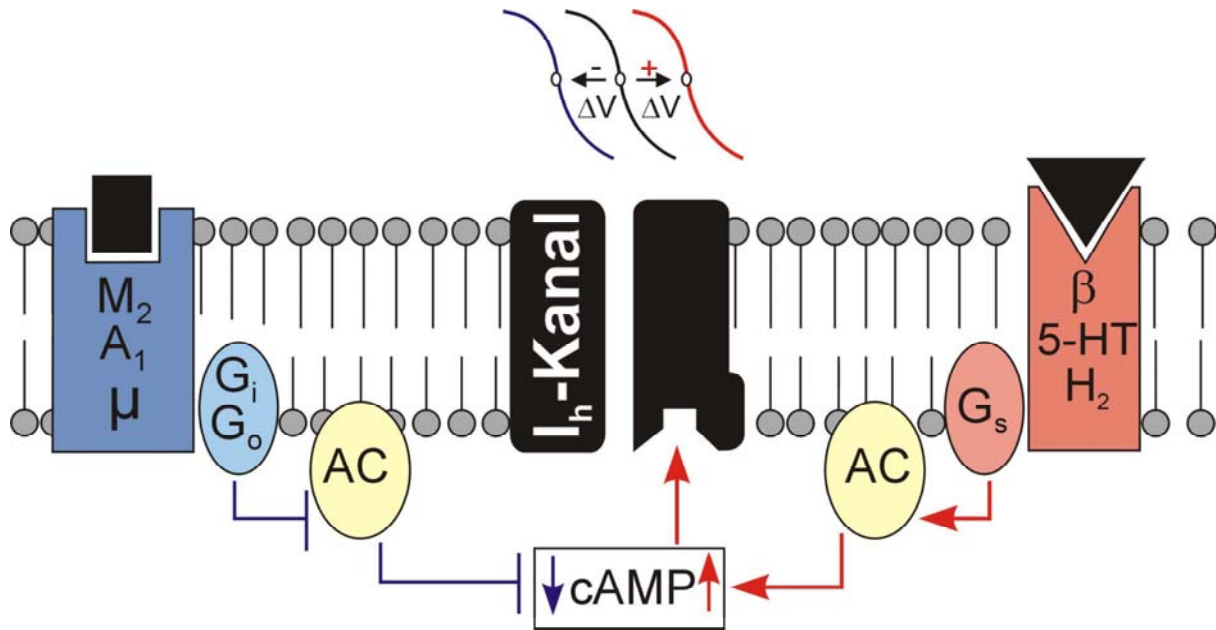


Abb. 1.2.

Modulation von I_h durch cAMP. Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren führt zu einer Aktivierung (β -Adrenozeptor, Serotonin- (5HT), Histamin- (H_2) Rezeptor) bzw. Hemmung (Muskarinischer- (M), Adenosin- (A_1), μ -Opioid-Rezeptor) der Adenylatzyklase (AC). Die dadurch verursachte Änderung des cAMP-Spiegels bewirkt eine Verschiebung der I_h -Aktivierungskurve zu positiveren bzw. negativeren Potentialen.

(G_s , $G_{o,i}$: stimulatorisches bzw. inhibitorisches G-Protein; \rightarrow : Aktivierung; \dashv : Hemmung)

Na^+ und Li^+ unterscheiden kann (Ho et al. 1994, Pape 1996). Das Verhältnis der Permeabilitäten für Natrium und Kalium P_{Na}/P_K bewegt sich zwischen 0,2 und 0,4 (Edman et al. 1987, Hestrin 1987, Maricq und Korenbrot 1990, Solomon und Nerbonne 1993 (a)), d.h. der Kanal ist etwa viermal selektiver für K^+ als für Na^+ . Unter physiologischen Bedingungen, d.h. bei Ruhepotentialen nahe dem K^+ Gleichgewichtspotential, wird I_h aufgrund der Ionenverhältnisse jedoch hauptsächlich von Na^+ getragen.

Ebenfalls auffällig ist die geringe Einzelkanalleitfähigkeit von rund 1 pS (DiFrancesco 1986).

1.2. I_h in verschiedenen Geweben

1.2.1. I_h im Erregungsbildungs- und -leitungssystem des Herzens

Das Organ mit der anschaulichsten Demonstration rhythmischer Aktivität ist das Herz. Die autonome Rhythmik des Herzens beruht auf der spontanen Erregungsbildung in verschiedenen sogenannten Schrittmacherzentren im Reizleitungssystem, von denen der Sinusknoten das wichtigste ist. Im Gegensatz zu normalen Herzmuskelzellen haben die Schrittmacherzellen im Sinusknoten kein stabiles Ruhepotential.

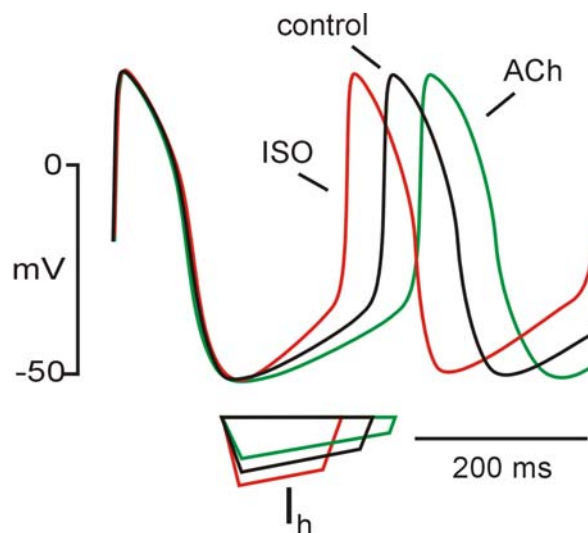
Am Ende eines Aktionspotentials repolarisiert die Sinusknotenzelle durch einen „delayed rectifier“ vermittelten K^+ -Ausstrom auf -75 mV. Dadurch wird I_h aktiviert, was über einen Na^+ -Einstrom zu einer langsamen Depolarisation führt, bis bei etwa -50 mV die Schwelle erreicht ist, bei der der T- und dann der L-Typ Kalzium-Kanal öffnen und so das nächste Aktionspotential auslösen. (Brown et al. 1977, Yanagihara and Irisawa 1980, DiFrancesco 1981) (s. Abb. 1.3.).

I_h spielt auch eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Herzfrequenz. Werden β -Rezeptoren auf der Außenseite der Sinusknotenzelle durch Adrenalin stimuliert, wird über ein G-Protein im Zellinneren die Adenylatzyklase aktiviert. Dadurch steigt die intrazelluläre cAMP-Konzentration an. cAMP bindet an den I_h -Kanal, wodurch I_h zunimmt. Die diastolische Depolarisation verläuft steiler und die Schwelle wird früher erreicht (Brown et al. 1979).

Bei der parasympathikusvermittelten Senkung der Herzfrequenz läuft obiger Mechanismus in entgegengesetzter Richtung ab. Der muskarinische Azetylcholinrezeptor hemmt über ein G-Protein die Adenylatzyklase wodurch der cAMP-Spiegel sinkt. Das hemmt I_h , die diastolische Depolarisation verläuft flacher, die Schwelle wird später erreicht und die Herzfrequenz fällt ab (DiFrancesco et al. 1989, 1995) (s. Abb. 1.2., 1.3.)

Abb.1.3.

I_h in Sinusknotenzellen. Aktionspotentiale einer Sinusknotenzelle unter Kontrollbedingungen (schwarz) sowie unter β -adrenerger Stimulation (Isoprenalin "ISO" rot) und Parasympathikuseinfluß (Azetylcholin "ACh" grün). Unter den Aktionspotentialen ist I_h qualitativ dargestellt (modifiziert nach DiFrancesco 1993 und Clapham 1998).



An der Regulation der Herzfrequenz sind allerdings noch andere Ionenkanäle beteiligt; insbesondere der GIRK K^+ -Kanal (I_{KACh}) (Wickman et al, 1998) aber auch andere K^+ - und Ca^{++} -Kanäle (Irisawa et al. 1993).

1.2.2. I_h in der Arbeitsmuskulatur des Herzens

Interessanterweise wurde I_h auch in der Arbeitsmuskulatur des Herzens gefunden (Yu et al. 1993, Hoppe et al. 1998, Thuringer et al. 1992, Pociatti et al. 1997). Allerdings ist die Aktivierungsschwelle dort so stark zu negativen Potentialen verschoben, daß der Kanal physiologischerweise nie aktiviert würde (Yu et al. 1993). Das überrascht einerseits nicht, da die Arbeitsmuskulatur zu keiner spontanen Erregungsbildung fähig ist, wirft aber andererseits natürlich die Frage auf, welche Funktion der Kanal dort haben mag.

Es wurde vermutet, daß I_h an der Entstehung ventrikulärer Arrhythmien in geschädigten Herzen beteiligt sein könnte (Cerbai et al. 1996, Hoppe et al. 1998). Diese Hypothese wird durch Experimente gestützt, bei denen eine Zunahme der I_h -Stromdichte in hypertrophierten bzw. ischämischen Herzen registriert wurde (Cerbai et al. 1996, Hoppe et al. 1998). Andere Experimente zeigen sowohl eine positivere Aktivierungsschwelle, als auch eine höhere I_h -Stromdichte in fetalen Myozyten, nachdem sie in Kultur dedifferenziert worden waren (Farès et al. 1998).

1.2.3. I_h in neuronalem Gewebe

I_h wurde beinahe ubiquitär im Nervensystem gemessen (Pape 1996). Dabei erfüllt er in den unterschiedlichen Neuronen verschiedene komplexe Funktionen.

So trägt er in vielen Neuronen zur Stabilisierung und Determinierung des Ruhepotentials bei. I_h ist im Bereich des Ruhepotentials der meisten Neuronen aktiviert und der resultierende Einwärtsstrom bedingt, daß das Ruhepotential deutlich positiver als das K^+ -Gleichgewichtspotential ist. Tatsächlich führt die Blockade von I_h mit Cs^+ zu einer Hyperpolarisation (Maccaferri et al. 1993, McCormick und Pape 1990 (a), Pape 1994, Travagli et al. 1994). Ein weiterer Hinweis auf diese Funktion ist, daß das Ruhepotential von Neuronen in der basalen Amygdala, in denen I_h nicht exprimiert wird, deutlich näher am K^+ -Gleichgewichtspotential liegt als das anderer Neurone (Womble et al. 1993).

Die cAMP-vermittelte Zunahme des h-Stromes führt zu einer Anhebung des Ruhepotentials näher zur Auslöseschwelle für Na^+ / K^+ -Aktionspotentiale. Über eine Hebung bzw. Senkung des Ruhepotentials kann somit die Erregbarkeit der Zelle, d.h. ihre Bereitschaft, auf eintreffende de- bzw. hyperpolarisierende Reize zu reagieren, moduliert werden.

Da I_h einer Hyperpolarisation mit einem depolarisierenden Strom entgegenwirkt, stabilisiert er das Membranpotential gegenüber Fluktuationen, wie sie z.B. durch Variationen der K^+ - oder H^+ -Konzentration oder der Temperatur verursacht werden können (Edman et al. 1992).

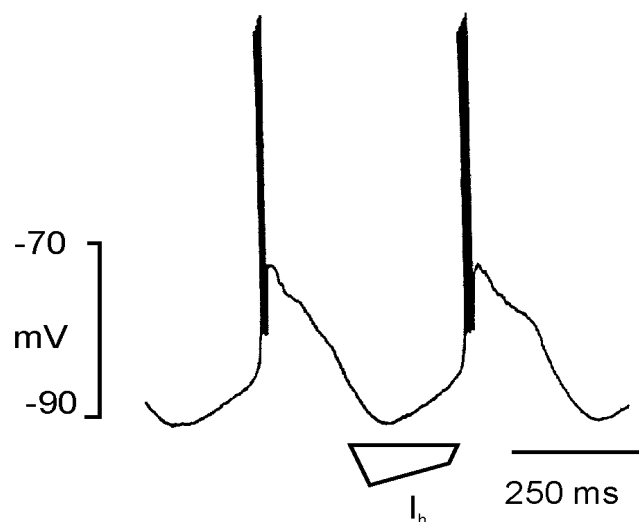
Ebenso trägt er zur Kontrolle sogenannter Nach-Hyperpolarisationen in der Folge von Aktionspotentialen bei (Maccaferri et al. 1993).

Bemerkenswert ist die Funktion von I_h in Photorezeptoren, in denen der Strom übrigens als erstes entdeckt worden war (Fain et al 1978). Bekanntlich reagieren die Photorezeptoren auf eintreffende Lichtreize mit einer Hyperpolarisation. Diese Hyperpolarisation ist erst ab einer bestimmten Lichtreizstärke groß genug um I_h zu aktivieren, der dann einer übermäßigen Hyperpolarisation entgegenwirkt. I_h trägt hier also zur Adaptation der Sensitivität bei stärkeren Lichtreizen bei (Attwell und Wilson 1980, Fain et al. 1978, Hestrin 1987, Wollmuth und Hille 1992).

Ebenso wie im Herzen trägt I_h auch in manchen Neuronen zur Erzeugung rhythmischer Aktivität bei (McCormick und Pape 1990 (a,b), Bal und McCormick 1997, Pape 1996). Dies konnte zum Beispiel an thalamocorticalen Neuronen gezeigt werden, die in rhythmischen Abständen von 0.25-2 s Salven von Aktionspotentialen abfeuern. Dieser Rhythmik unterliegt eine langsame Oszillation des Membranpotentials, die durch das Zusammenspiel von I_h mit einem T-Typ- Ca^{++} -Kanal entsteht (McCormick und Pape 1990 (a)) (s. Abb. 1.4.). Von thalamischen Zellen aus werden große neuronale Netzwerke gesteuert, deren rhythmische Aktivität z.B. im EEG während verschiedener Schlafphasen oder auch Absence-Epilepsien sichtbar wird (Bal und McCormick 1996, Lüthi und McCormick 1998 (b), Pape 1996).

Abb. 1.4.

Aktionspotentiale eines thalamischen Relais-Neurons. Die Depolarisationsphase zwischen den Salven wird durch den einwärtsgerichteten I_h bewirkt (Modif. nach McCormick und Pape 1990).



1.2.4. I_h in sonstigen Geweben

Außer in Herz und Gehirn wurde I_h auch in anderen Geweben verschiedener Spezies identifiziert, so beispielsweise im glatten Muskel (Benham et al. 1987, Siegenbeek van Heukelom 1991, Okabe 1999), in der Speicheldrüse des Blutegels (Wuttke et al. 1992) oder im Endothel

der Blut-Hirn-Schranke (Janigro et al. 1994). Die Funktion in diesen Geweben ist nicht genau bekannt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß I_h in einer Vielzahl von Geweben, insbesondere im Herz und verschiedenen Gehirnregionen, eingehend untersucht wurde. Je nach Gewebe wurden ihm verschiedene z.T. sehr bedeutende Funktionen zugeschrieben.

Trotzdem war es bis 1998 nicht gelungen, die molekulare Grundlage für I_h zu identifizieren. Messungen konnten nur an nativen Zellen durchgeführt werden. Daher konnten über die Natur des zugrundeliegenden Proteins nur Vermutungen angestellt werden. So führte beispielsweise die hohe Selektivität zusammen mit der geringen Leitfähigkeit zu der Annahme, daß I_h eher durch ein transporterähnliches Protein statt durch einen klassischen Ionenkanal vermittelt wird (Brown und Ho 1996). Außerdem war vorgeschlagen worden, daß der I_h -Kanal ein Heterooligomer ist, bei dem die cAMP-Sensitivität durch eine CNG-Kanal-Untereinheit vermittelt wird (Finn et al. 1996). Obwohl I_h in den verschiedenen Organen große Gemeinsamkeiten aufweist, bestehen doch auch eindeutige Unterschiede zwischen den Messungen in unterschiedlichen Geweben. Insbesondere bei $V_{1/2}$, der Aktivierungsgeschwindigkeit und der Sensitivität gegenüber cAMP ergeben sich zum Teil beträchtliche Variationen. Worauf beruhen diese?

Zudem war es schwierig, Medikamente zu entwickeln, die I_h -Kanäle blockieren. Solche „spezifischen bradykarden Substanzen“ wären eine interessante Alternative zu den β -Blockern. Da rekombinante I_h -Kanäle wegen der fehlenden cDNA-Sequenz nicht verfügbar waren, war eine automatisierte Testung von Substanzen nicht möglich. Messungen an nativen Zellen sind dafür zu aufwendig.

1.3. Ziel dieser Arbeit

Zu Beginn der Experimente im September 1997 war die molekulare Struktur des I_h -Proteins noch vollkommen unbekannt. Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Klonierung einer cDNA, die für einen I_h -Kanal kodiert. Anschließend sollte das Protein heterolog exprimiert werden, um durch elektrophysiologische Messungen zu bestätigen, daß der gefundene Kanal tatsächlich einen hyperpolarisationsaktivierten Kationeneinstrom vermittelt. Schließlich sollte mit der Methode der *In situ*-Hybridisierung Aufschluß über die Gewebsverteilung des neu gefundenen Kanals und seiner beiden nächsten Verwandten gewonnen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Arbeit mit Bakterien

2.1.1. Verwendeter Stamm

Zur Amplifikation von Plasmiden wurde der *Escherichia coli* Stamm XL1-blue MRF' (Stratagene) verwendet, dessen Genotyp $\Delta(mrc)183 \Delta(mrcCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ end } Al \text{ sup } E44 \text{ thi-1 } rec \text{ Al } gyrA96 \text{ relA1 } lac$ [F'pro AB^QZ Δ M15Tn10 (Tet^r)] lautet.

2.1.2. Nährmedien und Antibiotika

Die Züchtung der Bakterien erfolgte in dem Vollmedium Luria-Bertani (LB) mit Glucose, das zur Sterilisation für 10 min bei 121° C und 2 bar autoklaviert worden war.

Luria-Bertani-Medium(+):

Trypton (Gibco-BRL)	10g
Hefeextrakt (Gibco-BRL)	5g
NaCl	5g
Glucose	1g
H ₂ O	ad 1000ml

pH 7,2-7,5

Die Selektion plasmidtragender Bakterien erfolgte mit Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml). Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar (Gibco-BRL) hinzugefügt. Nach Abkühlen auf 50° C wurde Ampicillin in einer Konzentration von 50 µg/ml zugegeben und das Medium in sterile Petrischalen gegossen.

Um unter allen mit pUC-Vektoren transformierten Klonen jene selektionieren zu können, die einen pUC-Vektor mit Fremd-DNA in der Multiplen Klonierungsstelle tragen, wurde das Phänomen der α -Komplementierung der β -Galaktosidase ausgenutzt (Blau-Weiß-Selektion). Dazu wurde ein LB(-)-Agar (ohne Glucose) verwendet, dem nach dem Autoklavieren bei ungefähr 50° C folgende Stoffe zugesetzt wurden:

- 2 ml/l X-Gal (2%-ige 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -galaktosid-Lösung in DMF, Roth)
- 500 µl/l IPTG (1 M wässrige Isopropyl- β -D-thiogalactosid-Lösung, Roth)
- 1 ml/l Ampicillin-Na (50 mg/ml).

IPTG induziert in *E. coli* die Produktion von β -Galaktosidase, die wiederum die Bildung eines blauen Indigofarbstoffes aus X-Gal katalysiert. Diese β -Galaktosidase besteht aus zwei Untereinheiten, wobei die ω -Untereinheit von dem bakteriellen Chromosom kodiert wird, die α -Untereinheit von dem Plasmid. Das Gen des α -Peptids ist so in dem Plasmid plaziert, daß es durch Einbau von Fremd-DNA zerstört wird. Bei erfolgter Rekombination kann somit die β -Galaktosidase nicht mehr gebildet werden, so daß die Klone, in deren Plasmid ein fremdes DNA-Fragment inseriert ist, an ihrer weißen Farbe erkennbar sind.

2.1.3. Kultivierung

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte aerob in LB-Medium bei 37° C unter Schütteln bei 225 rpm. Zur kurzfristigen Aufbewahrung und um Einzelkolonien zu erhalten, wurden Bakteriensuspensionen auf LB-Platten ausgestrichen, bei 37° C über Nacht inkubiert und bei 4° C bis zu 8 Wochen gelagert. Zur längeren Aufbewahrung wurden Aliquots von logarithmisch wachsenden Flüssigkulturen mit einem gleichen Volumen autoklavierten Glycerin (ICN) gemischt und bei -20° C eingefroren.

2.2. Verwendete Plasmide

pUC19

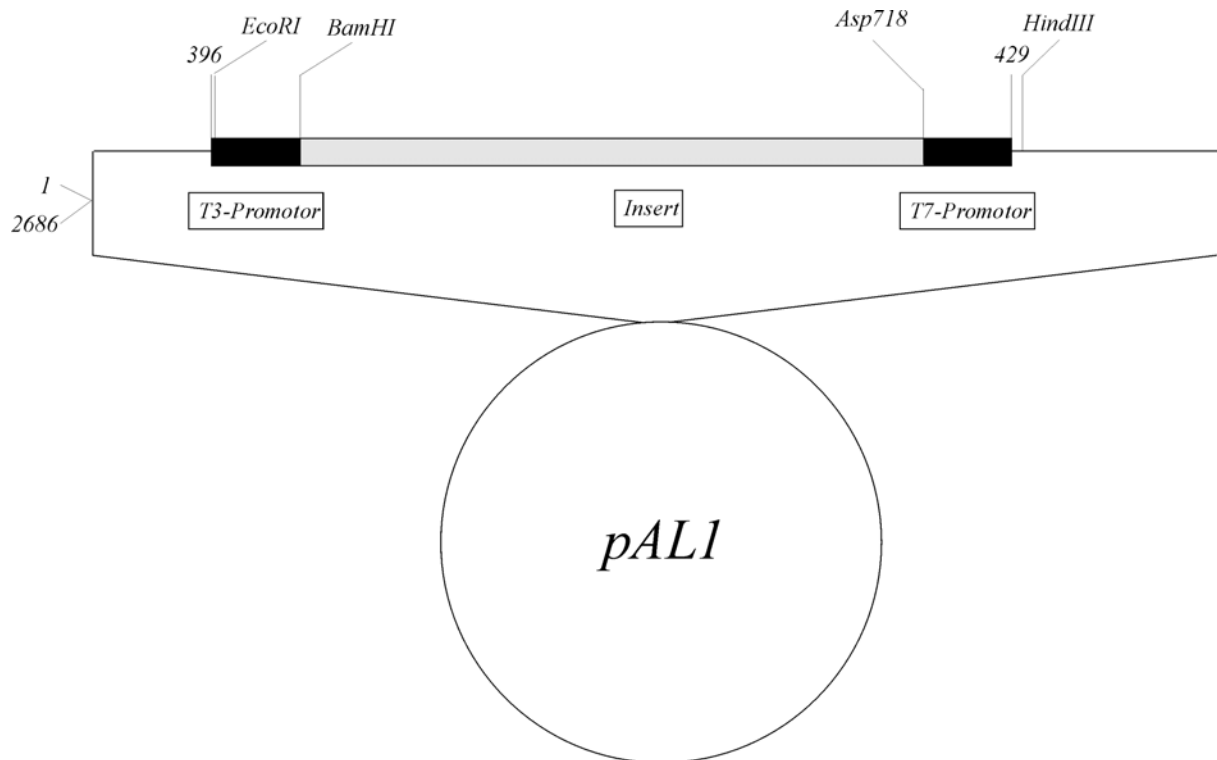
Das Plasmid pUC19 (Pharmacia) enthält das Ampicillinresistenzgen (Amp^r), den *E. coli*-Replikationsursprung, und einen Teil des lacZ-Gens für den leichten Nachweis des Einbaus von Fremd-DNA mittels Farbreaktion (α -Peptid der β -Galaktosidase; siehe 2.1.2).

pBluescript II

Der Vektor pBluescript (Stratagene) besitzt ebenfalls ein Ampicillinresistenzgen, den *E. coli*-Replikationsursprung und das Gen für das α -Peptid der β -Galaktosidase.

pAL1

Dieser Vektor wurde aus pUC19 konstruiert, indem zu beiden Seiten der multiplen Klonierungsstelle die Sequenz für den T3- und T7-RNA-Polymerase-Promotor sowie Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Asp*718 eingefügt wurden (Ludwig et al. 1997). Eingesetzt wurde pAL1 für die Subklonierung und *In vitro*-Transkription der Sonden zur *In situ*-Hybridisierung.

**Abb. 2.1.**

Karte des pAL1. In die Multiple Klonierungsstelle von pUC19 sind die T3- und T7-Promotoren sowie die BamHI- und Asp718-Schnittstellen eingefügt, zwischen die das Insert ligiert wird. Dazu werden dem Insert per PCR (2.8.) an beiden Seiten ebenfalls die Schnittstellen für BamHI und Asp718 angefügt. (s.a. 2.12.2.)

pcDNA3

pcDNA3 (Invitrogen) diente als Expressionsvektor. Er kann in *E. coli* vermehrt und in eukaryoten Zellen zur heterologen Expression von rekombinanten Proteinen verwendet werden. Der Cytomegalievirus-Promotor sorgt für eine starke Transkription der inserierten cDNA. Die Stabilität der transkribierten RNA wird durch ein Polyadenylierungssignal (aus dem Wachstumshormonen des Rindes) verbessert.

2.3. Transformation von Bakterien

2.3.1. Präparation von kompetenten Bakterienzellen

Bakterielle Zellen, die in der Lage sind, exogene DNA aufzunehmen, werden als kompetente Zellen bezeichnet. Um *E. coli* Bakterien kompetent zu machen wurden sie mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt. Dazu beimpfte man 100ml LB(-)-Medium mit 1ml einer Übernachtskultur ausgehend von einer frischen Einzelkolonie von *E. coli* XL1-blue.

Sobald eine OD_{600} von 0,35 bis 0,38 erreicht war, wurde die Kultur abgekühlt und abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 15 ml 1x TSS resuspendiert, in Portionen von je 500 μ l aliquotiert, schockgefroren und bei -80° C gelagert.

1x TSS (Transformation and Storage Solution):

PEG (Polyethylenglykol) 3350	12,5 ml
1M $MgCl_2$	2,5 ml
100% DMSO	2,5 ml
LB-Medium	ad 50 ml

2.3.2. Transformation von *E. coli*

Die Einschleusung von DNA in Bakterienzellen wird als Transformation bezeichnet. Da die verwendeten Vektoren u.a. für eine Antibiotikaresistenz kodieren, läßt sich durch Zugabe eines Antibiotikums zum Kulturmedium ein Selektionsdruck erreichen, bei dem ein so in die Zelle geschleustes Plasmid stabil auf die Tochterzelle vererbt wird.

Nach dem Auftauen wurden die kompetenten Bakterienzellen zusammen mit dem Ligationsansatz (2.7.4) zur Aufnahme der DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer einstündigen Erholungsphase in LB-Medium bei 37° C wurde die Bakteriensuspension auf Ampicillin-Agarplatten (für Blau-Weiß-Selektion: X-Gal-Platten) ausplattiert und bei 37° C bebrütet. Mittels Kochschnelltest (2.5.1) wurde die erfolgreiche Transformation kontrolliert.

2.4. Reinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.4.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine OD_{260} von 1:

- 50 μ g doppelsträngige DNA
- 40 μ g einzelsträngige RNA
- 33 μ g einzelsträngiges Oligonukleotid.

Die Reinheit von DNA und RNA konnte aus dem Verhältnis OD_{260}/OD_{280} abgeschätzt werden. Dieser Quotient sollte über 1,7 liegen.

2.4.2. Präzipitation

Nukleinsäuren wurden zur Aufkonzentrierung und Reinigung mit Ethanol gefällt (Sambrook et al. 1989). Dazu wurde der wäßrigen DNA- bzw. RNA-Lösung 1/10 Volumen 5M NaCl und 2,5 Volumen Ethanol (-20° C) zugefügt. Dieser Ansatz wurde 15 min bei -80° C inkubiert, abzentrifugiert (12000 rpm, 15 min, 4° C) und der Überstand vorsichtig dekantiert. Zum Entsalzen wurde das Pellet mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in wenig Wasser gelöst.

2.4.3. Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Phenol/Chloroform-Extraktion dient dazu, Proteine (z.B. Enzyme) aus wäßrigen Nukleinsäurelösungen zu entfernen. Die Nukleinsäurelösung wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1, Roth) versetzt, zur Emulsionsbildung 5 min kräftig geschüttelt und zur erneuten Phasentrennung zentrifugiert (12000 rpm, 5 min). Die wäßrige Oberphase, die die Nukleinsäuren enthält, wurde in ein neues Gefäß überführt und mit Ethanol präzipitiert.

2.5. Isolierung von Plasmid-DNA

2.5.1. Kochschnelltest nach Holmes und Quigly

Dieses Verfahren dient vor allem der schnellen Isolierung geringer Mengen von Plasmid-DNA. Die Bakterien werden hierbei durch Lysozym, Triton und Hitze aufgeschlossen. Die chromosomale DNA bleibt dabei an den Zelltrümmern haften und kann durch Zentrifugation von der Plasmid-DNA abgetrennt werden.

Eine am Vortag mit einem einzigen Zellklon beimpfte, über Nacht zur Sättigung gewachsene, 7 ml LB-Bakterienkultur wurde durch Abzentrifugieren geerntet. Das Bakterienpellet wurde in STET-Puffer (8 % Saccharose, 5 % Triton-X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 8,0) resuspendiert und in Anwesenheit von Lysozym (Boehringer) und RNase A 45 s aufgekocht. Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer (12000 rpm, 15 min, 4° C) wurde das im Überstand befindliche Plasmid mit Isopropanol gefällt und anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Ausbeute lag bei etwa 20 µg. 1/20 der Präparation wurde für die Restriktionsanalyse (s. 2.7.1) verwendet.

2.5.2. Alkalische Lyse mit Säulenchromatographie

Um Plasmid-DNA in größerer Menge und höherer Reinheit zu erhalten, wurde der "Qiagen Maxi Kit" verwendet. Dieser beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) in Verbindung mit einer anschließenden chromatographischen Reinigung über eine Anionenaustauschersäule. Die Bakterien wurden in NaOH/SDS lysiert, wobei die Proteine und DNA-Moleküle denaturierten. Die freigesetzten RNA-Moleküle wurden durch RNase A verdaut. Bei der anschließenden Neutralisation mit Kaliumacetat renaturierte nur die relativ kleine Plasmid-DNA wieder und blieb deshalb in Lösung. Im Gegensatz dazu blieb das viel größere Bakterienchromosom denaturiert und konnte mit den übrigen Zelltrümmern, ausgefallenen Salzen und SDS abgetrennt werden. Die Bedingungen für den Auftrag auf die Säule und die Waschschriffe wurden so gewählt, daß Proteine, Polysaccharide, RNA und andere Verunreinigungen quantitativ abgetrennt werden konnten. Die eluierte Plasmid-DNA wurde gefällt, getrocknet, in 250 µl Wasser aufgenommen und bei - 20° C gelagert. Mit Aliquots der DNA wurde die Konzentration photometrisch bestimmt und eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Die hochreine Plasmid-DNA konnte als Ausgangsmaterial für viele Zwecke eingesetzt werden, etwa für PCR (2.8), zur Transformation von Bakterien (2.3.), zur Sequenzierung (2.9.) oder zur Transfektion eukaryoter Zellen (2.13.4.).

2.6. Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten

Aufgrund ihrer negativen Ladung können Nukleinsäuren in dem elektrischen Feld eines Gels nach ihrer Masse und Konformation (linear, offenzirkulär, superhelikal) aufgetrennt werden. Durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid können die getrennten Nukleotidfragmente im UV-Licht (302 nm) als diskrete Banden im Gel sichtbar gemacht werden. Zum Größenvergleich diente ein DNA-Standard (1 kb Ladder, Gibco-BRL). Um den Verlauf der Elektrophorese zu kontrollieren wurden dem Auftragspuffer Farbmarker zugegeben. Bromphenolblau wandert mit DNA-Fragmenten von 10-100 bp und markiert daher die Elektrophorese-Front. Xylencyanol wandert mit DNA-Fragmenten von ca. 5 kb.

Lösungen:**10x TBE:**

Tris (USB)	0,9 M
Borsäure (Merck)	0,9 M
EDTA pH 8,0 (ICN)	20m M

Ethidiumbromidstammlösung:

10 mg/ml (Sigma), wäßrig

Auftragspuffer (6x dye):

Ficoll Typ 400 (Sigma)	18 %
EDTA pH 8,0	0,12 mM
TBE	6x
Bromphenolblau (IBI)	0,15 %
Xylencyanol (Sigma)	0,15 %

Elektrophorese-Puffer:

1x TBE (1 Teil 10x TBE + 9 Teile Wasser)

2.6.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Auftrennung von relativ kleinen DNA-Fragmenten mit einer Größe von 50-1000 bp diente die vertikale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Dafür wurden 5%-ige Polyacrylamidgele in 1x TBE als Laufpuffer (Sambrook et al. 1989) verwendet. Die Trennstrecke betrug 15 cm und die Dicke 0,75 mm (analytische Gele) bzw. 1,5 mm (präparative Gele).

Zusammensetzung von 30 ml Polyacrylamidgel:

Rotiphoresegel (Acrylamid/N,N'-Bisacrylamid = 29:1, 40 %, Roth)	3,75 ml
10x TBE	3 ml
H ₂ O	ad 30 ml
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, Sigma)	35 µl
20% APS (Ammoniumpersulfat, Sigma)	80 µl

Den DNA-Proben wurde vor dem Auftragen 1/6 Volumen Auftragspuffer zugegeben. Zum Einlaufen wurde eine Spannung von 100 V angelegt, zur Trennung schließlich für 1 h 270 V. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 5 min lang in Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) gefärbt und das Bandenmuster unter UV-Licht ausgewertet.

2.6.2. Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente im Bereich von 1 bis 12 kb wurden mit der horizontalen Gelelektrophorese in Agarosegelen (Sambrook et al. 1989) aufgetrennt. 0,7 % (g/v) Agarose (Seakem GTG, Biozym) wurde in 1x TBE im Mikrowellenherd geschmolzen, mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration im Gel: 800 ng/ml) und in eine horizontale Elektrophoresekammer gegossen. Die Elektrophorese erfolgte für 1-3 h bei konstanter Spannung von 100 V mit 1x TBE als Laufpuffer.

2.6.3. Elektroelution

Um nach der Gelelektrophorese ein DNA-Fragment definierter Größe aus dem Gel isolieren zu können, wurde die Methode der Elektroelution verwendet. Die entsprechende Bande wurde unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten, mit 1x TBE in einen Dialyse-Schlauch (Sigma) überführt und die DNA in einer horizontalen, mit 1 x TBE gefüllten Elektrophoresekammer bei 140 mA aus dem Gel eluiert. Nach etwa 1,5 h wurde die DNA durch Ethanol-fällung (s. 2.4.2) isoliert.

2.7. Enzymatische Modifikation von DNA

2.7.1. Restriktionsenzyme

Restriktionsendonukleasen stellen eine Gruppe von bakteriellen Enzymen dar, die doppelsträngige DNA innerhalb oder unmittelbar neben spezifische Erkennungssequenzen spalten. Bei der Spaltung entstehen entweder glatte Enden (blunt-ends) oder einander komplementäre 5'- bzw. 3'-überhängende Enden (sticky-ends). Da die DNA-Enden immer eine 5'-Phosphat- und eine 3'-OH-Gruppe besitzen, ist eine spätere enzymatische Neuverknüpfung (Ligation) kompatibler Enden möglich. Die Inkubationszeit betrug bei der für das jeweilige Enzym

Restriktionsenzym	Firma	Erkennungssequenz	Puffer
Afl III	NEB	5'-A/CPuPyGT-3'	NEB 3
Apa I	NEB	5'-GGGCC/C-3'	NEB 4
Asp I	Roche	5'-GACN/NGTC-3'	B
Asp 718	Roche	5'-G/GTACC-3'	B
Ava I	NEB	5'-C/PyCGPuG-3'	NEB 4
Ava II	NEB	5'- G/GACC-3'	NEB 4
Bam HI	Roche	5'-G/GATCC-3'	B
Bgl I	NEB	5'-GCCNNNN/NGGC-3'	NEB 3
Bsa I	NEB	5'-GGTCTCN/-3'	NEB 3
Dde I	NEB	5'-C/TNAG-3'	NEB 3
Dra I	Roche	5'-TTT/AAA-3'	M
Eco RI	NEB	5'-G/AATTC-3'	NEB 3
Hae II	NEB	5'-PuGCGC/Py-3'	NEB 4
Hind III	NEB	5'-A/AGCTT-3'	NEB 2
Nco I	NEB	5'-C/CATGG-3'	NEB 4
Pst I	NEB	5'-CTGCA/G-3'	NEB3
Pvu II	NEB	5'-CAG/CTG-3'	NEB 2
Sty I	NEB	5'-C/CATGG-3'	NEB 3

Tabelle 2.1. Verwendete Restriktionsenzyme.

N = beliebiges Nukleotid, Pu = Purin, Py = Pyrimidin.

optimalen Temperatur 1,5 h (analytischer Ansatz) bzw. 3-8 h (präparativer Ansatz). Anschließend wurde die DNA gelelektrophoretisch analysiert.

Tabelle 2.1. zeigt die verwendeten Restriktionsendonukleasen, ihre Erkennungssequenzen und die zugehörigen Puffer.

2.7.2. Alkalische Phosphatase

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP = calf intestine phosphatase) spaltet endständige 5'-Phosphatgruppen, wie sie nach Restriktionsverdau (s. 2.7.1.) entstehen, von DNA-Molekülen ab. Durch vorherige Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren mit CIP wurde ein intramolekularer Ringschluß während der Ligation verhindert und so die Klonierungseffizienz der Fremd-DNA erhöht.

Das linearisierte Plasmid (etwa 5 pmol) wurde in 50 mM Tris pH 8,0 mit 1 U CIP (Boehringer) für 1 h bei 37° C inkubiert. Nach Hitzedenaturierung des Enzyms (10 min, 75° C) konnte die Vektor-DNA in einen Ligationsansatz eingesetzt werden.

2.7.3. Auffüllreaktion

Bevor aus der PCR gewonnene DNA-Stücke kloniert werden konnten, mußten ihre Enden "glatt gemacht", d.h. ihre Überhänge beseitigt und das 5'-Ende phosphoryliert werden. Dies erfolgte zum einen mit der T4-DNA-Polymerase (NEB), die DNA-Aufbau in 5'→3'-Richtung katalysiert und 3'-Überhänge abschneidet. Zum anderen phosphoryliert die T4-Polynukleotidkinase (NEB) ATP-abhängig das 5'-Hydroxylende von Polynukleotiden. 0,1 – 1 µg eines DNA-Fragmentes wurden durch die beiden Enzyme aufgefüllt, phosphoreliert und konnten dann in das pUC19-Plasmid ligiert werden, das linearisiert und mit glatten, dephosphorylierten Enden vorlag.

2.7.4. T4-DNA-Ligase

Die ATP-abhängige T4-DNA-Ligase (NEB) katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxylende von doppelsträngiger DNA oder RNA. Das Enzym kann sowohl überhängende als auch glatte Enden verknüpfen. Ligase, linearisierter Vektor und Fremd-DNA wurden in Ligasepuffer gemischt und für etwa 16 h bei 16° C inkubiert. Anschließend konnte das rekombinante Plasmid durch Transformation in *E. coli* eingeschleust werden.

2.8. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die von K.B. Mullis entwickelte Polymerasekettenreaktion (Saiki et al. 1985; Mullis und Fallona 1987) dient der exponentiellen Vermehrung definierter DNA-Abschnitte unter Verwendung von spezifischen, komplementären Oligonukleotidprimern und thermostabilen archaebakteriellen DNA-Polymerasen. Durch ein Primer-Paar, das aus einem Vorwärts- und einem Rückwärtsprimer besteht, die an den Sense- bzw. Antisense- Strang binden, wird ein spezifischer DNA-Abschnitt auf dem Template definiert. Nach Auftrennen des DNA-Doppelstranges durch Hitzedenaturierung (94° C) lagern sich die Primer, die in hohem molarem Überschuß zugegeben werden bei 40 - 65° C an das Template an (Annealing). Danach komplementiert die hitzestabile DNA-Polymerase die beiden DNA-Einzelstränge (Elongation) bei 72° C. Dieser Vorgang (Denaturierung-Annealing-Elongation) wird zyklisch 20 - 40 mal wiederholt. Da sich die Zahl der DNA-Stränge im Reaktionsgemisch bei jedem Durchgang (im Idealfall) verdoppelt, wächst die DNA-Menge exponentiell an.

Wegen der enormen Sensitivität der Methode sind bei der Durchführung Verunreinigungen durch Fremd-DNA strikt zu vermeiden, um keine falsch positiven Ergebnisse zu erhalten. Dies geschieht beispielsweise durch die Verwendung spezieller PCR-Pipettenspitzen mit Filtern. Es wurde jedesmal eine Negativkontrolle mitgeführt, die bis auf das Template genauso wie der Reaktionsansatz zusammengesetzt war.

Typischer Reaktionsansatz:

H ₂ O	30µl	
DNA-Template (50 ng/µl)	1 µl	
Forward-Primer (10 pmol/µl)	2,5µl	
Reverse-Primer(10 pmol/µl)	2,5µl	
10xPfu-Puffer	4µl	
10xPfu-Puffer	1µl	} Enzymmix
Pfu Polymerase (2,5 U/µl)	1µl	
dNTP (1,25 mM)	8µl	
Σ	50µl	

Standardprotokoll

Die PCR fand in einem Thermocycler (Omni Gene HB-TR 3) von Hybaid statt. Als thermostabile Polymerase wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase von Stratagene verwendet. Der Ansatz wurde zunächst bis auf den Enzymmix zusammenpipettiert, zum Verdunstungsschutz mit 70 µl Mineralöl überschichtet und bei 94° C für 5 min denaturiert. Bis zur Zugabe des

Enzymmixes wurde der Ansatz auf 80° C gehalten (hot start). Danach wurde die DNA in 25 - 40 Zyklen aus Denaturierung, Annealing und Elongation vermehrt. Danach schloß sich eine letzte Verlängerungsphase von 10 min bei 72° C an, so daß möglicherweise nicht in ganzer Länge amplifizierte DNA-Fragmente vervollständigt werden konnten.

Die für Klonierung oder Sequenzierung verwendeten Primer sind im Anhang 6.2. angegeben.

2.9. Sequenzierung von DNA

Zu untersuchende DNA-Abschnitte wurden nach der Didesoxy-Methode (Sanger et al. 1977) sequenziert. Dabei synthetisiert eine DNA-Polymerase *in vitro* an einer einzelsträngigen Matrizen-DNA den komplementären Strang. Der Startpunkt der Reaktion ist durch die Zugabe eines spezifischen Primers definiert. Es finden parallel vier Reaktionen statt, wobei zu jedem Reaktionsansatz ein anderes Didesoxynukleosidtriphosphat (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) zugegeben wird. Bei Einbau eines ddNTPs statt des entsprechenden dNTPs kommt es zum Kettenabbruch, da das Fehlen der OH-Gruppe in 3'-Position eine Verlängerung verhindert. Das Verhältnis zwischen dNTPs und ddNTPs wird so gewählt, daß eine Mischung aus allen möglichen unterschiedlich langen DNA-Fragmenten entsteht. Danach werden die Fragmente basengenau der Länge nach durch PAGE aufgetrennt. Da alle Fragmente mit dem entsprechenden ddNTP enden, ergibt sich aus der Länge der Fragmente in den einzelnen Reaktionsansätzen die Position der einzelnen Basen, bzw. die Sequenz des zu untersuchenden DNA-Abschnittes. Die Fragmente wurden entweder durch den Einbau von ³⁵S-dATP oder durch Fluoreszenzfarbstoffe markiert. Die Auswertung erfolgte entweder nach Autoradiographie oder Photodetektion.

2.9.1 Sequenzreaktion mit radioaktiv markierten Nukleotiden (α -³⁵S-dATP)

Denaturierung:

Da für die Sequenzierung nach Sanger einzelsträngige DNA erforderlich ist, mußte die Plasmid-DNA denaturiert werden. Dazu wurden 8 µg Plasmid-DNA in 0,4 N NaOH inkubiert und gefällt. Das getrocknete DNA-Pellet konnte entweder sofort für die Sequenzreaktion eingesetzt oder bei -20° C gelagert werden.

Sequenzreaktion:

Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem „Sequenase® Version 2.0 Kit“ (USB) nach

Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Sequenase ist eine gentechnisch veränderte T7-DNA-Polymerase mit hoher Prozessivität und fehlender 3' – 5' - Exonuklease-Aktivität.

Nach Abstoppen der Reaktion konnten die Proben sofort auf das Gel aufgetragen oder bei -20° C gelagert werden.

Denaturierende PAGE und Autoradiographie:

Die DNA-Fragmente wurden unter denaturierenden Bedingungen in vertikalen Polyacrylamid-Harnstoffgelen (0,4 mm Dicke, 20 cm Breite, 40 cm Höhe) aufgetrennt und anschließend durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

50 ml Sequenziergellösung:

Harnstoff	21 g
Rothiphoreseggellösung (29:1, 40% Roth)	7,5 ml
10x TBE	5 ml
H ₂ O	ad 50 ml
TEMED	44 µl
20% APS	100 µl

Das Gel ließ man etwa 30 min bei 25 W vorlaufen, um eine optimale Temperatur von ungefähr 50° C zu erreichen. Als Laufpuffer diente 1x TBE. Unmittelbar vor dem Auftragen wurden die vier Terminationsansätze für 3 min bei 95° C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 W für 1,5-2 h und nach einem zweiten Auftrag noch einmal so lang. Sobald die Lauffront des letzten Auftrages die Unterkante des Gels erreicht hat, wurde das Gel auf ein Filterpapier (Schleicher und Schüll, GB 003) überführt und für 2 h unter Vakuum bei 80° C getrocknet.

Autoradiographie:

Zur Autoradiographie wurde das trockene Gel in eine Filmkassette gelegt und mit einem Röntgenfilm bedeckt. Nach 16 - 30 h wurde das Autoradiogramm entwickelt. Mit zwei Aufträgen konnten etwa 200 - 350 Basen der Sequenz gelesen werden.

Beseitigung von Kompressionen

Gelegentlich wandern unterschiedlich lange DNA-Fragmente aufgrund sich ausbildender Sekundärstrukturen im Gel auf gleicher Höhe, es entstehen sogenannte Kompressionszonen. Diese Zonen können meist aufgelöst werden, indem man dGTP durch deaza-dGTP oder dITP im Reaktionsansatz ersetzt.

2.9.2. Automatische Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Primern (ALF)

DNA wurden nicht nur radioaktiv sondern auch mit Hilfe eines Sequenzierautomaten (A.L.F.TM DNA Sequencer, Pharmacia) sequenziert. Als Polymerase wurde Thermo Sequenase (Amersham) eingesetzt, eine hitzestabile, Exonuklease-freie DNA-Polymerase. In mehreren Zyklen (Hitzenaturierung der DNA, Anlagerung der Primer, Elongation bzw. Kettenabbruch) synthetisiert die Thermo Sequenase in Anwesenheit von dNTPs und ddNTPs komplementäre DNA-Fragmente - und zwar einzelsträngig, nicht wie in der PCR (mit einem Primerpaar) doppelsträngig. Als Primer wurden die fluoreszenzmarkierten Forward- bzw. Reverse-Primer von Amersham verwendet, die an pUC-Vektoren vor bzw. hinter der multiplen Klonierungsstelle binden. Da mit jedem Zyklus die Population der DNA-Fragmente vergrößert wurde, war nur eine geringe Menge an zu untersuchender Plasmid-DNA (1-3 µg) vonnöten. Nach Abschluß der Reaktionszyklen wurden die jeweils vier Reaktionsansätze auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen und in dem Sequenzierautomaten über 7,5 h hinweg elektrophoretisch aufgetrennt. Der Fluoreszenzfarbstoff, der durch den Primer an jedem DNA-Fragment hängt, wurde durch einen Laserstrahl angeregt und die daraufhin abgegebene Fluoreszenz von Photodetektoren erfaßt. Nach Auswertung der gespeicherten Daten mit der A.L.F.TM Manager Software konnten pro Lauf 300 - 500 Basen bestimmt werden.

Programm für den Thermocycler:

Initiale Denaturierung:		95° C, 90 s
25 Zyklen	}	Denaturierung: 95° C, 30 s
		Primer-Anlagerung: 50° C, 40 s
		Polymerisation: 72° C, 30 s

60 ml Sequenziergellösung:

Harnstoff	25,5 g
Rothiphoresegellösung (29:1, 40%, Roth)	9,9 ml
10x TBE	8 ml
H ₂ O	ad 60 ml
TEMED	53 µl
20% APS	120 µl

2.10. Herstellung ^{32}P -markierter DNA-Sonden

Mit dem "Random primed Labeling Kit" (Boehringer) konnten ^{32}P -markierte DNA-Sonden hergestellt werden. Dabei wurde an einer Einzelstrangmatrize unter Verwendung von ^{32}P -markiertem dCTP der Gegenstrang synthetisiert. Dazu diente das sogenannte Klenow-Enzym, eine modifizierte DNA-Polymerase I aus *E.coli*, der der C-Terminus und damit die 5'→3'-Exonukleaseaktivität fehlt. Zum Polymerisationsstart benötigt die Polymerase ein kurzes Stück doppelsträngige DNA. Deshalb wurde ein Gemisch aus verschiedensten Hexanukleotiden als "random"-Primer zugegeben (Feinberg und Vogelstein 1983). Das als Matrize eingesetzte DNA-Fragment stammte aus einer PCR oder war durch Restriktionsenzyme aus Plasmid-DNA herausgeschnitten worden. Nach Abschluß der Reaktion mußten überschüssige, nicht eingebaute Desoxyribonukleosidtriphosphate durch Säulenchromatographie an einer NickTM Säule (Pharmacia) entfernt werden. Die gereinigte Probe wurde mit TE-Puffer von der Säule eluiert und ihre spezifische Aktivität mit Hilfe eines Szintillationszählers bestimmt.

Reaktionsansatz:

DNA (60 ng/µl):	1,5 µl
H ₂ O	6,5 µl
Summe	8,0 µl

TE-Puffer:

1 M Tris pH 8,0	10 ml
0,5M EDTA, pH 8,0	2 ml
H ₂ O	ad 1000 ml

Denaturieren bei 95° C für 10 min,
dann hinzufügen:

dXTP*	3 µl
Reaction Mix**	2 µl
^{32}P -dCTP	6 µl
Klenow -Enzym (20 U/µl)	1 µl
Summe:	20 µl

Inkubieren bei 37° C für 30 min,
dann auf Nick-Coloumn auftragen

*dXTP = je 0,16 mM dATP, dGTP, dTTP in 10 mM Tris-Puffer

**Reaction Mix = Hexanukleotid-Mischung in 10 x Reaktionspuffer

2.11. Northern Blot-Analyse

Mit der Northern Blot-Analyse werden Vorkommen und Größe bestimmter RNA Transkripte in verschiedenen Geweben untersucht. Dabei wird die RNA aus verschiedenen Geweben isoliert, mit Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nylonmembran

übertragen. Nun wird die an die Membran gebundene RNA mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vorgefertigte Northern Blots der Firma Clontech verwendet. Auf die Membranen war bereits die immobilisierte RNA verschiedener Gewebe der Maus gebunden. Zur (Prä)hybridisierung wurden sie mit 1 ml Lösung pro 5 cm² Filter in einen Hybridisierungsbeutel (Gibco-BRL) eingeschweißt und im Wasserbad bei 42° C inkubiert. Nach dreistündiger Vorbehandlung mit Prähybridisierungspuffer erfolgte die eigentliche Hybridisierung in der Hybridisierungslösung, die die geeignete ³²P-markierte Gensonde enthielt (5 x 10⁶ cpm/ml) für 15 - 18 Stunden. Unspezifisch gebundene und überschüssige Gensonde wurde anschließend mit den folgenden Waschschritten von der Membran entfernt:

- 2 x 5 min in 2x SSC; 0,1 % SDS-Lösung bei Raumtemperatur,
- 2 x 10 min in 1x SSC; 0,1 % SDS-Lösung bei Raumtemperatur,
- 2 x 15 min in 0,1x SSC; 0,1 % SDS-Lösung bei 42° C.

Die Filter wurden 6 - 36 h auf eine Phosphoimagerplatte aufgelegt. Dadurch konnte die Lage der radioaktiven hybridisierten DNA-Sonde auf der Membran als schwarze Bande sichtbar gemacht werden. Die Größe der RNA ließ sich anhand eines auf der Membran befindlichen Längenstandards ablesen. Der Filter konnte nach zwei viertelstündigen Waschschritten mit 0,1x SSC; 0,1 % SDS-Lösung bei 95° C erneut zur Hybridisierung eingesetzt werden.

Prähybridisierungslösung:

5x PE	2,0 ml
20x SSC	2,5 ml
100 % Formamid, deionisiert	5,0 ml
ssDNA (salmon sperm)	150 µl
H ₂ O	ad 10 ml

Hybridisierungslösung:

5x PE	1,0 ml
20x SSC	1,25 ml
100 % Formamid, deionisiert	2,5 ml
ssDNA (10 ml/ml)	75 µl
Gensonde [5x 10 ⁶ cpm/ml x 5 ml]	
H ₂ O	ad 5 ml

Zur Denaturierung der Lachssperma-DNA wurden die Hybridisierungslösungen kurz vor ihrer Verwendung 10 min lang im kochenden Wasserbad erhitzt.

2.12. In situ-Hybridisierung

Prinzip:

Bei der *In situ*-Hybridisierung wird messenger RNA direkt im Gewebe („*In situ*“) nachgewiesen. Dazu wird das Gewebe mit einer 200 – 400 bp langen, radioaktiv markierten RNA-Sonde, die zu einem Abschnitt der interessierenden mRNA komplementär ist, hybridisiert und anschließend mit RNase A behandelt. Diese verdaut nur einzelsträngige RNA. Dort wo die Sonde mit der mRNA hybridisiert hat bleibt die RNA erhalten und kann anschließend aufgrund ihrer Radioaktivität fotografisch sichtbar gemacht werden. Als Negativkontrolle wurde der Komplementär-Strang der Sonde verwendet (gleiche Länge, gleicher GC-Gehalt, keine spezifische Bindung an mRNA).

2.12.1. Verwendete Lösungen:

H₂O DEPC:

Diethylpyrocarbonat (DEPC)	1,0 g
H ₂ O	ad 1000 ml

über Nacht rühren lassen, danach durch Autoklavieren Reste von DEPC entfernen.

10x PBS:

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	6,2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
H ₂ O	ad 1000 ml

pH 7,4

5x RNase A-Puffer:

5 M NaCl	250 ml
1 M Tris pH 8,0	25 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	5 ml
H ₂ O	ad 500 ml

1M Tris:

Tris-Base	121 g
H ₂ O	ad 1000 ml

pH mit HCl_{conc} auf 8,0 einstellen.

0,5M EDTA, pH 8,0:

Na ₂ EDTA*2 H ₂ O	186,1 g
H ₂ O	ad 1000 ml

mit 5 M NaOH auf pH 8,0 einstellen.

5x Protease-Puffer:

1 M Tris pH 8,0	250 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	25 ml
H ₂ O	ad 1000 ml

3 M Natriumacetat, pH 5,2:

Natriumacetat*3H ₂ O	40,8 g
H ₂ O	ad 100 ml

mit Eisessig auf pH 5,2 einstellen.

Alle oben genannten Lösungen wurden RNase-frei hergestellt und durch Autoklavieren sterilisiert.

1M DTT:

Dithiothreitol (ICN)	1,5 g
3 M NaAzetat	33 μ l
H ₂ O	ad 10 ml
sterilfiltrieren und aliquotiert bei -20° C haltbar	

50 % Dextran:

Dextransulfat (MG=5x10 ⁶)	12,5 g
H ₂ O	ca. 12 ml
3 h bei 68° C lösen	
H ₂ O	ad 25 ml
bei -20° C lagern.	

Formamid (deionisiert):

Ionenaustauscherharz (BioRad)	ca. 5 g
Formamid	ca. 45 ml
bei 4° C lagern.	

50x Denhardt:

Ficoll	1 g
Polyvinylpyrrolidon	1 g
BSA	1 g
H ₂ O	ad 100 ml
sterilfiltrieren, aliquotiert bei -20° C lagern.	

Chloralhydratlösung:

Chloralhydrat	3,0 g
10x PBS pH 7,4	1 ml
H ₂ O	ad 10 ml
sterilfiltrieren, bei 4° C 4 Wochen lagern.	

Box-Puffer:

Formamid	50 ml
20x SSC	20 ml
H ₂ O	ad 100 ml

4 % PFA:

Paraformaldehyd	6 g
10x PBS	15 ml
H ₂ O	ad 150 ml
bei 60° C lösen, auf 4° C abkühlen, frisch zubereiten.	

1,25x Hybridisierungspuffer:

1M Tris pH 8,0	0,625 ml
5M NaCl	3,75 ml
0,5M EDTA pH 8,0	0,125 ml
50x Denhardt	1,25 ml
50 % Dextran	12,5 ml
Formamid (deionisiert)	31,25 ml
H ₂ O	ad 50 ml

2.12.2. Herstellung der RNA-Gensonden:

Für jedes Gen (mHCN1-3) wurden zwei spezifische Gensonden durch PCR (2.8.) aus mHCN-cDNA-Klonen amplifiziert und in den Vektor pAL1 ligiert. Dazu waren an den 5'-Enden der Primer für die PCR noch die Erkennungssequenzen für *Bam*HI und *Asp*718 angefügt. Über diese Schnittstellen wurden die DNA-Fragmente in den linearisierten, dephosphorylierten Vektor eingebaut. Die 3'-gelegene Sonde von mHCN2 ließ sich nicht per Standard-PCR amplifizieren, da der GC-Gehalt im entsprechenden Abschnitt über 75 % liegt. Deshalb wurde ein 335 bp langes Fragment mit *Bsa*I und *Sty*I aus einem mHCN2-cDNA-Bibliotheksklon herausgeschnitten und blunt in pAL1 ligiert. Die resultierenden Klone wurden mit Restriktionsverdau analysiert und die Insertionen wurden auf beiden Strängen sequenziert. Für jede Gensonde wurden ungefähr 12 μ g der

entsprechenden Plasmid-DNA mit *Bam*HI und *Asp*718 in zwei getrennten Ansätzen linearisiert (2.7.1.) und nach Phenol/Chloroform-Reinigung (2.4.3.) mit Ethanol gefällt, in 11 µl H₂O_{DEPC} gelöst und bei -20° C gelagert.

In-vitro Transkription:

Bei der In-Vitro-Transkription synthetisiert eine RNA-Polymerase eine zur DNA-Matrix komplementäre cRNA. Die verwendeten T3 bzw. T7-RNA-Polymerasen erkennen ihren spezifischen in pAL1 vorhandenen Promotor. Aus der Geometrie des pAL1 ergibt sich, daß die T7-RNA-Polymerase bei diesem System einen RNA-Strang, der komplementär zur entsprechenden Boten-RNA ist synthetisiert (Antisense-Probe), die T3-Polymerase dagegen einen Gegenstrang, der nicht komplementär, sondern identisch mit der entsprechenden Boten-RNA ist (Sense-Probe)(s. Abb. 2.1.). Die In vitro-Transkription wurde mit jeder Probe einmal mit nicht radioaktivem UTP getestet („kalte Transkription“). Die RNA-Produkte wurden gelelektrophoretisch untersucht. Anschließend wurde die In vitro-Transkription mit radioaktivem ³⁵UTP wiederholt („heiße Transkription“). Nach der In vitro-Transkription wurde die DNA-Matrize von DNaseI abgebaut und der Ansatz chromatographisch (NickTM Column, Pharmacia) aufgetrennt. Von den Fraktionen 1 bis 5 wurden jeweils 5 µl zu 5 ml Szintillationsflüssigkeit pipettiert und die Aktivität im Szintillationszähler gemessen. Die radioaktiv markierte Gensonde befand sich in Fraktion 2. Sie wurde zur besseren Stabilität in Hybridisierungslösung auf eine Konzentration von 1 x 10⁷ dpm/ml verdünnt und mit tRNA (RNase-frei, Boehringer) mit einer Endkonzentration von 0,5 µg und DTT mit einer Endkonzentration von 10 mM gemischt. Dabei diente DTT als Antioxidans der Stabilität des ³⁵S.

2.12.3. Anfertigung von Gewebeschnitten

Sämtliche für die *In situ*-Hybridisierung verwendeten Mäusegewebe stammten von erwachsenen, männlichen C57/Bl6 Mäusen. Gehirn und Herz wurden unmittelbar nach Tötung der Mäuse durch Genickbruch entnommen und sofort in Isopentan, das in einer Trockeneis-Ethanol-Mischung gekühlt wurde, bei ca. -50° C eingefroren. In luftdichten Gefäßen konnten die Organe bei -80° C gelagert werden.

In einem Kryostat (Leica, Jung CM 3000) wurden bei -20° C 16 µm dicke Präparate von den Geweben geschnitten und auf Polylysin-beschichteten Objektträger (PolysineTM, Menzel Gläser) aufgeschmolzen. Die Objektträger wurden eine halbe Stunde unter

Vakuum getrocknet und bei Raumtemperatur mit 4 %-iger Paraformaldehydlösung für 20 min fixiert. Nach einem Waschgang mit 0,5x SSC wurden die Schnitte in aufsteigenden Ethanolkonzentrationen (50 %, 70 %, 95 %, 100 %) entwässert. Die Schnitte wurden für mindestens 30 min vakuumgetrocknet. Falls sie nicht gleich zur *In situ*-Hybridisierung weiterbearbeitet wurden, konnten sie bei -80° C in einer luftdichten Box zusammen mit Trockenmittel (Silikagel) über Monate hinweg gelagert werden.

2.12.4. Standardprotokoll der *In situ*-Hybridisierung

Das Protokoll zur *In situ*-Hybridisierung wurde in modifizierter Form von Simmons et al. 1989 übernommen.

Es wurden getrocknete, fixierte Gefrierschnitte (2.12.3.) verwendet.

Zur besseren Freilegung der RNA wurden die Gewebeschnitte für 15 min mit 2 µg/µl Proteinase K in 1x Proteasepuffer vorbehandelt und anschließend 5 min in 0,5x SSC gewaschen.

Um eine unspezifische Bindung der Sonde an den Schnitten zu vermeiden wurde das Gewebe azetyliert:

- 3 min in 0,1M TEA (Triethylammoniumazetat) pH 8,0 inkubieren
- 10 min in 0,25 %-iger Essigsäureanhydridlösung in 0,1M TEA
- 2 Waschschrte: je 2 min in 2x SSC

Entwässerung der Schnitte:

- je 3 min in 50 %, 70 %, 95 %, 100 % Ethanol
- 5 min lufttrocknen
- 30 min vakuumtrocknen

Die Objektträger (OT) wurden in einer dicht verschließbaren Box waagrecht auf ein Gitter gelegt und die Gewebeschnitte mit der dickflüssigen Hybridisierungslösung bedeckt, die aus 8 Anteilen 1,25x Hybridisierungspuffer, 1 Anteil 1M DTT und 1 Anteil Wasser bestand. Um ein feuchtes Milieu in der Box aufrechtzuerhalten und damit ein Antrocknen der Hybridisierungslösung zu verhindern, wurde Saugpapier auf den Gefäßboden gelegt und mit Boxpuffer getränkt. Die Prähybridisierung erfolgte für zwei Stunden bei 42° C.

Sense- und Antisenseprobe (mit 1×10^7 dpm/ml Hybridisierungspuffer) wurden 10 min im 65° C Wasserbad erhitzt und nach Zugabe von 80 µl 1 M DTT auf 1 ml Probenlösung zentrifugiert (2 min 2000 rpm). 30 bis 100 µl der Hybridisierungslösung mit Antisense-

bzw. Sense-Probe wurden auf die prähybridisierten Schnitte pipettiert, die man danach bei 55° C für etwa 16 h inkubieren ließ.

Die Objektträger wurden am nächsten Tag in einen Glaträger gestellt und in Glasgefäßen von unspezifisch gebundener Probe befreit. Um den im RNA/RNA-Hybrid gebundenen ³⁵S zu stabilisieren, enthielten die Waschlösungen 1 mM DTT und 1 mM EDTA pH 8,0. Die mit Sense- und Antisense-Probe hybridisierten Schnitte wurden vollkommen gleich behandelt.

- 2 Waschschrte: je 10 min 2x SSC
- RNase A-Verdau: 30 min in 20µg/µl RNase A in 1x RNase-Puffer

RNase A baut spezifisch einzelsträngige RNA ab, RNA/RNA-Hybride dagegen nicht.

- 2 Waschschrte: je 10 min in 2x SSC bei Raumtemperatur
- 2 Waschschrte: je 1 h in 0,1x SSC bei 60° - 70° C
- 3 Waschschrte: je 10 min in 0,5x SSC bei Raumtemperatur

Entwässern:

- je 3 min in 50 %, 70 %, 95 %, 100 % Ethanol
- 5 min lufttrocknen
- 30 min vakuumtrocknen

Die getrockneten Objektträger wurden auf Karton aufgeklebt und ein Film (Kodak BioMax MR) aufgelegt. Nach 6 bis 20 Tagen Exposition bei 4° C wurde der Film entwickelt.

2.12.5. Filmemulsion:

Anhand des exponierten Films konnte an den Gehirnschnitten festgestellt werden, in welchen Hirnregionen die jeweiligen Kanäle exprimiert werden. Um die Expression auf zellulärer Ebene aufzuklären wurde eine Mikroautoradiographie durchgeführt. Dabei wurden die Objektträger mit den hybridisierten Gewebeschnitten mit einer Filmemulsion überzogen, acht Wochen lang exponiert und anschließend entwickelt. Am Ort der radioaktiven Gensonde bildeten sich in der Filmemulsion Silberkörner, die unter dem Lichtmikroskop untersucht werden konnten.

Die Filmemulsion Kodak NTB-2 (Kodak) wurde im 42° C Wasserbad aufgeschmolzen.

Die Objektträger wurden nacheinander in die Emulsion getaucht, langsam wieder rausgezogen und senkrecht in einen Metallständer gestellt. Nach dem Trocknen der Emulsion wurden die Objektträger in eine lichtdichte Box gesteckt, die viel Silikagel enthielt, und für etwa 8 Wochen bei 4° C lichtgeschützt gelagert. Die Filmemulsion ließ man erstarren und bewahrte sie - vor Licht und radioaktiver Strahlung geschützt - bei 4° C auf.

Entwicklung der Filmemulsion:

Die Entwicklerlösung (Kodak Developer D1-19) mußte mit Wasser 1:1 verdünnt werden. Anschließend wurden Entwickler und Fixiererlösung (Kodak Fixer) filtriert und in Glasgefäßen auf 15° C temperiert. In der Dunkelkammer wurden die Objektträger aus der Box geholt, in einen Glasständer gestellt und nacheinander in die Lösungen getaucht:

- 4 min in den Entwickler,
- 10 s in Wasser,
- 5 min in den Fixierer
- 5 min in Wasser.

Anschließend ließ man die Objektträger noch mindestens 30 min im Wasser stehen, bevor sie gefärbt wurden. Die Emulsionsschicht auf der Rückseite der OT wurde nach dem Trocknen mit einem Skalpell entfernt.

2.12.6. Histologische Färbungen

Zur besseren Darstellung der Morphologie wurden die Gehirnschnitte nach der Entwicklung der Filmemulsion leicht mit Toluidinblau eingefärbt, das sowohl Kerne als auch Zytoplasma blau darstellt. Nach der Färbung wurden die Gewebeschnitte mit DePeX-Harz (Serva) und Deckgläschen bedeckt.

Toluidinblaufärbung:

- OT für 10-30 min in die Toluidinblaulösung (Sigma, 10 g/l)
- 3x in H₂O tauchen
- in 30 % Ethanol nach Bedarf entfärben
- trocknen lassen
- 2x2 min in Xylol

2.12.7. Mikroskopie und Photographie

Die angefärbten Gewebeschnitte wurden mit einem Zeiss Axioskop im Hell- und Dunkel-feld untersucht. Photographien wurden von 50-, 100-, 200- und 400-fachen Vergrößerungen mit einer Contax 167 MT-Kamera aufgenommen.

2.13. Arbeit mit eukaryoten Zellen

Das Anlegen der Zellkulturen und die elektrophysiologischen Messungen wurden von Herrn Dr. X. Zong und Frau Dr. J. Stieber durchgeführt.

2.13.1. Eukaryote Zelllinie

Zur Expression in eukaryoten Zellen wurde die permanente Zelllinie HEK293 (ATCC^R Nr. CRL 1573, Graham et al. 1977) verwendet. Bei HEK293 Zellen handelt es sich um menschliche embryonale Nierenzellen (**human embryonic kidney cells = HEK**), die stabil mit dem humanen Adenovirus Typ 5 transfiziert sind.

2.13.2. Nährmedium

Die Zellen wurden in „Minimum essential Medium“ (MEM) kultiviert, das Aminosäuren, Vitamine, Glucose und Mineralien (Eagle 1959) enthält, so daß sich Säugerzellen gut darin vermehren.

Zusammensetzung von MEM:

H ₂ O (autoklaviert)	435 ml
7,4 % NaHCO ₃ (sterilfiltriert)	15 ml
200 mM L-Glutamin (sterilfiltriert)	5 ml
10x MEM (Biochrom)	50 ml
Fetales Kälberserum (FCS)	50 ml
Antibiotika (Penicillin/Streptomycin)	5 ml

Das komplette Kulturmedium war in dieser Form bei 4° C etwa 2 Wochen haltbar. Das Wachstum von Bakterien in den Zellkulturen wurde mit Penicillin G und Streptomycin (Biochrom, Endkonzentration von 100 U/ml Penicillin G bzw. 100 µg/ml Streptomycin) unterdrückt.

2.13.3. Kultur

Die Zellen wurden in Monolayern in Plastik-Kulturgefäßen aus Polysterol (Costar) bei 37° C und einem CO₂-Gehalt der Luft von 6 % (zur Konstanthaltung des pH-Wertes des Mediums) kultiviert.

Lösungen:

PBS:

NaCl	40 g
KCl	1,0 g
Na ₂ HPO ₄ *12 H ₂ O	14,5 g
KH ₂ PO ₄	1,2 g
H ₂ O	ad 5000 ml
auf pH 7,4 einstellen, autoklavieren.	

Trypsin/EDTA:

Stammlösung: 0,5 % Trypsin/0,2 % EDTA
mit PBS 1:10 verdünnen,
⇒ 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA
bei -20° C lagern

Einfriermedium:

MEM/FCS	90 %
DMSO	10 %

2.13.4. Transfektion von eukaryoten Zellen nach der Calciumphosphat-Methode

Zur Expression von HCN Kanalproteinen in HEK293 Zellen wurde die Calciumphosphat-Transfektionsmethode nach Graham und van der Eb (1973) angewandt. Der nach Ishiura et al. (1982) modifizierte Puffer führt zur Bildung eines Calciumphosphat-DNA-Präzipitates, das sich auf den Zellen absetzt und von ihnen durch Endocytose aufgenommen wird. Dabei wird die zirkuläre Fremd-DNA unabhängig vom Genom der Wirtszelle (episomal) transkribiert. Die eingeschleusten Gene sind allerdings nur vorübergehend aktiv und gehen im Verlauf weiterer Zellteilungen wieder verloren. Man spricht deshalb von „transienter Transfektion“. Die Transfektionseffizienz betrug durchschnittlich 30 %.

Verwendete Lösungen**BBS: (2x BES-buffered solution)**

50 mM N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure (BES, Sigma)
280 mM NaCl
1,5 mM Na₂HPO₄ pH 6,95
800 ml H₂O zugeben und pH 6,95 mit NaOH einstellen
ad 1000 ml H₂O
Sterilfiltrieren, aliquotieren und bei -20° C lagern.

CaCl₂-Lösung:

2,5 M wässrige, sterilfiltrierte CaCl₂-(Sigma) Lösung, Aufbewahrung bei -20° C.

Transfektionsmix für 3 x 175 cm² Kulturflaschen:

2,5 M CaCl ₂ -Lösung	500 µl
Plasmid-DNA	300 µg
H ₂ O	ad 10000 µl
BBS	5000 µl

Durchführung

- Aussähen von je etwa 3 x 10⁶ HEK293 Zellen in drei 175 cm² Kulturflaschen, Inkubation für 36 h bei 37° C und 6 % CO₂.
- Beträufeln der Zellen mit dem Transfektionsmix, Inkubation für 16 - 18 h bei 35° C und 3 % CO₂

- Zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS, Zugabe von je 30 ml frischem Medium, erneute Inkubation für 36 - 72 h bei 37° C und 6 % CO₂.

2.14. Elektrophysiologische Untersuchungen

Die Messungen erfolgten im Ganzzell-Modus nach der Patch-Clamp-Methode. Die transient transfizierten HEK293 Zellen wurden ausgesät und 2 bis 4 Tage später unter mikroskopischer Beobachtung elektrophysiologisch analysiert. Die Patchpipette wurde auf die Membranoberfläche der transfizierten Zellen aufgesetzt. Dadurch erhöhte sich der Pipettenwiderstand bis in den Gigaohmbereich (Gigaseal). Durch einen kurzen Sog wurde das von der Pipette bedeckte Membranstück aufgebrochen, so daß das Innere der Pipette mit dem Zellinneren in Verbindung stand. Diese Methode erlaubte die Messung des Stromes der mHCN1-Kanäle, die sich auf der gesamten Zelloberfläche befanden („Ganzzell-Modus“). Die Ableitung erfolgte mit Hilfe der Elektrode der Patchpipette, die mit einem Verstärker (EPC-7) gekoppelt war. Die Daten wurden mit 10 kHz digitalisiert, bei 1 kHz gefiltert und mit pCLAMP- (Axon Instruments) und Origin4.1-Software (Microcal Inc.) ausgewertet. Leckströme und kapazitative Ströme wurden in Kontrollversuchen bestimmt und von den Meßwerten abgezogen. Die Messungen wurden alle bei Raumtemperatur durchgeführt.

Mittelwerte von 2 Gruppen wurden mit Hilfe des Student t-Tests verglichen. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Extrazelluläre Lösung (Badlösung):

NaCl	110 mM
CaCl ₂	1,8 mM
KCl	30 mM
MgCl ₂	0,5 mM
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulphonsäure) 5 mM mit NaOH pH von 7,4 eingestellt.	

Intrazelluläre Lösung (Lösung in der Pipette):

KCl	130 mM
NaCl	10 mM
MgCl ₂	0,5 mM
EGTA (Ethylenbis(oxonitrilo)tetraacetat)	1 mM
HEPES	5 mM
mit KOH pH von 7,4 eingestellt.	

3. Ergebnisse

3.1. Klonierung der cDNA von mHCN1 aus dem Gehirn der Maus

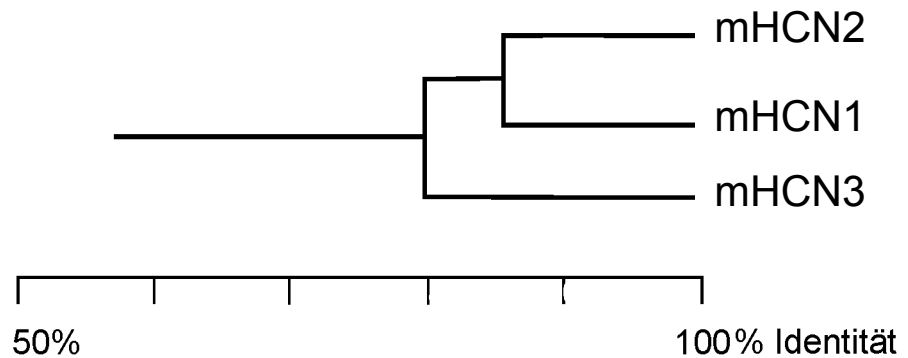
Im Rahmen von Voruntersuchungen zu der vorgelegten Arbeit wurde von der Arbeitsgruppe die „expressed sequence tag“ (EST) Datenbank nach Sequenzen abgesucht, die eine Homologie zu einer bekannten Zyklonukleotidbindungstasche (CNBD) aufweisen. Ziel war dabei die Identifizierung von neuen, direkt von cAMP/cGMP regulierten Proteinen. Als Suchsequenz diente dabei die CNBD von CNG3 (Biel et al. 1994). CNG-Kanäle werden direkt durch Bindung zyklischer Nukleotide an die CNBD geöffnet. Bei ESTs handelt es sich um DNA-Sequenzen mit einer Länge von 300 - 500 bp, die durch automatisches Ansequenzieren einer Vielzahl von Klonen gewonnen werden (Adams et al. 1991). Es wurde eine EST-Sequenz mit ca. 40 % Homologie zur CNBD von CNG3 gefunden. (Genbank-Zugangsnummer: MMA23393). Mit dieser EST-Sequenz wurde eine cDNA- Bibliothek (10^6 Klone) aus Mausgehirn abgesucht. Von den insgesamt 120 positiven Klonen wurden zufällig 36 ausgesucht. Durch Restriktionsanalyse konnten diese in drei Klassen eingeteilt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nun zwei Klone aus einer der drei Klassen vollständig sequenziert.

Bei beiden Klonen handelt es sich um sog. „full-length“ Klone mit durchgehendem Leserahmen, einem Start- und einem Stop- Codon. Dem Startcodon geht eine Ribosomenbindungssequenz (Kozak 1991) voraus, das Stopcodon wird von einem Polyadenylierungssignal gefolgt. Der offene Leserahmen kodiert für ein Protein aus 910 Aminosäuren und einem berechneten Molekulargewicht von 102,3 kDa, das zunächst als HAC2 und später als mHCN1 (murine hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated cation channel) bezeichnet wurde.

Gleichzeitig wurden von unserer Arbeitsgruppe die anderen beiden Klassen sequenziert und festgestellt, daß die drei neuentdeckten Proteine eine eigene, bisher unbekannte Ionenkanalfamilie bilden. Die Mitglieder dieser Familie wurden zuerst als HAC, dann als HCN-Kanäle bezeichnet. (Ludwig et. al. 1998). (Zur Nomenklatur Hyperpolarisations-aktivierter Kationenkanäle s. Anhang 6.1.). Sequenzvergleiche ergaben, daß mHCN1 näher mit mHCN2 (86 % Homologie) als mit mHCN3 (83 %) verwandt ist (s. Abb. 3.1.).

Abb. 3.1.

Phylogenetischer Stammbaum von mHCN1 - mHCN3, berechnet durch Vergleich der Region von Anfang S1 bis Ende der CNBD.



Aufgrund seiner Primärstruktur und einer Hydrophobizitätsanalyse (Kyte und Doolittle 1982) kann mHCN1 in die Superfamilie spannungsabhängiger Kationenkanäle eingeordnet werden. Wie die anderen Mitglieder dieser Familie besitzt er sechs Transmembransegmente (S1-S6).

Das S4 Segment enthält den putativen Spannungssensor, der sich von den Spannungssensoren bisher bekannter Kationenkanäle unterscheidet. Bei anderen Kanälen enthält der Spannungssensor fünf bis sieben positiv geladenen Aminosäuren, die jeweils im Abstand von drei Aminosäuren angeordnet sind. Der Spannungssensor von mHCN1 hat folgende Primärstruktur: KTARALRIVRFTKILSLRLLRLSRLRYIH (positiv geladene AS sind unterstrichen). Er verfügt insgesamt also über zehn positiv geladene Aminosäuren, die in zwei Blöcken zu je fünf AS angeordnet sind. Innerhalb eines jeden Blockes trägt jede dritte AS positive Ladung. Zwischen den beiden Blöcken ist jedoch ein Abstand von fünf Aminosäuren. Das Dreieraster „überspringt“ sozusagen eine Stelle. Statt einer kationischen Aminosäure befindet sich hier ein ungeladenes Serin (S253).

Wie bei K^+ -Kanälen befindet sich auch bei mHCN1 die ionenleitende Porenregion zwischen den Transmembransegmenten S5 und S6. mHCN1 hat mit K^+ -Kanälen das Aminosäuremotiv „GYG“ in der Pore gemeinsam. Es war gezeigt worden, daß diese bei allen bisher bekannten K^+ -Kanälen vorkommende „Signatursequenz“ (Heginbotham et al. 1994) wesentlich an der Ausbildung der Kaliumselektivität beteiligt ist (Doyle et al. 1998).

Im intrazellulären Carboxyterminus verfügt mHCN1 über eine Zyklonukleotid-Bindungsdomäne (CNBD). Ähnliche CNBDs waren bisher u.a. bei CNG-Kanälen (Homologie zur CNBD von mHCN1 40 %), der Proteinkinase A (24 %) und dem katabolen Genaktivator Protein CAP aus E.coli (27 %) entdeckt worden (s. Abb. 3.4.). Spezifische Aminosäuren, für die beim CAP gezeigt worden war, daß sie dem gebundenen cAMP-Molekül eng benachbart liegen (Weber und Steitz, 1987), sind bei mHCN1 konserviert. Außerdem wurden sechs Aminosäuren identifiziert, die in allen funktionellen CNBDs strikt

konserviert sind (Shabb und Corbin 1992, Tibbs et al. 1998). Auch mHCN1 weist diese sechs Aminosäuren auf. Ein Aspartat (D628 bei CNG3), das in CNG-Kanälen an der Selektivität von cGMP gegenüber cAMP beteiligt ist, ist bei mHCN1 durch die neutrale Aminosäure Isoleucin (I583) ersetzt.

Eine weitere Besonderheit in der Sequenz von mHCN1 ist die Polyglutaminregion (AS 738 bis 775). Ähnliche Sequenzabschnitte wurden auch in anderen Genen identifiziert. Bisher ist jedoch die Funktion solcher Polyglutaminabschnitte vollkommen unbekannt (referiert von Chastain und Sinden 1998).

```

1      MEGGGKPNASNSRDDGNSVFPKAPATGPVAADKRLGTPPGGAAGKEHGNSVCFKVDG
61     GGGEEPAGSFEDAEGPRRQYGFMRQFTSMLQPGVNKFSLRMFGSQKAVEKEQERVKTAG
121    FWIIHPYSDFRFYWDLIMLIMMVGNLVIIIPVGITFFTEQTTTPWIIIFNVASDTVFLDLLI
           S1                                     S2
181    MNFRTGTVNEDSSEIILDPKVIKMNLYKSWFVVDFISSIPVDYIFLIVEKGMDSEVYKTA
           S3
241    RALRIVRFTKILSLRLRLRLSRLIRYIHQWEEIFHMTYDLASAVVRIFNLIGMMLLLCHW
           S4                                     S5
301    DGCLQFLVPLLQDFPPDCWVSLNEMVNDSWGKQYSYALFKAMSHMLCIGYGAQAPVSMDS
           Pore
361    LWITMLSMIVGATCYAMFVGHATALIQSLDSSRRQYQEKYKQVEQYMSFHKLPAQMRQKI
           S6
421    HDYYEHRYQGKIFDEENILSELNDPLREEIVNFNCRKLVATMPLFANADPNFVTAMLSKL
481    RFEVFQPGDYIIREGAVGKKMYFIQHGVAGVITKSSKEMKLTDGSYFGEICLLTKGRRTA
           CNBD
541    SVRADTYCRLYSLSVDNFNEVLEEYPMRRRAFETVAIDRLDRIGKNSILLQKFQKDLNT
601    GVFNNEQENEILKQIVKHDREMVQAIPPINYPQMTALNCTSSSTTTPTSRMRTQSPVYTAT
661    SLSHSNLHSPSPSTQTPQPSAILSPCSYYTAVCSPPIQSPLATRTRFHYASPTASQLSLMQ
721    QPQQQLPQSQVQQTQTQTQOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOQPQTPG
           Polyglutaminregion
781    SSTPKNEVHKSTQALHNTNLTKEVRPLSASQPSLPHEVSTLISRPHPTVGESLASIPQPV
841    AAVHSTGLQAGSRSTVPQRVTLFRQMSSGAIPPNRGVPPAPPPPAAVQRESPSVLNTDPD
901    AEKPRFASNL

```

Abb. 3.2.

Primärstruktur von mHCN1. Die Transmembransegmente S1-S6, die Porenhelix, die Zyklonukleotidbindungsdomäne (CNBD) und die Polyglutaminregion sind unterstrichen. Die basischen Aminosäuren im Spannungssensor sind mit + markiert. Das GYG-Motiv in der Porenregion ist fett gedruckt.

3.2. Elektrophysiologische Charakterisierung von mHCN1

Die elektrophysiologische Analyse von mHCN1 wurde von Herrn Dr. X. Zong und Frau Dr. J. Stieber durchgeführt. Dazu wurden HEK293-Zellen transient mit dem Expressionsvektor für mHCN1, nämlich pmHCN1/cDNA3 transfiziert. Danach wurden Patch-Clamp-Messungen (Hamill et al. 1981) im sogenannten Ganzzellmodus durchgeführt.

3.2.1. Aktivierung durch Hyperpolarisation

Abb. 3.5.a zeigt das Spannungsprotokoll. Ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV wurde ein 0,5 s langer Vorpuls (im Bereich zwischen -30 mV bis -140 mV) angelegt, bevor auf ein Potential von -140 mV „gesprungen“ wurde. Gleichzeitig wurde der Strom über der Membran aufgezeichnet (Abb. 3.5.b). Dieser Vorgang wurde nun mehrmals wiederholt, wobei das Vorpuls-Potential in 10 mV Schritten von -30 mV auf -140 mV gesteigert wurde.

An dem zunehmenden Einwärtsstrom erkennt man, wie bei hyperpolarisierenden Vorpuls-Potentialen negativer als -60 mV nach und nach immer mehr Kanäle aktivieren, bis ein steady-state erreicht ist. Unmittelbar nach dem Spannungssprung auf -140 mV (Pfeil!) befinden sich die Kanäle noch in dem durch den jeweiligen Vorpuls bestimmten Aktivierungszustand. Die anliegende Spannung (und damit die den Strom treibende Kraft) beträgt zu diesem Zeitpunkt jedoch konstant -140 mV. Der zu diesem Zeitpunkt gemessene Strom stellt also ein direktes Maß für den Aktivierungszustand der Kanäle in Abhängigkeit vom Vorpulspotential dar. (s. Abb. 3.5.).

Die Aktivierungskennlinie von mHCN1 hat einen sigmoidalen Verlauf (Abb. 3.5.c, schwarze Linie). Die Aktivierung beginnt etwa bei -50 mV, der halbmaximale Strom wird bei -77 mV gemessen, bei etwa -110 mV sind alle Kanäle geöffnet.

In HEK293-Zellen, die mit dem pcDNA3 Leervektor transfiziert worden waren, konnten keinerlei hyperpolarisationsaktivierte Ströme gemessen werden. Somit ist gezeigt, daß mHCN1 die entscheidende Eigenschaft von I_h -Kanälen besitzt, nämlich die Aktivierung durch hyperpolarisierende Membranpotentiale.

Man beachte, daß der Einwärtsstrom während des 0,5 s langen Vorpulses nicht abnimmt, somit kein Anhalt für eine Inaktivierung des Kanals besteht.

Die Aktivierungsgeschwindigkeit von mHCN1 steigt mit zunehmender Hyperpolarisation an. Der zeitliche Verlauf der Aktivierung kann durch die Summe zweier Exponentialfunktionen

beschrieben werden. Bei einem Potential von -140 mV betragen die Zeitkonstanten 30 ms und 171 ms.

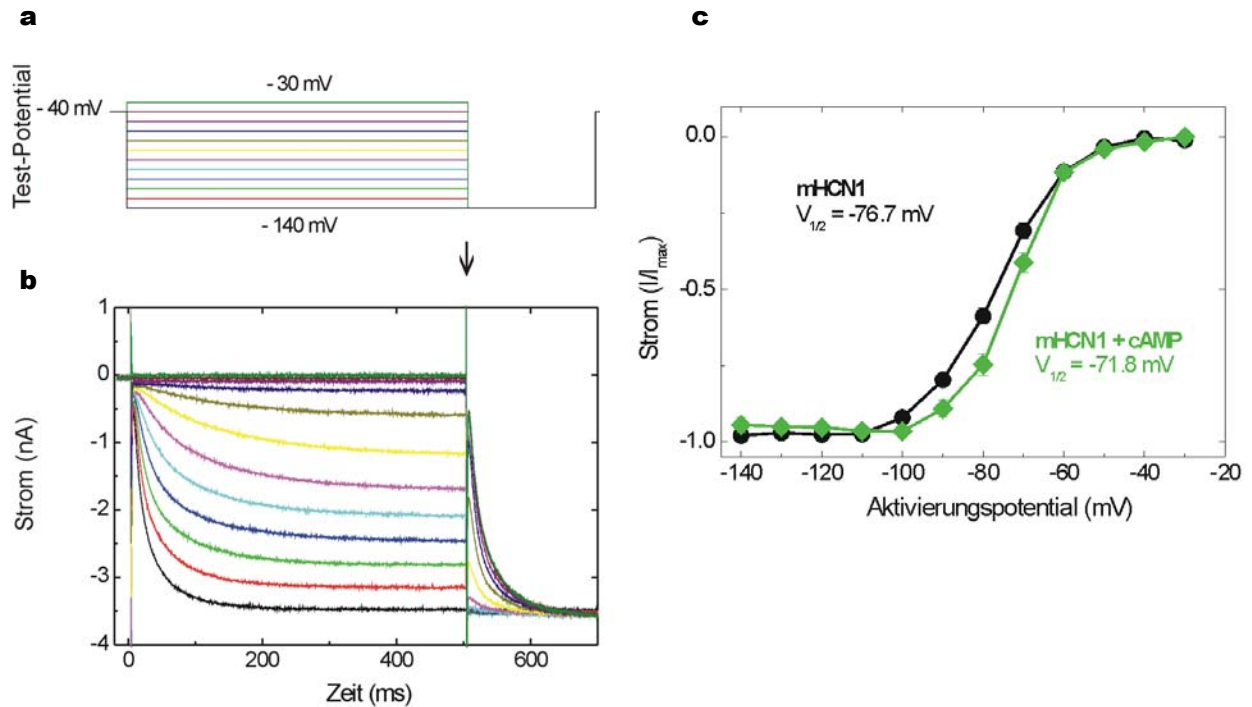


Abb. 3.5.

Aktivierung von mHCN1 durch Hyperpolarisation, gemessen nach heterologer Expression des Kanals in HEK293-Zellen. Messung im Ganzzellmodus bei Raumtemperatur.

a) Spannungsprotokoll **b)** abgeleitete Stromspuren. **c)** Aktivierungskurve. Aufgetragen ist die Stromamplitude, die unmittelbar nach dem Sprung auf -140 mV gemessen wurde (s. Pfeil in Abb. 3.5.b) gegenüber dem Vorpulspotential. Schwarze Linie (Kreise): ohne cAMP; grüne Linie (Rauten): in Anwesenheit von $100 \mu\text{M}$ cAMP.

3.2.2. Modulation durch zyklische Nukleotide

Die Primärstruktur von mHCN1 weist eine putative Bindungstasche für zyklische Nukleotide auf. Native I_h -Kanäle werden direkt durch cAMP stimuliert (McCormick und Pape 1990 (b), Di Francesco und Tortora 1991, Pape und Mager 1992). Daher lag es nahe zu untersuchen, ob der funktionell exprimierte mHCN1-Kanal ebenfalls durch zyklische Nukleotide moduliert wird.

Tatsächlich zeigte sich am heterolog exprimierten mHCN1-Kanal eine geringe, aber signifikante Verschiebung der Aktivierungskurve durch $100 \mu\text{M}$ cAMP um etwa 5 mV zu positiveren Potentialen hin (s. Abb. 3.5.c).

Damit unterscheidet sich mHCN1 wesentlich von anderen funktionell exprimierten HCN-Kanälen, bei denen eine sehr viel stärkere Verschiebung der Aktivierungskurve in

Anwesenheit von zyklischen Nukleotiden gemessen wurde (mHCN2: +13 mV, hHCN4: +15 mV; Ludwig et al. 1998 und 1999).

3.2.3. Ionenleitfähigkeit

Zur Ermittlung der Ionenselektivität wurde die Strom-Spannungs-Relation des voll aktivierten Kanals bestimmt (nicht gezeigt). Aus dem Umkehrpotential und den Konzentrationen der beteiligten Ionen läßt sich die Leitfähigkeit für verschiedene Ionen berechnen.

Es stellte sich heraus, daß mHCN1 sowohl K^+ als auch Na^+ leitet, und zwar im Verhältnis von etwa 4:1. Dies ist in sehr guter Übereinstimmung mit Messungen an nativen I_h -Kanälen (DiFrancesco 1993, Ho et al. 1994, Pape 1996), wobei P_{Na}/P_K -Werte zwischen 0,2 – 0,4 errechnet worden waren.

3.3. Untersuchung der Gewebsexpression von mHCN1-3

3.3.1. Northern Blot

Zunächst wurde mit Northern-Blot-Analyse die Organverteilung von mHCN1-3 untersucht. Dazu wurde ein Northern-Blot mit poly (A⁺)-RNA aus verschiedenen Geweben der Maus nacheinander mit radioaktiv markierten Sonden gegen mHCN1, mHCN2 und mHCN3 hybridisiert (Abb. 3.6. und 3.7.).

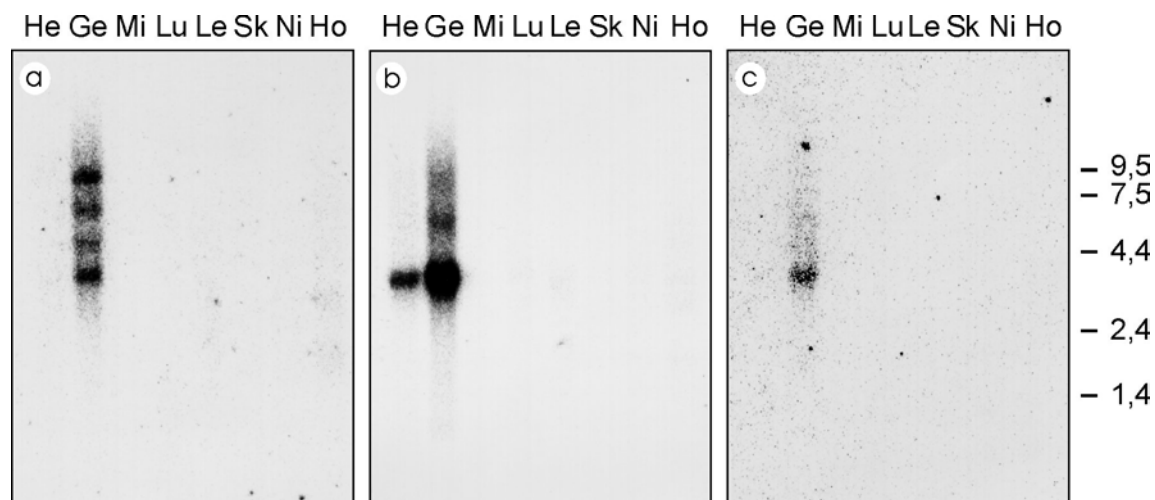


Abb. 3.6.

Northern Blot Analyse von mRNA aus Herz (He), Gehirn (Ge), Milz (Mi), Lunge (Lu), Leber (Le), Skelettmuskel (Sk), Niere (Ni), Hoden (Ho) der Maus. Rechts ist der Längenstandard (in kb) eingezeichnet. Der Blot wurde hybridisiert mit Sonden gegen mHCN1 (a), mHCN2 (b) und mHCN3 (c). Die Expositionszeit auf einer Phosphorimagerplatte betrug bei a und b 6 h, bei c 36 h.

Die Sonde gegen mHCN1 hybridisierte ausschließlich mit mRNA aus dem Gehirn. Dabei ergaben sich vier Banden der Größe 3,4 kb, 4,6 kb, 6,2 kb und 8,2 kb. Das 3,4 kb Transkript stimmt in der Länge gut mit der klonierten cDNA (3263 bp) überein. Bei den anderen Banden handelt es sich wahrscheinlich um Varianten der full-length mHCN1 mRNA mit einer verlängerten 3' -nichttranslatierten Region.

Als einziger der drei Kanäle wurde mHCN2 in zwei Organen, nämlich im Gehirn und im Herzen gefunden. Bei den in beiden Organen gleichlangen Transkripten von 3,4 kb besteht eine sehr gute Übereinstimmung mit der Länge der isolierten cDNA (3102 bp). Das Signal im Gehirn ist etwa 5-mal stärker als das im Herz.

Die Hybridisierung mit mHCN3 ergab nur ein sehr schwaches Signal im Gehirn. Die Länge von 3,4 kb stimmte wieder sehr gut mit der klonierten cDNA (3268 bp) überein. mHCN3 wird in wesentlich geringerem Umfang als mHCN1 und mHCN2 im Gehirn gebildet. Die Intensität des Expressionssignales ist um den Faktor 50 (250) niedriger als bei mHCN1 (mHCN2). Im Herzen konnten keine mHCN3-Transkripte nachgewiesen werden.

In Milz, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Hoden konnte mit dem Northern-Blot keiner der drei Kanäle nachgewiesen werden.

3.3.2. *In situ* Hybridisierung

Als nächstes wurde mit der Methode der *In situ* Hybridisierung die unterschiedliche Verteilung der drei Kanäle in den verschiedenen Regionen des Gehirns bzw. im Herzen untersucht. Durch Beschichten der hybridisierten Schnitte mit Autoradiographieemulsion konnte die Expression auf zellulärer Ebene festgestellt werden.

Sonden

Die Lage der verwendeten Sonden ist in Abb. 3.7. dargestellt. Zur Kontrolle wurde die Hybridisierung jeweils mit zwei Sonden aus unterschiedlichen Regionen eines Kanals durchgeführt. Die beiden Sonden führten durchgehend zu übereinstimmenden Ergebnissen. Um Kreuzhybridisierungen zwischen den verschiedenen Kanälen zu vermeiden, wurden für die Sonden Bereiche mit möglichst geringer Homologie am 5'- bzw. 3'-terminalen Ende ausgewählt. Die als Negativkontrolle durchgeführten Hybridisierungen mit den korrespondierenden Sense-Proben (s. 2.12.) ergaben keine Signale.

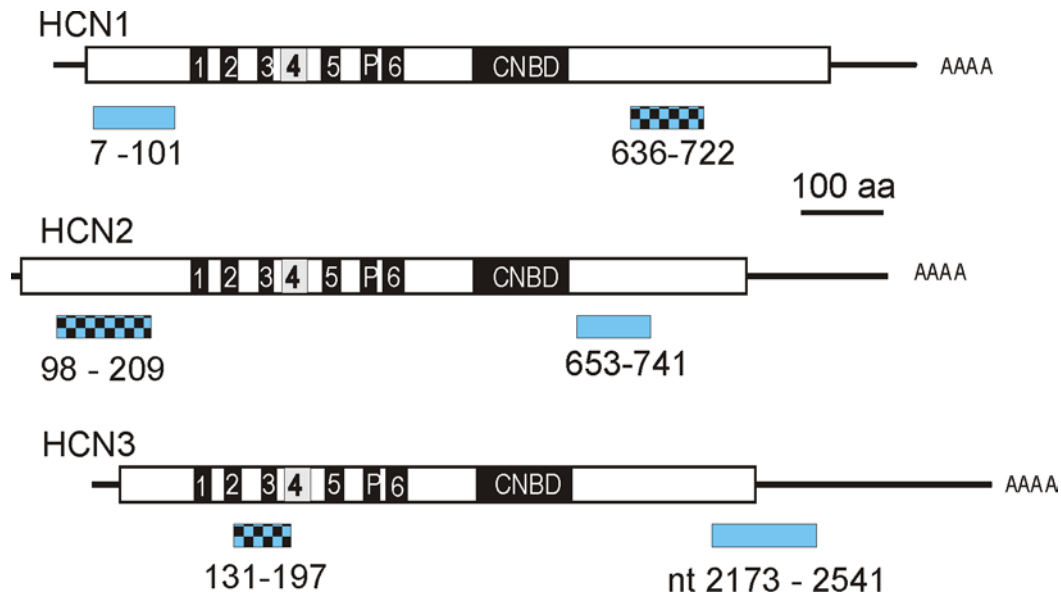


Abb. 3.7.

Lage der Sonden zur *In situ*-Hybridisierung. Die kariert markierten Sonden wurden sowohl zur *In situ*-Hybridisierung als auch zur Northern-Blot-Analyse verwendet. Die Positionsangaben beziehen sich auf die korrespondierenden Aminosäureabschnitte, mit Ausnahme der C-terminalen Sonde von mHCN3, die teilweise im untranslatierten Bereich liegt und deshalb auf Nukleotidebene angegeben ist. Balken: translaterter Bereich Striche: untranslatierter Bereich

***In situ* Hybridisierung im Herzen**

Abb. 3.8.d zeigt das Ergebnis der *In situ*-Hybridisierung von mHCN2 im Herzen. Wie man sieht, wird der Kanal in der Arbeitsmuskulatur des Ventrikels exprimiert. Dies ist in Übereinstimmung mit elektrophysiologischen Messungen an nativen Kardiomyozyten, bei denen I_f in der Arbeitsmuskulatur nachgewiesen wurde (Yu et al. 1993, Hoppe et al. 1998). Eine gezielte Präparation des Reizleitungssystems bzw. der Erregungsbildungszentren wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht unternommen.

Hybridisierungsexperimente an Herzgewebe mit Sonden gegen mHCN1 ergaben kein Signal.

***In situ* Hybridisierung im Gehirn**

Die drei mHCN-Kanäle zeigen im Gehirn der Maus sehr unterschiedliche Expressionsmuster, die in Tab. 3.1. zusammengefaßt sind.

Expression von mHCN1

Die *In situ*-Hybridisierungsexperimente zeigten, daß mHCN1 im Gehirn der Maus nur in umschriebenen Regionen, nämlich dem Kleinhirn, dem Colliculus superior, dem Hippocampus, dem Cortex und dem Bulbus olfactorius exprimiert wird (Abb. 3.8.a).

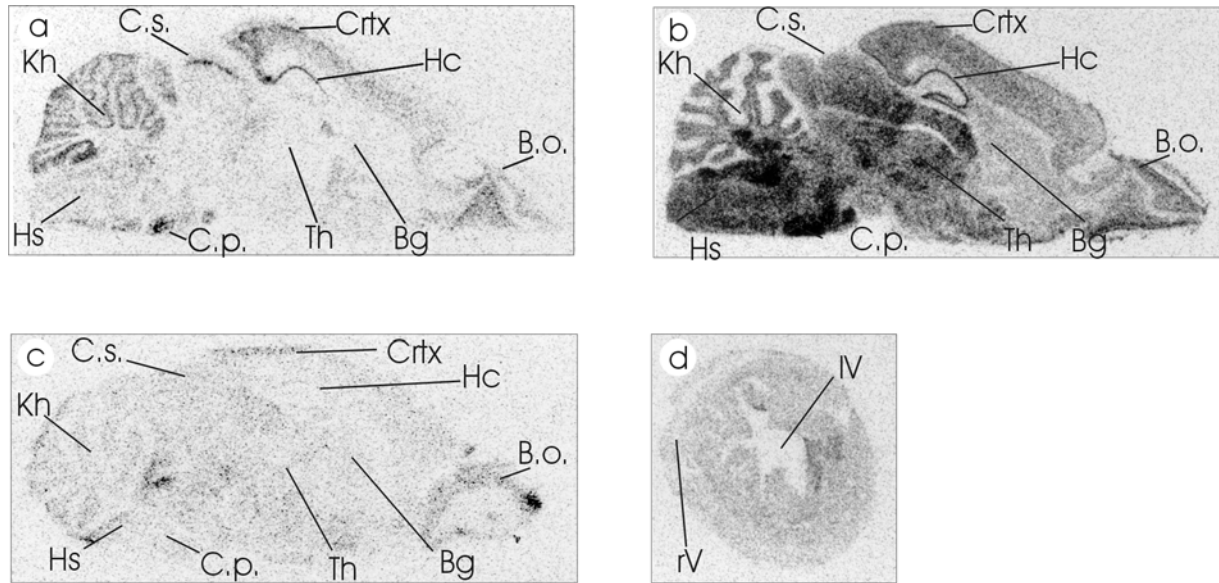


Abb. 3.8.

Filmautoradiogramme von *In situ*-Hybridisierungen. **a,b,c**) Sagittalschnitte durch das Mausgehirn, hybridisiert mit Sonden gegen mHCN1 (**a**), mHCN2 (**b**) und mHCN3 (**c**). B.o.: Bulbus olfactorius, Crtx.: Cortex cerebri, Th.: Thalamus, C.s.: Colliculus superior, Kh.: Kleinhirn, C.p.: Cortex piriformis, Hs.: Hirnstamm, Bg.: Basalganglien. **d**) Frontalschnitt durch die Ventrikel eines Mäuseherzens, hybridisiert mit einer Sonde gegen mHCN2. rV, IV: Lumen des rechten bzw. linken Ventrikels. Der rechte Ventrikel ist kollabiert.

Mikroskopische Untersuchung der mit Autoradiographie-Emulsion beschichteten Objektträger erlaubten eine weitere Eingrenzung der Expression.

So werden im Kleinhirn vor allem die Korb- und Sternzellen der Molekularschicht sowie die Purkinjezellen markiert. Im Stratum granulare fand sich nur ein geringes Signal (Abb. 3.9.a).

Ein sehr deutliches Signal fand sich dagegen im Colliculus superior, einer Umschaltstelle in der Sehbahn, mit dem stärksten Signal in den mittleren und unteren Anteilen.

Im Hippocampus wurden vor allem die Pyramidenzellen der Region CA1 markiert (Abb. 3.9.c). Das Signal in CA2 und CA3 war deutlich schwächer. Außerdem fanden sich einige Signale im Stratum oriens und im Stratum radiatum. Im Gyrus dentatus (einem Teil des Hippocampus) wurde ausschließlich in der polymorphen Schicht mRNA detektiert, in der granulären Schicht fand sich dagegen kein Signal (Abb. 3.9.c). Der Hippocampus spielt eine wichtige Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen.

Im Cortex wurden insbesondere die kortikalen Schichten II und V markiert (Abb. 3.9.e). Auffällig ist auch das deutliche Signal im Cortex piriformis, einem Teil des Neocortex (Abb.3.8.a).

Expression von mHCN2

mHCN2 zeigt ein vollkommen anderes Expressionsmuster als mHCN1. Im Gegensatz zu diesem kommt er in beinahe allen Hirnregionen in relativ großem Ausmaß vor. Die stärksten Signale zeigen sich im Kleinhirn, im Hippocampus, im Cortex, im Thalamus und im Bulbus olfactorius (Abb. 3.8.b, 3.9.b).

Ebenso wie mHCN1 wird mHCN2 in den Purkinjezellen des Kleinhirns exprimiert, nicht jedoch in der Molekularzellschicht. Dafür zeigt sich ein deutliches Signal in der Granularzellschicht (Abb. 3.9.b).

Im Hippocampus werden die Pyramidenzellen aller drei Regionen CA1-3 gleichmäßig markiert. Ebenso finden sich Signale in den Strata oriens und radiatum sowie in der polymorphen und der granulären Schicht des Gyrus dentatus (Abb. 3.9.d).

Im Gegensatz zu mHCN1 markiert die Sonde gegen mHCN2 die Hirnrinde gleichmäßig in ihrer gesamten Dicke (Abb. 3.9.f).

Eine starke Expression fand sich auch im Thalamus. Hier findet sich das stärkste Signal in den thalamocorticalen Umschaltkernen wie den venteroposterioren und den posterioren Kerngebieten (nicht gezeigt).

Expression von mHCN3

Die Hybridisierung mit der mHCN3-Sonde ergab im gesamten Gehirn nur ein sehr schwaches Signal. Lediglich im Bulbus olfactorius, der ersten Umschaltstelle der Riechbahn, zeigte sich eine eindeutige Expression (Abb. 3.8.c)

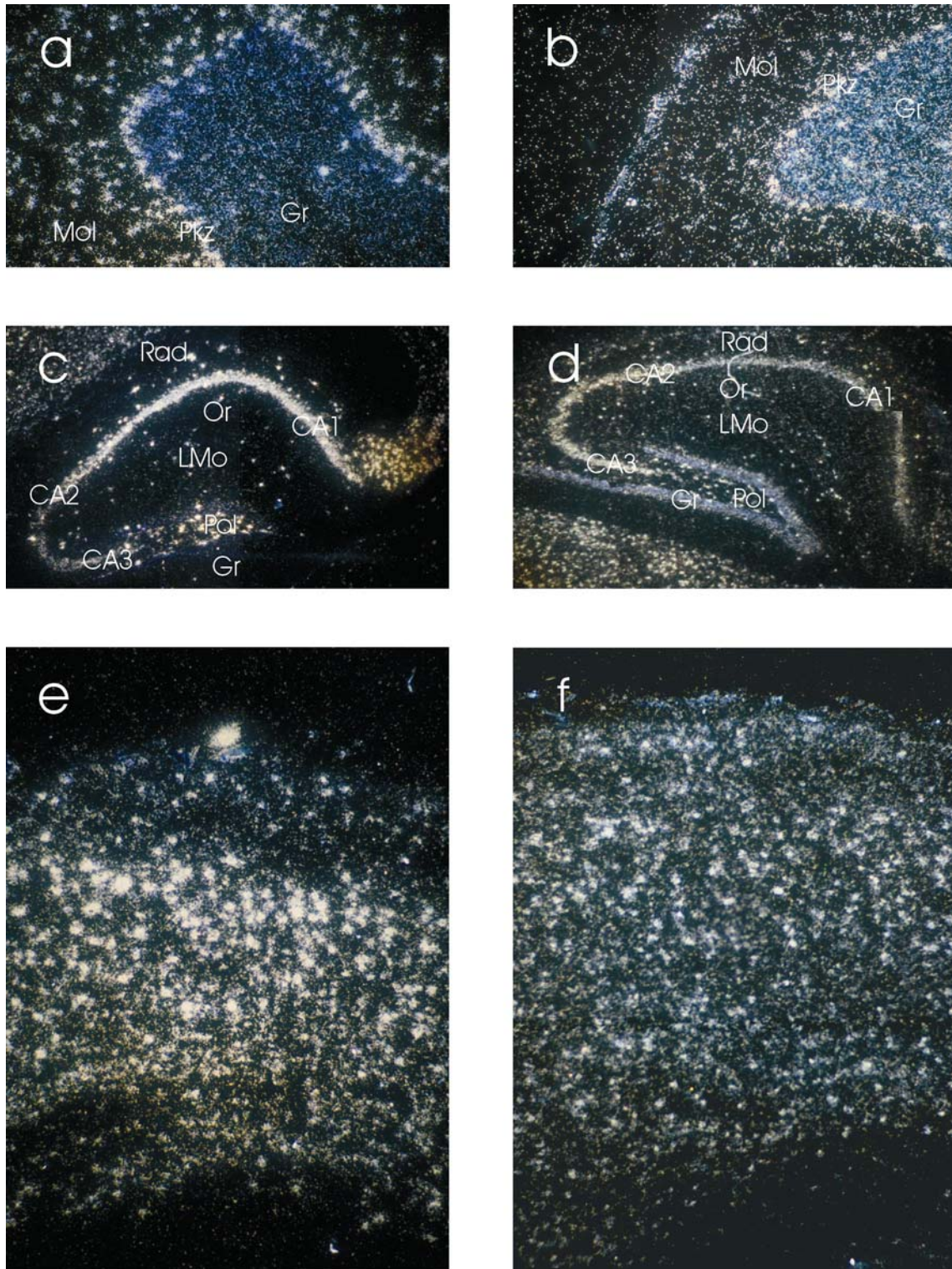


Abb. 3.9.

Mikroskopische Dunkelfeldaufnahmen von repräsentativen Emulsionsautoradiographien. **a,c,e** zeigen die Expression von mHCN1, **b,d,f** von mHCN2. Es handelt sich jeweils um Sagittalschnitte durch das Mausgehirn.

a, b) Kleinhirn; Mol.: Stratum moleculare, Gr.: Stratum granulosum, Pkz.: Purkinjezellen

c, d) Hippocampus: Die Regionen CA1 bis CA3 sind markiert. Or.: Stratum oriens, Rad.: Stratum radiatum, Pol (Gr): polymorphe (granuläre) Schicht des Gyrus dentatus, Lmo.: Stratum lacunosum moleculare.

e, f) Großhirnrinde

Gehirnregion	mHCN1	mHCN2	mHCN3
Cortex cerebri			
Neocortex	+++	++	+/-
Cortex piriformis	++	++	+/-
Cerebellum			
Purkinjezellen	++	+	+/-
Stratum granulare	+	++	+/-
Stratum moleculare	+++	-	+/-
Hippocampus			
Pyramidenneurone in Region:			
CA1	+++	++	+/-
CA2	+	++	+/-
CA3	++	++	+/-
Polymorphe Schicht Gyrus dentatus	++	+	+/-
Granuläre Schicht Gyrus dentatus	-	+	+/-
Thalamus	+/-	+++	+/-
Hypothalamus	+/-	+	+/-
Colliculus superior	+++	++	+/-
Colliculus inferior	+	++	+/-
Putamen	-	++	+/-
Amygdala	+/-	++	+/-
Bulbus olfactorius	++	++	+
Hirnstamm	-	+++	+/-

Tab. 3.1.

Übersicht über die Expression von mHCN1-3 im Gehirn, ermittelt durch semiquantitative Auswertung von Film- und Emulsionsautoradiographien.

+++ starke; ++ mittlere; + geringe; - keine Expression;

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die cDNA eines bis dahin unbekanntes Gens charakterisiert, das nachfolgend als mHCN1 bezeichnet wurde. Durch heterologe Expression konnte nachgewiesen werden, daß mHCN1 tatsächlich für einen Ionenkanal codiert, der alle Eigenschaften von I_h aufweist. In einem weiteren Schritt wurde mit Northern-Blot und *In situ*-Hybridisierung die Gewebsverteilung aller drei zu jenem Zeitpunkt bekannten mHCN-Kanäle untersucht.

In den letzten Jahren hat sich das Wissen über HCN-Kanäle lawinenartig vergrößert. Hyperpolarisationsaktivierte Kationenkanäle wurden fast gleichzeitig durch drei unabhängige Arbeitsgruppen (Gauss et al. 1998, Ludwig et al. 1998, Santoro et al. 1998) kloniert. Um die Verwendung unterschiedlicher Nomenklaturen zu vermeiden, einigte man sich auf die einheitliche HCN-Nomenklatur (s. Anhang 6.1.). Inzwischen wurde ein viertes Mitglied der neuen Kanalfamilie entdeckt (HCN4) (Ludwig et al. 1999, Ishii et al. 1999, Seifert et al. 1999). Zwei der HCN-Kanäle sind mittlerweile auch aus dem menschlichen Herzen kloniert worden (hHCN2+4) (Ludwig et al. 1999, Seifert et al. 1999). Zu den *In situ*-Hybridisierungs-Untersuchungen liegen inzwischen weitere Ergebnisse vor, insbesondere zur Expression im Reizleitungssystem des Herzens und in weiterem Nervengewebe (Retina, Spinalganglion) (Moosmang et al. 1999 und 2001, Santoro et al. 2000). Mittlerweile liegen zu allen HCN-Kanälen eingehende elektrophysiologische Untersuchungen vor (Ludwig et al. 1998 und 1999, Santoro et al. 1998 und 2000, Ishii et al. 1999, Seifert et al. 1999, Moosmang et al. 2001).

Die Ergebnisse wurden in mehreren Übersichtsartikeln zusammengefaßt (Clapham 1998, Santoro und Tibbs 1999, Biel et al. 1999, Ludwig et al. 1999, Gauss und Seifert 2000, Accili et al. 2002, Chen et al. 2002).

4.1. Struktur von mHCN1

Das erste Hauptziel dieser Arbeit war die Charakterisierung einer für I_h -Kanäle codierenden cDNA. Diese wurde als mHCN1 bezeichnet.

HCN1 bildet zusammen mit HCN2-4 eine neue Ionenkanalfamilie (Ludwig et al. 1999, Biel et al. 1999, Santoro et Tibbs 1999). Die Homologie innerhalb der HCN-Familie beträgt

zwischen 60-70 % , im Kernbereich der Kanäle (S1-S6 plus CNBD) sogar 80-90 % (Biel et al. 1999, Ludwig et al. 1999, Santoro und Tibbs 1999). Hydrophobizitätsanalysen sowie Sequenzvergleiche zeigen, daß die HCN-Kanäle den gleichen Grundbauplan wie spannungsabhängige Kationenkanäle haben. Wie die anderen Mitglieder der K^+ -Kanal-Superfamilie verfügen sie über sechs Transmembransegmente, die Termini liegen im Zytosol (Chen et al. 2000). Die Pore wird durch die Schleife zwischen dem fünften und sechsten Transmembransegment gebildet (Mac Kinnon et al. 1989, Goulding et al. 1993). Das Segment S4 stellt den putativen Spannungssensor dar (Chen et al. 2000, Vaca et al. 2000). Im Carboxyterminus befindet sich wie bei CNG-Kanälen eine Zyklonukleotidbindungstasche (Wainger et al. 2001). Weiter Stromabwärts weist mHCN1 als Besonderheit eine Folge von 37 Glutaminresten (AS 738 – 775) auf, die in den anderen mHCN-Kanälen nicht vorhanden ist. Ähnliche Polyglutaminserien sind schon von anderen Proteinen bekannt, die Funktion dieser Abschnitte ist jedoch vollkommen unklar. Mindestens 12 hereditäre neurodegenerative Erkrankungen, wie Chorea Huntington, das fragile-X-syndrome u.a. beruhen allerdings auf einer pathologischen Verlängerung solcher Glutaminrepetitionen in bestimmten Genen (Chastain und Sinden 1998). Es wird sogar spekuliert, daß auch neuropsychiatrische Krankheiten wie Schizophrenie oder Zykllothymie durch Expansion von Tripletwiederholungen in bisher noch nicht identifizierten Genen verursacht werden könnten (Li und el-Mallakh 1997). Daher wäre es interessant zu untersuchen, ob bei Patienten mit hereditären neurologischen Erkrankungen möglicherweise eine Expansion der Polyglutaminregion von HCN1 vorliegt.

4.2. Ionenselektivität

Wie der native I_h -Kanal (Edman et al. 1987, Hestrin 1987, Solomon und Nerbonne 1993(b)) leitet mHCN1 sowohl Kalium als auch Natrium im Verhältnis von etwa 4:1.

So überrascht es, daß die Pore von mHCN1 über die sogenannte Signatursequenz von K^+ -Kanälen, nämlich das GYG-Motiv verfügt (Heginbotham et al. 1994). Diese Aminosäurefolge Glycin-Tyrosin-Glycin gilt als entscheidender Bestandteil des Selektivitätsfilters bei K^+ -Kanälen, deren P_{Na}/P_K -Quotient in etwa 0,0001 beträgt (Doyle et al 1998). Da mHCN1 neben Kalium allerdings auch Natrium leitet, muß es noch weitere Faktoren geben, die bei K^+ -Kanälen in Kombination mit dem GYG-Motiv die volle Kaliumselektivität bedingen, und die bei mHCN1 nicht vorhanden sind.

Vor kurzem gelang es, die Kristallstruktur einer K^+ -Kanal-Pore darzustellen, so daß der Mechanismus, der der Ionenselektivität zugrunde liegt, nun viel besser verstanden werden kann (Doyle et al 1998).

Bei tetrameren Kaliumkanälen bilden die C-O-Gruppen der Aminosäuren aus den Signatursequenzen einen Ring, der genau auf den Durchmesser eines K^+ -Ions abgestimmt ist und die engste Stelle der Pore darstellt. Um durch diesen Ring zu schlüpfen, muß das K^+ -Ion seine Hydrathülle abstreifen. Dies ist nur möglich, weil die Carbonylgruppen aus der Signatursequenz H_2O -Moleküle aus der Hydrathülle des K^+ -Ions substituieren und so den Energieverlust ausgleichen.

Einige aromatische Aminosäuren, die in der Porenhelix konserviert sind, bilden zusammen mit dem Tyrosin der Signatursequenz eine starre Manschette, die diesen Selektivitätsfilter genau im richtigen Durchmesser offen hält. Das Natriumion ist etwas kleiner als das Kaliumion, so daß sich ein ungünstiges Energieverhältnis ergäbe, wenn die unbeweglichen C-O-Gruppen die Hydrathülle ersetzen sollten. Das Na^+ Ion kann seine Hydrathülle also nicht ablegen und paßt nicht durch die Pore.

mHCN1 verfügt zwar über das GYG-Motiv, dafür sind bei ihm aber andere Aminosäuren in der Porenregion ausgetauscht, die bei Kaliumkanälen konserviert sind, zum Beispiel die oben erwähnten aromatischen Aminosäuren. Ferner folgt bei den meisten K^+ -Kanälen auf das GYG-Motiv eine negativ geladene Aminosäure, während bei mHCN1 hier ein hydrophobes Alanin steht. Auch ein bei K^+ -Kanälen konserviertes Threonin zwei AS-Positionen vor dem GYG ist bei mHCN1 durch ein Cystein ersetzt.

Die gemischte Leitfähigkeit für Natrium wie für Kalium von mHCN1 könnte also dadurch begründet sein, daß die oben beschriebene Porenmanschette bei diesem Kanal etwas flexibler ist und somit die Ionenselektivität der Pore vermindert wird.

4.3. Modulation durch zyklische Nukleotide

Bei den elektrophysiologischen Messungen an heterolog exprimierten mHCN1-Kanälen zeigte sich, daß diese nur relativ wenig durch cAMP moduliert werden (s. 3.2.2.). Dies ist interessant, da mHCN1 ja über eine CNBD verfügt, die homolog ist zur CNBD von CNG-Kanälen, Proteinkinasen und dem CAP aus *E. coli*. In dem geringen Ansprechen auf cAMP unterscheidet sich mHCN1 wesentlich von allen anderen HCN-Kanälen, bei denen nach cAMP-Zugabe deutliche Verschiebungen der Aktivierungskennlinie um 10-15 mV zu

positiveren Potentialen beobachtet wurden (Ludwig et al. 1998 und 1999, Seifert 1999, Ishii 1999). Die CNBD von mHCN1 ist hochhomolog zu der anderer HCN-Kanäle (z.B. 91 % Homologie zwischen der CNBD von mHCN1 und mHCN2 auf AS-Ebene). Insbesondere sind die meisten Aminosäuren, die beim CAP-Protein dem gebundenen cAMP-Molekül benachbart sind, bei mHCN1 konserviert. Auch jene sechs Aminosäuren, die bei allen bekannten funktionellen CNBDs konserviert sind, sind bei mHCN1 vorhanden (s. Abb. 3.4.). Deshalb erscheint es eher unwahrscheinlich, daß die geringen Sequenzunterschiede innerhalb der CNBD für das unterschiedliche Ansprechen auf cAMP verantwortlich sind. Vermutlich beruht dieses auf Unterschieden in der sog. Linker-Region zwischen S6 und der CNBD. Durch Experimente mit chimären Kanälen, bei denen die CNBDs und Linkerregionen zwischen verschiedenen Mitgliedern der HCN-Familie ausgetauscht sind, könnte die Frage der unterschiedlichen cAMP-Sensitivität aufgeklärt werden. Wichtige Hinweise zur Modulation der HCN-Kanäle durch cAMP konnten bereits anhand trunkierter Kanäle gewonnen werden (Wainger et al. 2001). Dabei wurden unterschiedlich lange Abschnitte des C-Terminus von mHCN1 bzw. mHCN2 abgeschnitten, die entstandenen trunkierten Kanäle exprimiert und elektrophysiologisch untersucht. Es zeigte sich, daß HCN-Kanäle, bei denen die CNBD entfernt worden war, ähnliche Eigenschaften aufwiesen wie die Wildtypkanäle in Anwesenheit von cAMP (Verschiebung der Strom-Spannungs-Kennlinie, schnellere Aktivierung). Daraus läßt sich ableiten, daß die „unbesetzte“ CNBD eine Hemmung auf den Kanal ausübt, die durch cAMP aufgehoben wird.

4.4. Aktivierung durch Hyperpolarisation

Die Schlüsseleigenschaft nativer h-Ströme ist die Aktivierung durch Hyperpolarisation. Heterolog exprimierte mHCN1-Kanäle erfüllen dieses Merkmal.

Der Kanal beginnt bei Potentialen negativer als ~ -50 mV zu aktivieren, ist bei -77 mV halbmaximal und bei -110 mV voll aktiviert. Damit wurde bei heterolog exprimierten mHCN1-Kanälen wie auch bei den anderen HCN-Kanälen (mHCN2: $V_{1/2} = -103$ mV (Ludwig et al. 1998), hHCN4: $V_{1/2} = -109$ mV (Ludwig et al. 1999)) eine negativere Aktivierungsschwelle als bei den meisten Experimenten an nativen Zellen gemessen. Die Meßwerte an nativen Zellen variieren allerdings z.T. erheblich abhängig von Gewebe, Meßmethode und Untersucher. So liegen die Werte für $V_{1/2}$ zwischen -70 mV (Trigeminusganglion, Ingram et al. 1996) und -140 mV (ventrikuläre Myozyten, Yu et al. 1993 und 1995, Robinson et al. 1997, Ranjan et al. 1998). Es war schon früher aufgefallen, daß die Aktivierungskurve bei

Messungen an „excised inside-out-patches“ um 20 – 50 mV negativer lag als bei Messungen an ganzen Zellen (DiFrancesco 1991 und 1994, Bois et al 1997, Ludwig et al. 1998). Dies läßt sich nicht allein durch die Anwesenheit von cAMP im Ganzzellmodus erklären, da cAMP lediglich eine Verschiebung um ~15 mV bewirkt (DiFrancesco et al. 1994, Ludwig et al. 1998, Ludwig et al 1999) Vermutlich existieren also noch andere zytoplasmatische Faktoren, wie z.B. Phosphorylierung (Accili et al. 1997, Yu et al. 1995, Gauss et al. 1998), Schwankungen der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration (Hagiwara et al. 1989, Lüthi und McCormick 1998) oder Interaktionen mit Proteinen z.B. aus dem Zytoskelett, die eine Aktivierung bei positiveren Potentialen bedingen. Möglicherweise fehlen diese Faktoren in HEK293-Zellen, was die negativeren Aktivierungspotentiale bei heterologer Expression erklären könnte.

Welcher Mechanismus liegt der Aktivierung durch Hyperpolarisation zugrunde?

Wie bei depolarisationsaktivierten Kanälen ist der putative Spannungssensor von mHCN1 positiv geladen. Anstatt der üblichen fünf bis sieben positiven Ladungen verfügt mHCN1 über deren zehn, die in einem charakteristischen Muster angeordnet sind (s. 3.1.). Die größere Ladung läßt es plausibel erscheinen, daß der Spannungssensor bereits auf kleine Potentialänderungen stark reagiert. Tatsächlich ist die Aktivierungskurve von mHCN1 relativ steil (Clapham 1998). Ausgehend von Mutationsexperimenten am Shaker K^+ -Kanal (Miller und Aldrich 1996) wurde nun folgender Aktivierungsmechanismus für HCN-Kanäle vorgeschlagen (Santoro 1999, Vaca et al. 2000): Depolarisationsaktivierte Kanäle verfügen nach einem weitverbreiteten Modell über drei Zustände: geschlossen, offen und inaktiviert. Beim Ruhepotential liegen sie in geschlossenem Zustand vor. Bei Depolarisation durchlaufen sie nacheinander die beiden anderen Zustände. Bei HCN-Kanälen sollen nun obige Zustände zu so stark negativen Potentialen verschoben sein, daß sich der Kanal beim Ruhepotential im inaktivierten Zustand befindet. Durch Hyperpolarisation öffnet sich das anzunehmende Inaktivierungstor und der Kanal geht in den offenen Zustand über. Deshalb wurde dieses Modell auch als „recovery of inactivation“ bezeichnet (Santoro 1999, Miller und Aldrich 1996)

Bei extremer Hyperpolarisation sollte sich der Kanal demnach schließen. Bei Säuger-HCN-Kanälen wurde dieses Verhalten bei Hyperpolarisationen bis zu -200 mV (Santoro und Tibbs 1999) bisher jedoch noch nicht beobachtet. Sollte der Kanal allerdings auch bei extremer Hyperpolarisation nicht schließen, so spräche das keineswegs gegen obiges Modell. Denn ein Schließungstor, das bei physiologischen Potentialen niemals aktiviert würde und somit nicht funktionell wäre, müßte evolutionär ja auch nicht konserviert sein.

Interessanterweise ist der hyperpolarisationsaktivierte Strom bei spHCN, dem HCN-Kanal des Seeigels, transient. Nach einem anfänglichen Peak nimmt der Strom rasch ab, d.h. der Kanal öffnet bei Hyperpolarisation zunächst, um später (teilweise) zu inaktivieren (Gauss et al. 1998). Wichtige Aufschlüsse über die Wirkungsweise des Spannungssensors könnten Messungen des „Gating-Stromes“ bei HCN-Kanälen bringen.

Zeitverlauf der Aktivierung

mHCN1 aktiviert wesentlich schneller als die anderen Mitglieder der HCN-Familie. Ähnlich schnelle Aktivierungsgeschwindigkeiten wurden für I_h in verschiedenen Neuronen gemessen, z.B. im Cortex (Solomon und Nerbonne 1993 a,b), dem Hippocampus (Magee 1998, Pedarzani und Storm 1995), der Amygdala (Womble et al. 1993), den Purkinjezellen des Kleinhirns (Crepel et al. 1986) und Spinalganglien (Wang et al. 1997). In rhythmogenen Zellen, allen voran den Schrittmacherzellen im Herzen und im Thalamus findet sich ein wesentlich langsamer aktivierender I_h (DiFrancesco 1984, 1987; Acilli 1997 a,b; Hagiwara et al. 1989, Maruoka et al. 1994; Pape et al. 1989, 1992; McCormick und Pape 1990 a,b; Lüthi und McCormick 1998; Budde et al. 1997). Dies ist plausibel, da -anschaulich gesprochen- das Membranpotential ja Zeit braucht um „durchzuschwingen“. Bei zu schnell reagierendem I_h würde jedwede Hyperpolarisation sofort gebremst, eine gleichmäßige Oszillation könnte somit kaum zustande kommen. mHCN1 scheint also nur für schnelle Oszillationen in Frage zu kommen. Er eignet sich allerdings als Kandidat für viele andere Funktionen, die mit I_h assoziiert worden sind, wie Stabilisierung/Kontrolle des Membranruhepotentials, Verstärkung der Reizweiterleitung in Dendriten oder Adaptation in der Retina. Inzwischen wurde nachgewiesen, daß I_h in Photorezeptoren der Retina tatsächlich durch HCN1 vermittelt wird (Moosmang et al. 2001, Demontis et al. 2002)

Interessanterweise wurden in zahlreichen Zellen zwei verschieden schnelle Komponenten von I_h gemessen (Solomon et al. 1993, Womble et al. 1993). Dies stimmt exzellent mit der Entdeckung mehrerer HCN-Kanäle mit unterschiedlichen Aktivierungsgeschwindigkeiten überein. Die alternative Überlegung, daß ein einziger Kanal mit einem komplexen Aktivierungsverhalten beiden Komponenten von I_h zugrunde liegt, erscheint demgegenüber eher unwahrscheinlich (s.a. Diskussion der *In situ*-Hybridisierung, Abschn. 4.5.).

4.5. In situ-Hybridisierung

4.5.1. In situ-Hybridisierung im Herzen

mHCN2 wurde in der Arbeitsmuskulatur des Ventrikels nachgewiesen. Das ist in Übereinstimmung mit Messungen an nativen Kardiomyozyten, in denen I_h gemessen worden war (Yu et al. 1993, Hoppe et al. 1998, Thuringer et al. 1992, Pociatti et al. 1997). Die Zunahme der I_h Stromdichte in geschädigten Herzen führte zu der Hypothese, daß I_h an der Entstehung ventrikulärer Arrhythmien beteiligt sei (Cerbai et al. 1996, Hoppe et al. 1998). Es wäre interessant, zu untersuchen, ob diese erhöhte Stromdichte auf eine verstärkte Expression von HCN2 zurückzuführen ist.

Der inzwischen klonierte mHCN4 wird besonders stark im Sinusknoten exprimiert (Moosmang et al. 1999 und 2001). Er dürfte der Kanal sein, der wesentlich an der Rhythmogenese beteiligt ist.

4.5.2. In situ-Hybridisierung im Gehirn

I_h wurde in vielen verschiedenen Hirnregionen nachgewiesen. Dabei wurden ihm unterschiedlichste Funktionen zugeordnet (Pape 1996).

In allen Regionen, in denen nativer I_h gemessen worden war, konnte das Transskript von mindestens einem HCN-Kanal nachgewiesen werden. Wie im Abschnitt „Ergebnisse“ ausführlich dargestellt, zeigen die verschiedenen Kanalspezies höchst unterschiedliche Verteilungsmuster. Während mHCN2 beinahe ubiquitär im gesamten Gehirn vorkommt, ist mHCN1 auf ganz spezifische Gebiete beschränkt. mHCN3 wird auf extrem niedrigem Niveau exprimiert, lediglich im Bulbus olfactorius ist das Signal etwas stärker. Mittlerweile ist auch das Expressionsmuster des inzwischen klonierten mHCN4 bekannt. Er wird stark im Thalamus und Bulbus olfactorius exprimiert, im Hippocampus kommt er mäßig vor (Moosmang et al. 1999).

Es ist nun besonders interessant, nach einem Schema zu suchen, das dem Verteilungsmuster der einzelnen Kanäle zugrunde liegt. Ausgangspunkt hierfür können einerseits funktionelle, andererseits morphologische Aspekte sein.

Da mHCN1 nur auf einige bestimmte Zellpopulationen verteilt vorkommt, bietet es sich an, nach Gemeinsamkeiten zwischen diesen Zelltypen zu suchen.

Sowohl die Neuronen in der kortikalen Schicht V als auch die Purkinjezellen des Kleinhirns und die Pyramidenzellen der Hippocampusregion CA1 sind große primäre efferente Neuronen mit weitläufigen Dendritenbäumen und langen Axonen. In allen dreien wird mHCN1 stark exprimiert. I_h wurde in den apikalen Dendriten von Pyramidenzellen gefunden, wobei die Stromdichte mit dem Abstand vom Soma zunimmt. (Nicoll et al. 1993, Magee 1998, Stuart und Spruston 1998). mHCN1 könnte eine wichtige Rolle spielen bei der dendritosomalen Weiterleitung in diesen Neuronen, die eine große Zahl eintreffender Signale über einen weiten Einzugsbereich integrieren müssen (Santoro et al. 2000).

Ferner kommt I_h in Korbzellen in verschiedenen Hirnregionen vor. Mit Antikörpermarkierung wurde mHCN1 in den Axonendigungen dieser Neuronen nachgewiesen (Santoro et al. 1997). Es wurde vorgeschlagen, daß I_h bei der Regulation inhibitorischer Signale, die von Korbzellen ausgehen, eine Rolle spielt (Saitow und Konishi 1999).

Die ubiquitäre Verteilung von mHCN2 legt nahe, daß er in verschiedenen Neuronen eine Vielzahl von Funktionen erfüllt. In den folgenden Strukturen, in denen vorherrschend mHCN2 vorkommt, war I_h schon früher beschrieben worden: Cortex cerebri (Solomon et al. 1993, Budde et al. 1994), Hippocampus (Maccaferri et al. 1993), Kerngebiete im Hirnstamm (Travagli und Gills 1994, Bayliss et al. 1994; Rekling et al. 1996; Khakh und Henderson 1998) und Purkinjezellen des Kleinhirns (Chang et al. 1993).

Sowohl in Thalamuskernen (z.B. Nucleus geniculatus dorsalis lateralis, McCormick und Pape 1990, Pape 1996) als auch in Neuronen des Stratum oriens im Hippocampus wurde I_h Schrittmacherfunktion zugeschrieben. Läßt sich die Schrittmacherfunktion im Gehirn einzelnen HCN-Kanaltypen zuordnen? Während im Stratum oriens des Hippocampus mHCN1 und mHCN2 stark exprimiert werden, kommt mHCN1 im Thalamus kaum vor. Dafür wurde dort der inzwischen klonierte mHCN4 auf hohem Expressionslevel nachgewiesen (Moosmang et al. 1999). Da mHCN2+4 auch im Herzen vorkommen, scheinen diese beiden Kanäle für die I_h -Schrittmacherfunktion am wichtigsten zu sein.

Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal von HCN-Kanälen ist die Aktivierungskinetik (Ludwig et al. 1998, 1999, Santoro et al. 1998, Ishii et al. 1999). Auch bei Messungen in nativen Zellen waren unterschiedliche Aktivierungsgeschwindigkeiten festgestellt worden. In manchen Zellen wurden zwei verschieden schnelle I_h -Komponenten gemessen, wie z.B. in Pyramidenzellen des visuellen Cortex (Solomon et al. 1993). In diesen Zellen könnte nun mHCN1 der schnellen und mHCN2 der langsamen Komponente unterliegen, da beide Kanäle in Pyramidenzellen des visuellen Cortex vorkommen.

Es ist davon auszugehen, daß HCN-Kanäle wie alle anderen Mitglieder der K⁺-Kanal-Superfamilie in Tetrameren vorliegen. Bilden die vier bislang bekannten HCN-Kanäle miteinander Heterooligomere? Die vorliegenden *In situ*-Hybridisierungen sprechen eher gegen diese Annahme, schließen sie jedoch auch nicht aus. So läßt sich kein eindeutiges Muster von Koexpressionen festlegen. Es lassen sich Beispiele für verschiedene Kombinationen finden. So kommen mHCN1 und 2 zusammen in Purkinjezellen des Cerebellums vor, im Bulbus olfactorius finden sich mHCN1,2 und 3. Gleichzeitig gibt es aber auch Zellen, die nur einen einzigen mHCN-Subtyp exprimieren, wie z.B. Korbzellen des Kleinhirns (mHCN1) oder Neuronen im Putamen (mHCN2).

Um die Frage nach Hetero-/Homomeren zu klären, bedarf es also weiterer Experimente. Zur Zeit verfolgen zwei Gruppen einen interessanten Ansatz. Verschiedene HCN-Kanäle wurden heterolog koexprimiert und elektrophysiologisch charakterisiert (Ulens und Tytgat 2001, Chen et al. 2001). Die Ergebnisse zeigen, daß unterschiedliche HCN-Isomere *in vitro* Heteromere bilden können. Offen ist allerdings, ob auch *in vivo* eine Heteromerbildung stattfindet. Immunfluoreszenzexperimente in Verbindung mit konfokaler Lasermikroskopie könnten Aufschlüsse über die subzelluläre Lokalisation von HCN-Kanälen verschaffen und somit Hinweise über das mögliche Vorkommen von Heteromeren geben. Außerdem könnten HCN-Kanäle mit biochemischen Methoden z.B. aus dem Gehirn aufgereinigt werden und dann die Untereinheitszusammensetzung des Kanalkomplexes bestimmt werden.

5. Zusammenfassung

1. Der h-Strom (I_h) wurde seit ca. 20 Jahren an nativen Zellen eingehend untersucht und elektrophysiologisch charakterisiert. Bei I_h handelt es sich um einen durch Hyperpolarisation aktivierten, kationischen Einwärtsstrom. Er wird durch direkte Bindung von cAMP an den zugrundeliegenden Kanal moduliert.

Der Strom ist für viele wichtige Funktionen in kardialem und neuronalem Gewebe verantwortlich. Im Herzen ist er wesentlich an der Ausbildung des Schrittmacherpotentials im Sinusknoten und dessen Modulation durch sympathische und parasympathische Erregung beteiligt. In Neuronen trägt er zur Erregungsweiterleitung sowie der Bestimmung und Stabilisierung des Membranpotentials bei. Außerdem agiert er als Schrittmacher in oszillierenden Neuronen des Thalamus und des Stratum oriens im Hippocampus. Trotz der ausführlichen Untersuchungen war die molekulare Struktur der I_h -Kanäle bis vor kurzem noch völlig unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine cDNA charakterisiert, die für den „**m**urine **h**yperpolarization-activated **c**yclic **n**ucleotide-gated cation channel 1“ (mHCN1) codiert. Das Genprodukt weist alle wesentlichen Merkmale eines I_h -Kanals auf.

2. Die Primärstruktur von mHCN1 weist sechs Transmembransegmente (S1-S6), eine ionenleitende Pore zwischen S5 und S6 und eine Zyklonukleotidbindungstasche im Carboxyterminus auf. Das vierte Transmembransegment agiert vermutlich als Spannungssensor. Außerdem befindet sich im Carboxyterminus eine Polyglutaminregion, deren Funktion allerdings unbekannt ist.

HCN1 bildet mit drei weiteren HCN-Kanälen (HCN2-4) eine neue Ionenkanalfamilie, die zur Superfamilie der spannungsabhängigen Kationenkanäle gehört.

3. Nach Expression in HEK293-Zellen konnte mHCN1 funktionell charakterisiert werden. mHCN1 vermittelt einen durch Hyperpolarisation ausgelösten Einwärtsstrom, der von Na^+ und K^+ getragen wird. Die Aktivierungsschwelle liegt bei -50 mV, die halbmaximale Aktivierung bei -77 mV. Ab etwa -110 mV ist der Kanal voll aktiviert. Aktivierung und Ionenselektivität stimmen mit nativen I_h -Kanälen überein.

4. Der Zeitverlauf der Aktivierung läßt sich durch zwei Exponentialfunktionen annähern, deren Zeitkonstanten bei 30 und 171 ms liegen. Damit ist HCN1 von allen bisher charakterisierten HCN-Kanälen der am schnellsten aktivierende. cAMP bewirkte eine signifikante Verschiebung der Strom-Spannungs-Kurve um 5 mV.

5. Die Expression von mHCN1,2 und 3 wurde untersucht. Durch Northern-Blot wurde gezeigt, das alle drei Kanäle im Gehirn exprimiert werden, während im Herzen nur mHCN2 vorkommt. Dieser ist dort gleichmäßig in der gesamten Herzmuskulatur verteilt.

Im Gehirn zeigen die drei Kanäle ein sehr unterschiedliches Expressionsmuster. mHCN1 kommt vor allem im Kleinhirn, im Hippocampus und im Cortex vor. mHCN2 wird dagegen nahezu ubiquitär auf sehr hohem Niveau exprimiert. mHCN3 kommt im Gehirn nur in extrem geringer Menge vor.

6. Anhang

6.1. Nomenklatur von HCN-Kanälen

In den letzten Jahren wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen die Klonierung hyperpolarisationsaktivierter Kationenkanäle aus verschiedenen Spezies berichtet. Um die zu Anfang eingeführten unterschiedlichen Bezeichnungen für ein und dasselbe Protein zu vermeiden, einigte man sich darauf, die Kanäle einheitlich als **hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel (HCN)** zu bezeichnen. Die Nummerierung folgt der Reihenfolge der Veröffentlichung. Die Spezies wird durch einen vorangestellten Kleinbuchstaben bezeichnet. So steht mHCN2 für den murinen, hHCN2 für den humanen HCN2 Kanal.

Tab. 6.1.

HCN-Nomenklatur	Originalbezeichnung des Klons	Spezies	Referenz
HCN1	mBCNG-1	Maus	Santoro et al. 1997
	hBCNG-1*	Mensch	Santoro et al. 1998
	HAC2	Maus	Ludwig et al. 1998
HCN2	mBCNG-2*	Maus	Santoro et al. 1998
	hBCNG-2*	Mensch	Santoro et al. 1998
	HAC1	Maus	Ludwig et al. 1998
	hHCN2	Mensch	Ludwig et al. 1999a
HCN3	mBCNG-4*	Maus	Santoro et al. 1998
	HAC3	Maus	Ludwig et al. 1998
HCN4	mBCNG-3*	Maus	Santoro et al. 1998
	hHCN4	Mensch	Ludwig et al. 1999a
	HAC4	Kaninchen	Ishii et al. 1999
	hHCN4	Mensch	Seifert et al. 1999
spHCN	SPIH	Seeigel	Gauss et al. 1998

*partieller cDNA-Klon

6.2. Verwendete Primer

Tab. 6.2. zeigt die verwendeten Primerpaare zur Herstellung der *In situ*- bzw. Northern-Sonden (s.a. Abb. 3.7.). Die 3'-gelegene Sonde von mHCN2 wurde nicht mittels PCR, sondern mit einem Restriktionsverdau hergestellt.

Tab. 6.2.

Sonde	Name	Sequenz (5'→3')
mHCN1-5'	CNG 734F	cgtgggatcccaactccgcgtccaaca
	CNG 735R	ggatggtaccgcggaggagaatttgtga
mHCN1-3'	CNG 732F	ccgggatccgccctcaactgcacatcttc
	CNG 733R	gcatggtaccaggctgctgcatgagtgaca
mHCN2-5'	CNG 736F	ccgggatccgctctgcagccgcgacag
	CNG 737R	cgatggtaccgacttcacgcgttctgc
mHCN3-5'	CNG 902F	gccggatcctctctgacactttctcc
	CNG 903R	gcaaggtaccgcatctagtcgtggtcca
mHCN3-3'	CNG 752F	ggcgttcccaggatctct
	CNG 754R	aagggcagtatgttaggtcc

6.3. Verwendete Abkürzungen

aa	Aminosäure	ISO	Isoprenalin
APS	Ammoniumperoxodisulfat	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
ATP	Adenosin-5'-triphosphat		
bp	Basenpaar	K _a	Aktivierungskonstante
BSA	Rinderserumalbumin	kb	Kilobase
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat	LB	Luria-Bertani
cCMP	zyklisches Cytosin-3',5'-monophosphat	μ	Mikro (10 ⁻⁶)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	M	Mega (10 ⁶) bzw. molar
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat	m	Milli (10 ⁻³) bzw. Meter
Ci	Curie (1 Ci = 3,7x10 ¹⁰ Bq)	MEM	minimal essential medium
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	min	Minute(n)
CNBD	Zyklonukleotod-Bindungstasche	mRNA	messenger RNA
CNG	(cyclic nucleotide-gated) durch zyklische Nukleotide aktiviert	nt	Nukleotid
cpm	counts per minute	OD	Optische Dichte
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure	OT	Objektträger
d	Tag	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Da	Dalton	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
ddNTP	2',3'-Dideoxynukleosid-5'-triphosphat	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
DMSO	Dimethylsulfoxid	PEG	Polyethylenglykol
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNA	Ribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat	rpm	Umdrehungen pro Minute
dpm	desintegrations per minute	RT	Raumtemperatur
DTT	Dithiothreitol	SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	S1 – S6	Transmembransegmente S1 – S6
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure	s	Sekunde(n)
h	Stunde	ssDNA	(salmon sperm DNA) = Lachssperm-DNS
HCN	Hyperpolarization activated cyclic nucleotide modulated	TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
HEK293	menschliche embryonale Nierenzellen	TE	Tris-EDTA-Puffer
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
I _f	Funny-current	Tris	α,α,α,-Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
I _h	Hyperpolarization-activated current	tRNA	Transfer-RNA
I _{KACh}	Muscarinic-gated potassium current	TSS	Transformation and Storage Solution
		U	Unit, Einheit
		UV	Ultraviolett
		V _{1/2}	Potential der halbmaximalen Aktivierung
		X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-galaktosid

7. Literaturverzeichnis

- Accili EA, Redaelli G, DiFrancesco D (1997) Differential control of the hyperpolarization-activated current $i(f)$ by cAMP gating and phosphatase inhibition in rabbit sino-atrial myocytes. *J Physiol* (London) 500: 643-651
- Accili EA, Robinson RB, DiFrancesco D (1997) Properties and modulation of I_f in newborn versus adult cardiac SA node. *Am J Physiol* 272(3Pt2):H1549-52
- Accili EA, Proenza C, Baruscotti M, DiFrancesco D (2002) From funny current to HCN channels: 20 years of excitation. *News Physiol Sci*. 17:32-7
- Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merril CR, Wu A, Olde B, Moreno RF, Kerlavage AR, McCombie WR, Venter JC (1991). Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252:1651-1656.
- Aiba H, Fujimoto S, Ozaki N (1982) Molecular cloning and nucleotide sequencing of the gene for E. coli cAMP receptor protein. *Nucleic Acids Res* 10:1345-61
- Attwell D and Wilson MJ (1980) Behaviour of the rod network in the tiger salamander retina mediated by membrane properties of individual rods. *J Physiol* 309:287-315.
- Bader CR, Bertrand D. (1984) Effect of changes in intra- and extracellular sodium on the inward (anomalous) rectification in salamander photoreceptors. *J. Physiol.* 347:611-31
- Baker K, Warren KS, Yellen G, Fishman MC (1997) Defective "pacemaker" current (I_h) in a zebrafish mutant with a slow heart rate. *Proc Natl Acad Sci* 94:4554-9.
- Bal T and McCormick DA (1996) What stops synchronized thalamocortical oscillations? *Neuron* 17:297-308.
- Bal T and McCormick DA (1997) Synchronized oscillations in the inferior olive are controlled by the hyperpolarization-activated cation current I_h . *J Neurophysiol* 77:3145-3156
- Barnes S, Hille B. (1989) Ionic channels of the inner segment of tiger salamander cone photoreceptors. *J Gen. Physiol.* 94:719-43
- Bayliss DA, Viana F, Bellingham MC and Berger AJ (1994) Characteristics and postnatal development of a Hyperpolarization-activated inward current in rat hypoglossal motoneurons in vitro. *J Neurophysiol* 71: 119-128
- Benham CD, Bolton TB, Denbigh JS, Lang RJ (1987) Inward rectification in freshly isolated single smooth muscle cells of the rabbit jejunum. *J Physiol* 383:461-476.
- Biel M, Zong X, Distler M, Bosse E, Klugbauer N, Murakami M, Flockerzi V, Hofmann F (1994) Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney, and heart. *Proc Natl Acad Sci* 91:3505-3509
- Biel M, Zong X, Ludwig A, Sautter A, Hofmann F (1999) Structure and function of cyclic nucleotide gated channels. *Annu Rev Neurosci* 19: 235-263
- Biel M, Ludwig A, Zong X, Hofmann F (1999) Hyperpolarization-activated cation channels: A multi-gene family. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 136: 165-181
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening rekombinant plasmid. *Nucl Acids Res* 7:1513-18
- Bois P, Bescond J, Renaudon B, Lenfant J (1996) Mode of action of bradycardic agent, S 16257, on ionic currents of rabbit sinoatrial node cells. *Br J Pharmacol* 118:1051-1057
- Bois P, Renaudon B, Baruscotti M, Lenfant J, DiFrancesco D (1997). Activation of f-channels by cAMP analogues in macropatches from rabbit sino-atrial node myocytes. *J. Physiol*, 501: 565-571
- BoSmith RE, Briggs I, Sturgess NC (1993) Inhibitory actions of ZENECA ZD7288 on whole-cell hyperpolarization activated inward current (I_f) in guinea-pig dissociated sinoatrial node cells. *Br J Pharmacol* 110:343-349.
- Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ (1979) How does adrenalin accelerate the heart? *Nature* 280: 235-236
- Brown HF, Ho WK (1996) The hyperpolarization-activated inward channel and cardiac pacemaker activity. In: Morad M, Ebashi S, Trautwein W, Kurachi Y (eds) *Molecular Physiology and Pharmacology of Cardiac Ion Channels and Transporters*, Dordrecht, *Kluwer Academic Publishers* : 17-30

- Budde T, Biella G, Munsch T and Pape HC (1997) Lack of regulation by intracellular Ca^{2+} of the hyperpolarization-activated cation current in rat thalamic neurones. *J Physiol* 503: 79-85
- Budde T, White JA, and Kay AR (1994) Hyperpolarization-activated Na^+ - K^+ current (I_h) in neocortical neurons is blocked by external proteolysis and internal TEA. *J Neurophysiol* 72: 2737-2742
- Cerbai E, Barbieri M, Mugelli A (1996) Occurrence and properties of the hyperpolarization-activated current I_f in ventricular myocytes from normotensive and hypertensive rats during aging. *Circulation* 94:1674-1681.
- Chang W, Strahlendorf JC and Strahlendorf HK (1993) Ionic contributions to the oscillatory firing activity of rat Purkinje cells in vitro. *Brain Res* 614: 335-341
- Chastain PD, Sinden RR; (1998). CTG repeats associated with human genetic disease are inherently flexible. *J Mol Biol* 275:405-11
- Chen J, Mitcheson JS, Lin M, Sanguinetti MC (2000) Functional roles of charged residues in the putative voltage sensor of the HCN2 pacemaker channel. *J Biol Chem* 275:36465-71
- Chen S, Wang J, Siegelbaum SA (2001) Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J Gen Physiol* 117:491-504.
- Chen J, Piper DR, Sanguinetti MC (2002) Voltage sensing and activation gating of HCN pacemaker channels. *Trends Cardiovasc Med*. 12:42-5
- Clapham DE (1998) Not so funny anymore: Pacing channels are cloned. *Neuron* 21: 5-7
- Cooper DMF, Mons N, and Fagan K (1994). Ca^{2+} -sensitive adenylyl cyclases. *Cell. Signalling* 6, 823-840
- Cooper DMF, Mons N, and Karpen JW (1995). Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature* 374, 421-424
- Crepel F, Penit-Soria J (1986) Inward rectification and low threshold calcium conductance in rat cerebellar Purkinje cells. An in vitro study. *J Physiol* 372:1-23
- Demontis GC, Moroni A, Gravante B, Altomare C, Longoni B, Cervetto L, DiFrancesco D (2002) Functional characterisation and subcellular localisation of HCN1 channels in rabbit retinal rod photoreceptors *J Physiol* 542:89-97
- DiFrancesco D (1981) A new interpretation of the pacemaker current in calf Purkinje fibres. *J Physiol* 314:359-376.
- DiFrancesco D (1982) Block and activation of the pace-maker channel in calf purkinje fibres: effects of potassium, caesium and rubidium. *J Physiol* 329:485-507.
- DiFrancesco D (1984) Characterization of the pace-maker current kinetics in calf Purkinje fibres. *J Physiol* 348:341-67
- DiFrancesco D (1986) Characterization of single pacemaker channels in cardiac sino-atrial node cells. *Nature* 324:470473.
- DiFrancesco D (1987) The pacemaker current in the sinus node. *Eur Heart J Suppl* L:19-23
- DiFrancesco D (1989) Muscarinic modulation of cardiac rate at low acetylcholine concentrations. *Science* 243: 669-671
- DiFrancesco D, Tortora P (1991) Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP *Nature* 351: 145-147
- DiFrancesco D (1993) Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol* 55: 455-472
- DiFrancesco D, Mangoni M (1994) Modulation of single hyperpolarization-activated channels (I_f) by cAMP in the rabbit sinoatrial node *J Physiol* 474: 473-482
- DiFrancesco, D. (1995) The pacemaker current (I_f) plays an important role in regulating SA node pacemaker activity. *Cardiovascular Res* 30:307-308
- Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: Molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science* 280: 69-77
- Eagle H (1959) Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 130:432-437
- Edman A, Gestrelus S, Grampp W (1987) Current activation by membrane hyperpolarization in the slowly

- adapting lobster stretch receptor neurone. *J Physiol* 384:671-690.
- Edman A, Grampp W (1991) Ion (H^+ , Ca^{2+} , Co^{2+}) and temperature effects on a hyperpolarization-activated membrane current in the lobster stretch receptor neurone. *Acta Physiol Scand* 141:251-61
- Edman A, Theander S, Grampp W (1992) Functional effects of a hyperpolarization-activated membrane current in the lobster stretch receptor neurone. *Acta Physiol. Scand* 146:221-32
- Fain GL, Quandt BL, Gerschfeld HM (1978) Contribution of a caesium sensitive conductance increase to the rod photoresponse. *Nature* 272: 466-469
- Farès N, Bois P, Lenfant J, Potreau D (1998) Characterization of a hyperpolarization-activated current in dedifferentiated adult rat ventricular cells in primary culture. *J. Physiol* 506:73-82
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132:6-13
- Finn J, Grunwald M, Yau KW (1996) Cyclic nucleotide-gated ion channels: an extended family with diverse functions. *Annu Rev Physiol* 58:395-426.
- Gauss R, Seifert R, Kaupp VB (1998) Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 393:583-587
- Gauss R, Seifert R (2000) Pacemaker oscillations in heart and brain: a key role for hyperpolarization-activated cation channels. *Chronobiol Int.* 17:453-69
- Goethals M, Raes A, van Bogaert PP (1993) Use-dependent block of the pacemaker current I_f in rabbit sinoatrial node cells by zatebradine (UL-FS 49). On the mode of action of sinus node inhibitors. *Circulation* 88:2389-2401.
- Goulding EH, Tibbs GR, Liu D, Siegelbaum SA (1993). Role of H5 domain in determining pore diameter and ion permeation through cyclic-nucleotide-gated channels. *Nature* 364:61-4
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nair R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59-74
- Hagiwara N, Irisawa H (1989) Modulation by intracellular Calcium of the hyperpolarization activated inward current in rabbit single sino-atrial node cells. *J Physiol (London)* 409:121-41
- Halliwel JV and Adams PR (1982) Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res* 250:71-92
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391:85-100
- Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R (1994) Mutations in the K^+ channel signature sequence. *Biophys J* 66: 1061-7
- Hestrin S (1987) The properties and function of inward rectification in rod photoreceptors of the tiger salamander. *J Physiol* 390:319-333.
- Ho WK, Brown HF, Noble D (1994) High selectivity of the I_f channels to Na^+ and K^+ in rabbit isolated sinoatrial node cells. *Pflügers Arch* 426: 68-74
- Hoppe UC, Jansen E, Südkamp M, Beuckelmann DJ (1998) Hyperpolarization-activated inward current in ventricular myocytes from normal and failing human hearts. *Circulation* 97: 55-65
- Ingram SL, Williams JT (1996) Modulation of the hyperpolarization-activated current (I_h) by cyclic nucleotides in guinea-pig primary afferent neurons. *J Physiol (London)* 492: 97-106
- Irisawa H, Brown HF, Giles W (1993) Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. *Physiol Rev* 73:197-227
- Ishii TM, Takano M, Xie LH, Noma A, Ohmori H (1999) Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit sinoatrial node. *J Biol Chem* 274: 12835-12839
- Janigro D, West GA, Nguyen TS, Winn HR (1994) Regulation of blood-brain barrier endothelial cells by nitric oxide. *Circ Res* 75:528-538
- Khakh BS, Henderson G (1998) Hyperpolarization-activated cationic currents (I_h) in neurones of the trigeminal mesencephalic nucleus of the rat. *J Physiol* 510: 695-704
- Kozak M (1991) Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem*

266:19867-70

- Kyte J and Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157:105-32
- Li R, el-Mallakh RS (1997) Triplet repeat gene sequences in neuropsychiatric diseases. *Harv Rev Psychiatry* 5:66-74
- Liu DT, Gareth R, Tibbs GR, Siegelbaum SA (1996). Subunit Stoichiometry of Cyclic Nucleotide-Gated Channels and Effects of Subunit Order on Channel Function. *Neuron* 16:983-990
- Liu Z, Zou A, Demir S, Clark J, Nathan R (1996) Characterization of a hyperpolarization-activated inward current in cultured pacemaker cells from the sinoatrial node. *J Mol Cell Cardiol* 28:2523-35
- Ludwig A, Flockerzi V, Hofmann F (1997) Regional expression and cellular localization of the alpha1 and beta subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain. *J Neurosci* 17:1339-49
- Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M (1998) A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels *Nature* 393: 587-591
- Ludwig A, Zong X, Hofmann F, Biel M (1999) Structure and function of cardiac pacemaker channels. *Cell Physiol Biochem* 9:179-186
- Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M (1999) Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics *EMBO J* 18: 2323-2329
- Lüthi A and McCormick, DA (1998(a)) Periodicity of thalamic synchronized oscillations: the role of Ca²⁺-mediated upregulation of I_h. *Neuron* 20:553-563
- Lüthi A, McCormick DA (1998(b)) H-current Properties of a neuronal and network pacemaker. *Neuron* 21: 9-12
- Maccaferri G, Mangoni M, Lazzari A and DiFrancesco D (1993) Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neurophysiol* 69: 2129-36
- MacKinnon R, Miller C (1989). Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor. *Science* 245(4924):1382-5
- MacKinnon R (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 350:232-235
- Magee JC (1998) Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 18: 7613-24
- Maricq AV, Korenbrot JI (1990) Inward rectification in the inner segment of single retinal cone photoreceptors. *J Neurophysiol* 64:1917-28
- Maruoka F, Nakashima Y, Takano M, Ono K, Noma A (1994) Cation-dependent gating of the hyperpolarization-activated cation current in the rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* 477:423-435
- McCormick DA and Pape HC (1990(a)) Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurons. *J Physiol* 431:291-318
- McCormick DA and Pape HC (1990(b)) Noradrenergic and serotonergic modulation of a hyperpolarization-activated cation current in thalamic relay neurons *J Physiol* 431: 319-42
- Miller AG, Aldrich RW (1996) Conversion of a delayed rectifier K⁺ channel to a voltage-gated inward rectifier K⁺ channel by three amino substitutions. *Neuron* 16:853-858
- Moroni A, Gorza L, Beltrame M, Gravante B, Vaccari T, Bianchi M, Altomare C, Longhi R, Heurteaux C, Vitadello M, Malgaroli A, DiFrancesco D (2001) Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Channel 1 is a Molecular Determinant of the Cardiac Pacemaker Current. *I_fJ Biol Chem*. 276:29233-41
- Moosmang S, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (1999) Differential distribution of four hyperpolarization activated cation channels in mouse brain. *Biol Chem* 380: 975-980
- Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (2001). Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem* 268:1646-52
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-50

- Nicoll A, Larkman A, Blakemore C (1993). Modulation of EPSP shape and efficacy by intrinsic membrane conductances in rat neocortical pyramidal neurons in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* 468: 693-710
- Okabe K, Inoue Y, Kawarabayashi T, Kajiya H, Okamoto F and Soeda H (1999) Physiological significance of hyperpolarization-activated inward currents (I_h) in smooth muscle cells from the circular layers of pregnant rat myometrium. *Pflügers Arch* 439:76-85
- Pape HC, McCormick DA (1989) Noradrenaline and serotonin selectively modulate thalamic burst firing by enhancing a hyperpolarization-activated cation current. *Nature* 340: 715-718
- Pape HC and Mager R (1992) Nitric oxide controls oscillatory activity in thalamocortical neurons. *Neuron* 9:441-448
- Pape HC (1994) Specific bradycardic agents block the hyperpolarization-activated cation current in central neurons. *Neuroscience* 59:363-73
- Pape HC (1996) Queer current and pacemaker: The hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol* 58:299-327
- Pedarzani Pand Storm JF (1995) Protein kinase A-independent modulation of ion channels in the brain by cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci* 92:11716-20
- Porciatti F, Pelzmann B, Cerbai E, Schaffer P, Pino R, Bernhart L, Koidl B and Mugelli A (1997) The pacemaker current I_f in single human atrial myocytes and the effect of β -adrenoceptor and A1-adenosine receptor stimulation. *Br J Pharmacol* 122:963-969
- Ranjan R, Chiamvimonvat N, Thakor NV, Tomaselli GF, Marban E (1998) Mechanism of anode break stimulation in the heart. *Biophys J* 74:1850-63
- Rekling JC, Champagnat J, Denavit-Saubie M (1996) Electroresponsive properties and membrane potential trajectories of three types of inspiratory neurons in the newborn mouse brain stem in vitro. *J Neurophysiol* 75:795-810
- Robinson RB, Yu H, Chang F, Cohen IS (1997) Developmental change in the voltage-dependence of the pacemaker current I_f in rat ventricle cells. *Pflügers Arch.* 433:533-5
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-4
- Saitow F, Konishi S (1999) β -adrenergic receptor mediated excitability increase via activation of a hyperpolarization activated current (I_h) in rat cerebellar basket cells. *Soc Neurosci Abstr* 25:1255
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74:5463-5467
- Santoro B, Grant SGN, Bartsch D, Kandel ER (1997) Interactive cloning with the SH3 Domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to EAG and cyclic nucleotide gated channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14815-20
- Santoro B, Lin DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA, Tibbs GR (1998) Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 93: 717-729
- Santoro B and Tibbs G (1999) The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann N Y Acad Sci* 868:741-764
- Santoro B, Chen S, Luthi A, Pavlidis P, Shumyatsky GP, Tibbs GR, Siegelbaum SA (1984) Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *Biochemistry* 23:4193-9
- Schwindt PC, Spain WJ, and Crill WE (1992) Effects of intracellular calcium chelation on voltage-dependent and calcium-dependent currents in cat neocortical neurons. *Neuroscience* 47:571-578
- Seifert R, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P, Kaupp UB (1999) Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc Natl Acad Sci* 96:9391-9396.

- Shabb JB, Corbim JD (1992) Cyclic nucleotide-binding domains in proteins having diverse functions. *J Biol Chem* 1992 Mar 25; 267(9): 5723-6
- Siegenbeck van Heukelom J (1991) Role of the anomalous rectifier in determining membrane potentials of mouse muscle fibers at low extracellular K^+ . *J Physiol.* 434:549-60
- Simmons DM, Arriza JL, Swanson LW (1989) A complete protocol for *in situ* hybridization of messenger RNAs in brain and other tissues with radio-labeled single-stranded RNA probes. *J Histotech* 12:169-181
- Solomon JS, Doyle JF, Burkhalter A, Nerbonne JM (1993) Differential expression of hyperpolarization-activated currents reveals distinct classes of visual cortical projection neurons. *J Neurosci* 13:5082-91
- Solomon JS, Nerbonne JM. (1993(a)). Hyperpolarization-activated currents in isolated superior colliculus-projecting neurons from rat visual cortex. *J Physiol.* 462:393-420
- Solomon JS, Nerbonne JM (1993(b)) Two kinetically distinct components of hyperpolarization-activated current in rat superior colliculus-projecting neurons. *J Physiol* 469: 291-313
- Stuart G, Spruston N (1998) Determinants of voltage attenuation in neocortical pyramidal neuron dendrites. *J Neurosci* 18:3501-10
- Thüringer D, Lauribe P, Escande D (1992) A hyperpolarization-activated inward current in human myocardial cells *J Mol Cell Cardiol* 24:451-455
- Titani K, Sasagawa T, Ericsson LH, Kumar S, Smith SB, Krebs EG, Walsh KA (1984) Amino acid sequence of the regulatory subunit of bovine type I adenosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase. *Biochemistry* 23:4193-9
- Tibbs GR, Liu DT, Leypold BG, Siegelbaum SA (1998) A state-independent interaction between ligand and a conserved arginine residue in cyclic nucleotide-gated channels reveals a functional polarity of the cyclic nucleotide binding site. *J Biol Chem* 273:4497-4505
- Travagli RA, Gillis RA (1994) Hyperpolarization-activated currents, I_h and I_{KIR} , in rat dorsal motor nucleus of the vagus neurons *in vitro*. *Neurophysiol* 71:1308-1317
- Ulens C, Tytgat J (2001) Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels. *J Biol Chem.* 276:6069-72.
- Vaca L, Stieber J, Zong X, Ludwig A, Hofmann F, Biel M (2000) Mutations in the S4 domain of a pacemaker channel alter its voltage dependence. *FEBS Lett.* 479:35-40
- Vasalle M. (1995) The pacemaker current (I_f) does not play an important role in regulating SA node pacemaker activity. *Cardiovasc Res* 30:309-310
- Wang Z, Van Den Berg RJ, Ypey DL (1997) Hyperpolarization-activated currents in the growth cone and soma of neonatal rat dorsal root ganglion neurons in culture. *J Neurophysiol* 78:177-86
- Wainger BJ, DeGennaro M, Santoro B, Siegelbaum SA, Tibbs GR (2001) Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature* 411: 805-10
- Weber IT, Steitz TA (1987) Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5 Å. *J Mol Biol* 198:311-326
- Wickman K, Nemeč J, Gendler SJ, Clapham DE (1998) Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice. *Neuron* 20:103-114.
- Wollmuth LP (1995) Multiple ion binding sites in I_h channels of rod photoreceptors in tiger salamander. *Pflügers Arch* 430:34-43.
- Wollmuth LP, Hille B (1992) Ionic selectivity of I_h channels of rod photoreceptors in tiger salamanders. *J Gen Physiol* 100: 749-765
- Womble MD, Moises HC (1993) Hyperpolarization-activated currents in neurons of the rat basolateral amygdala. *J Neurophysiol* 70:2056-65
- Wutke WA, Berry MS. (1992) Modulation of inwardly rectifying Na^+K^+ -channels by serotonin and cyclic nucleotides in salivary gland cells of the leech, haementaria. *J Membr Biol* 127:57-68
- Yanagihara K and Irisawa H (1980) Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflügers Arch* 388:11-19

Yu H, Chang F, Cohen IS (1993). Pacemaker current exists in Ventricular Myocytes. *Circulation Res* 72:232-236.

Yu H, Chang F, Cohen IS (1995) Pacemaker current I_f in adult canine cardiac ventricular myocytes. *J Physiol* 485:469-483

Zagotta WN, Siegelbaum SA (1996) Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Annu Rev Neurosci* 19:235-263

Zaza A, Maccaferri G, Mangoni M, DiFrancesco D (1991) Intracellular calcium does not directly modulate cardiac pacemaker (I_f) channels. *Pflügers Arch* 419:662-64

Eigene Veröffentlichung:

Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M (1998) A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels *Nature* 393: 587-591

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuallererst sind dies PD. Dr. Andreas Ludwig und Prof. Dr. Martin Biel, die mich von der ersten bis zur letzten Minute vorbildlich betreut und mir mit großem Engagement molekularbiologisches Arbeiten beigebracht haben. Vielen herzlichen Dank für alles!

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann für die Themenstellung, die Aufnahme in sein Team, sein stets offenes Ohr für Wünsche und Probleme und die fortwährende Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Juliane Stieber und Herrn Dr. Xiangang Zong für die Durchführung der elektrophysiologischen Untersuchungen.

Bei Dr. Andrea Gerster, Dr. Muriel Hobom, Dr. Else Marais, Dr. Claudia Seisenberger, Dr. Verena Specht, Dr. Robert Feil, PD Dr. Norbert Klugbauer und Dr. Sven Moosmang möchte ich mich für viele Tips und Hilfen in der täglichen Laborarbeit bedanken.

Desgleichen danke ich unseren „TA's“ Petra Mayr und Sabine Stief für ihre tatkräftige Unterstützung.

Für die photographischen Arbeiten bedanke ich mich bei Frau Eva Roller.

Schließlich möchte ich mich herzlichst bei allen Mitarbeitern des Instituts für die freundliche Aufnahme und das gute Arbeitsklima bedanken.

Michael Andreas Jeglitsch

<u>Persönliche Angaben</u>	Geburtsdatum:	05. 07. 1973	
	Geburtsort:	Augsburg	
	Staatsangehörigkeit:	deutsch	
	Familienstand:	ledig	
<u>Schule</u>	1980 – 1984	Eichendorff – Volksschule	Augsburg
	1984 – 1993	Holbein – Gymnasium	Augsburg
	1993	Abitur	
<u>Zivildienst</u>	1993 – 1994	Hessing – Kliniken	Augsburg
<u>Studium</u>	1995 – 1997	Medizin (vorklinisch)	FAU – Erlangen
	1997 – 2002	Medizin (klinisch)	TU – München
	1998 – 1999	Medizin (klinisch)	GKT – London
<u>Stipendien</u>	1993	Aufnahme in die Bayerische Begabtenförderung	
	1997	Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes	
	1998 – 1999	Jahresstipendium des DAAD zum Studium in Großbritannien	
<u>Praktisches Jahr (PJ)</u>	05/2001 – 08/2001	Innere Medizin	Cornell University, New York, USA
	09/2001 – 11/2001	Chirurgie	Kantonsspital Aarau
	12/2001 – 03/2002	Gynäkologie und Geburtshilfe	Klinikum Rechts der Isar, München
<u>Prüfungen</u>	04/1997	Physikum	FAU – Erlangen
	04/1998	1. Staatsexamen	TU – München
	04/2001	2. Staatsexamen	TU – München
	05/2002	3. Staatsexamen	TU – München
	05/2002	Vorläufige Approbation als Arzt im Praktikum	