

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Untersuchungen zur Heteromerisierung, Funktion
und genetischen Struktur von HCN
Schrittmacherkanälen**

von
Barbara Much
aus München

2003

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Martin Biel betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 28.04.2003

.....
Barbara Much

Dissertation eingereicht am 28.04.2003

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin Biel
2. Gutachter: Prof. Dr. Alexander Pfeifer

Mündliche Prüfung am 27.05.2003

Für meine Eltern

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Martin Biel möchte ich für die Nennung des Themas, die Betreuung der Arbeit und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe danken und ganz besonders dafür, dass er jederzeit offen für Fragen und Probleme war.

Herrn Prof. Dr. Alexander Pfeifer danke ich sehr herzlich für die Übernahme des Koreferats und für wissenschaftliche Ratschläge und Diskussionen.

Frau Dr. Angela Schneider hat mich hervorragend in die Tiefen der Molekularbiologie und der Zellkultur eingeweiht. Sie hat ihr grosses Interesse an meiner Arbeit auch während ihres Erziehungsurlaubs nicht verloren und das Manuskript kritisch und konstruktiv durchgesehen. Dafür gilt ihr mein herzlichster Dank.

Mein herzlichster Dank gilt auch Frau Daniela Scholz, da sie durch ihren enormen Fleiss, ihre hervorragenden technischen Fähigkeiten und ihr freundliches Wesen den Laboralltag sehr erleichtert hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD. Dr. Xiangang Zong, Herrn Dr. Christian Wahl-Schott und Herrn Ludwig Baumann für die Durchführung der elektrophysiologischen Untersuchungen und die nützlichen Diskussionen und Ratschläge.

Frau Heike Abicht und Herrn Dr. Christian Wahl-Schott danke ich vielmals für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Vielen Dank an Frau Berit Noack für die ausgezeichnete Unterstützung in der Zellkultur.

Frau Dr. Andrea Gerstner danke ich für die wertvollen praktischen und theoretischen Ratschläge.

An Herrn PD. Dr. Andreas Ludwig ergeht mein Dank für die Zusammenarbeit bei der genomischen Analyse von HCN Kanälen und für die Bereitstellung eines Antikörpers gegen HCN2.

Danke auch an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppen um Prof. Dr. Biel und Prof. Dr. Pfeifer, vor allem für das sehr nette Arbeitsklima und die grosse Hilfsbereitschaft.

Der grösste Dank geht an Herrn Nils Beyer für die Hilfe am PC, die Durchsicht der Arbeit und dafür, dass er immer für mich da ist.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 12 |
| 1.1 | Rhythmische Erregungsbildung durch I_h | 12 |
| 1.1.1 | Der kardiale I_h | 12 |
| 1.1.2 | Der neuronale I_h | 13 |
| 1.2 | HCN Kanäle | 14 |
| 1.2.1 | Molekulare Identifizierung der HCN Gene | 14 |
| 1.2.2 | Struktur der Säugetier-HCN Kanäle..... | 15 |
| 1.2.3 | Gewebsexpression der HCN Kanäle | 16 |
| 1.2.3.1 | Gewebsexpression der HCN Kanäle im Herz | 16 |
| 1.2.3.2 | Gewebsexpression der HCN Kanäle im Gehirn..... | 17 |
| 1.2.3.3 | Gewebsexpression der HCN Kanäle in der Retina..... | 18 |
| 1.2.4 | Funktionelle Eigenschaften der HCN Kanäle | 18 |
| 1.2.4.1 | Aktivierung durch Hyperpolarisation..... | 18 |
| 1.2.4.2 | Kanalmodulation | 19 |
| 1.2.4.3 | Ionenselektivität..... | 19 |
| 1.3 | Ziel der Arbeit | 21 |
| 2 | Material und Methoden | 22 |
| 2.1 | Plasmide..... | 22 |
| 2.1.1 | pcDNA3 und pcDNA3.1 Myc | 22 |
| 2.1.2 | pIRES2-EGFP | 22 |
| 2.1.3 | pCR [®] 2.1-TOPO [®] | 22 |
| 2.1.4 | pDsRed1-N1, pEGFP-N1-N3, pECFP-Mem..... | 23 |
| 2.2 | Reinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren..... | 23 |
| 2.2.1 | Präzipitation von Nukleinsäuren | 23 |
| 2.2.2 | Phenol-Chloroform-Extraktion..... | 23 |
| 2.2.3 | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren..... | 24 |
| 2.3 | Isolierung von Plasmid-DNA | 24 |
| 2.3.1 | Schnellisolierung von Plasmid-DNA (Alkalische Lyse)..... | 24 |
| 2.3.2 | Plasmidisolierung und –reinigung durch Säulenchromatographie..... | 25 |
| 2.4 | Enzymatische Modifikation von DNA..... | 25 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.4.1 | Restriktionsendonukleasen | 25 |
| 2.4.2 | Dephosphorylierung von DNA durch alkalische Phosphatase | 26 |
| 2.4.3 | Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase | 26 |
| 2.5 | Adapterligation | 26 |
| 2.6 | Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten | 27 |
| 2.6.1 | Lösungen | 27 |
| 2.6.2 | Agarose-Gelelektrophorese | 27 |
| 2.6.3 | Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 28 |
| 2.6.4 | Isolierung von Nukleinsäurefragmenten durch Elektroelution | 28 |
| 2.7 | Polymerase-Kettenreaktion | 29 |
| 2.7.1 | Prinzip und Anwendung | 29 |
| 2.7.2 | Standardprotokoll | 29 |
| 2.8 | Sequenzierung von DNA | 31 |
| 2.8.1 | Primer | 31 |
| 2.8.2 | Sequenzierreaktion | 31 |
| 2.9 | Bakterienkultur und –transformation | 32 |
| 2.9.1 | Verwendeter Stamm | 32 |
| 2.9.2 | Nährmedium und Antibiotika | 32 |
| 2.9.3 | Kultivierung | 32 |
| 2.9.4 | Transformation von <i>E.coli</i> | 33 |
| 2.9.4.1 | Präparation kompetenter Bakterienzellen | 33 |
| 2.9.4.2 | Transformation | 33 |
| 2.10 | Isolierung genomischer DNA aus Blut | 33 |
| 2.11 | Southern Blot Analyse | 34 |
| 2.11.1 | Herstellung ³² P-markierter Gensonden | 34 |
| 2.11.2 | Southern Hybridisierung | 34 |
| 2.11.3 | Lösungen | 35 |
| 2.12 | Kultur eukaryotischer Zellen | 35 |
| 2.12.1 | Verwendete Zelllinie | 35 |
| 2.12.2 | Nährmedium | 36 |
| 2.12.3 | Kultur | 36 |
| 2.12.4 | Transfektion von eukaryotischen Zellen | 37 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.13 | Membranpräparation | 39 |
| 2.13.1 | Lösungen | 39 |
| 2.13.2 | Durchführung..... | 39 |
| 2.14 | Quantifizierung von Proteinen..... | 40 |
| 2.15 | Western Blot Analyse..... | 40 |
| 2.15.1 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese..... | 40 |
| 2.15.2 | Immunologische Detektion durch Western Blot | 42 |
| 2.16 | Deglycosylierung von Proteinen | 43 |
| 2.17 | Ko-Immunpräzipitation | 43 |
| 2.17.1 | Zellkultur und -lyse..... | 44 |
| 2.17.2 | Ko-Immunpräzipitation | 44 |
| 2.18 | Konfokale Mikroskopie..... | 45 |
| 2.18.1 | Zellkultur | 45 |
| 2.18.2 | Mikroskopie..... | 45 |
| 2.19 | Elektrophysiologische Untersuchungen | 46 |
| 2.19.1 | Grundlagen und Durchführung..... | 46 |
| 2.19.2 | Messprotokolle | 46 |
| 3 | Ergebnisse..... | 48 |
| 3.1 | Heteromerisierung von HCN Kanälen | 48 |
| 3.1.1 | Klonierung von Fusionsproteinen | 48 |
| 3.1.2 | Elektrophysiologische Untersuchung von mHCN2-EGFP und hHCN4-RFP | 49 |
| 3.1.3 | Untersuchung der Ko-Lokalisation durch konfokale Mikroskopie | 50 |
| 3.1.4 | Ko-Immunpräzipitation von HCN Kanälen | 53 |
| 3.1.5 | Elektrophysiologische Charakterisierung von HCN Interaktionen | 54 |
| 3.2 | Glycosylierung von HCN Kanälen..... | 56 |
| 3.2.1 | Enzymatische Deglycosylierung von HCN Kanälen..... | 56 |
| 3.2.2 | Deglycosylierung von mHCN2 durch Mutagenese..... | 57 |
| 3.2.3 | Zelluläre Verteilung von glycosylierungsdefizientem mHCN2..... | 59 |
| 3.2.4 | Elektrophysiologische Charakterisierung von Mut.Gly2 und mHCN2..... | 61 |
| 3.3 | Funktionelle Eigenschaften von HCN Kanälen..... | 63 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.3.1 | cAMP Abhängigkeit..... | 63 |
| 3.3.1.1 | Konstruktion von Punktmutanten des mHCN2 Kanals..... | 64 |
| 3.3.1.2 | Elektrophysiologische Charakterisierung der Mutanten 1-3..... | 64 |
| 3.3.2 | Aktivierungskinetik und Spannungsabhängigkeit..... | 66 |
| 3.3.2.1 | Konstruktion von verkürzten mHCN2 Kanälen und chimären Kanälen aus mHCN1 und mHCN2..... | 66 |
| 3.3.2.2 | Elektrophysiologische Charakterisierung der Mutanten 5-12..... | 68 |
| 3.4 | Genomische Analyse des hHCN2 und des hHCN4..... | 70 |
| 3.4.1 | Cayman Ataxie..... | 70 |
| 3.4.1.1 | Hintergrund..... | 70 |
| 3.4.1.2 | Sequenzierung der Exons 1-8 von hHCN2..... | 70 |
| 3.4.1.3 | Untersuchung der Introns von hHCN2..... | 73 |
| 3.4.2 | Sick Sinus Syndrom..... | 74 |
| 3.4.2.1 | Hintergrund..... | 74 |
| 3.4.2.2 | Sequenzierung der Exons 1-8 des hHCN2..... | 75 |
| 3.4.2.3 | Sequenzierung der Exons 1-8 des hHCN4..... | 75 |
| 4 | Diskussion..... | 77 |
| 4.1 | Heteromerisierung von HCN Kanälen..... | 77 |
| 4.2 | Glycosylierung von HCN Kanälen..... | 79 |
| 4.3 | Funktionelle Analyse..... | 81 |
| 4.3.1 | Modulation von mHCN2 durch cAMP..... | 81 |
| 4.3.2 | Aktivierungskinetik und Spannungsabhängigkeit..... | 82 |
| 4.4 | Genomische Analyse des hHCN2 und des hHCN4..... | 84 |
| 4.4.1 | Cayman Ataxie..... | 84 |
| 4.4.2 | Sick Sinus Syndrom..... | 85 |
| 5 | Zusammenfassung..... | 87 |
| 6 | Anhang..... | 89 |
| 6.1 | Restriktionsenzyme..... | 89 |
| 6.2 | Oligonukleotide..... | 89 |
| 6.3 | Abkürzungen der proteinogenen Aminosäuren..... | 92 |

| | | |
|----------|-----------------------------------|------------|
| 7 | Literaturverzeichnis | 93 |
| 7.1 | Zitierte Veröffentlichungen | 93 |
| 7.2 | Eigene Veröffentlichungen..... | 102 |
| 8 | Lebenslauf | 103 |

Abkürzungen

| | |
|---------------|---|
| A | Ampere |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |
| BES | N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure |
| bp | Basenpaar |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| cAMP | zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| cGMP | zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat |
| Ci | Curie (1Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Bq) |
| CIP | alkalische Phosphatase aus Kälberdarm |
| CNBD | Zyklonukleotid-Bindungstasche |
| CNG | durch zyklische Nukleotide aktiviert |
| cpm | Zähler pro Minute |
| cRNA | komplementäre Ribonukleinsäure |
| d | Tag |
| Da | Dalton |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | 2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECFP | Enhanced cyan fluorescent protein |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| EGFP | Enhanced green fluorescent protein |
| EtOH | Ethanol |
| f | femto |
| FBS | Fötales Rinderserum |
| h | Stunde(n), human |
| HCN | hyperpolarisations-aktiviert und zyklonukleotid-gesteuert |
| HEK | menschliche embryonale Nierenzelllinie, Klon293 |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure |
| I_h | hyperpolarisations-aktivierter Strom |
| K_a | Aktivierungskonstante |
| Ko-IP | Ko-Immunpräzipitation |

| | |
|-----------|---|
| LB | Luria-Bertani |
| μ | Mikro (10^{-6}) |
| M | Mega (10^6), molar |
| m | Milli (10^{-3}), murin |
| MEM | minimum essential medium |
| min | Minute(n) |
| MKS | Multiple Klonierungsstelle |
| MOPS | 3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid |
| ms | Millisekunde(n) |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaOAc | Natriumacetat |
| nm | Nanometer |
| nt | Nukleotid(e) |
| OD | Optische Dichte |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| RFP | Red fluorescent protein |
| PKA | Proteinkinase A |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rb | Aus Kaninchen stammend (rabbit) |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| s | Sekunde(n) |
| T | Teil(e) |
| TBE | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| Tris | α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin |
| U | Unit, Einheit |
| UV | Ultraviolett |
| $V_{0,5}$ | Spannung der halbmaximalen Aktivierung |
| Vol | Volumeneinheit(en) |

1 Einleitung

Biologische Schrittmacher sind hochspezialisierte Zellen, die in der Lage sind, rhythmische Prozesse zu steuern. Sie bestimmen diverse lebenswichtige Körperfunktionen. Der autonome Herzschlag, der Schlaf-/Wachrhythmus und die Atemfrequenz werden, wie auch die Sekretion von Hormonen, durch die periodische Abfolge von Aktionspotentialen initiiert und gesteuert. Bereits seit den späten siebziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts kennt man einen Ionenstrom, der entscheidend an der Ausbildung der rhythmischen Erregungen im Sinusknoten beteiligt ist. Dieser Strom wurde aufgrund seiner besonderen Eigenschaften als I_f („funny“) oder auch I_h („hyperpolarisations-aktiviert“) bezeichnet (Brown et al. 1977, Yanagihara and Irisawa 1980). Erstens wird er bei hyperpolarisiertem Membranpotential und nicht wie die meisten anderen spannungsabhängigen Ionenkanäle durch Depolarisation aktiviert. Zweitens werden sowohl Kalium- als auch Natriumionen geleitet, so dass es bei hyperpolarisierten Membranen zu einem depolarisierenden Natrium-Einwärtsstrom kommt und das rhythmische Feuern aufrecht erhalten wird. Das relative Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_K beträgt ca. 0,2-0,4 (Pape 1996). In Photorezeptoren (Attwell und Wilson 1980, Bader und Bertrand 1984, Barnes und Hille 1989) und Pyramidenneuronen des Hippocampus (Halliwell und Adams 1982) wurde ebenfalls ein durch Hyperpolarisation aktivierter Kationenstrom beobachtet, der den Namen I_q („queer“) erhielt. Studien sprechen dafür, dass es sich bei I_f , I_h und I_q um denselben Strom handelt (Übersicht bei Pape 1996). Im Folgenden wird daher nur noch die Bezeichnung I_h verwendet.

1.1 Rhythmische Erregungsbildung durch I_h

Im Gegensatz zur relativ niedrigen Frequenz biologischer Rhythmen, die auf der zeitlichen Änderung der Expression bestimmter Gruppen von Genen beruht (z.B. zirkadiane Rhythmen), feuern Schrittmacherzellen im Sinusknoten oder in Neuronen aufgrund des Zusammenwirkens von Ionenkanälen wesentlich schneller. I_h stellt einen Kalium/Natrium-Strom dar, der durch Hyperpolarisation der Zellmembran aktiviert wird. Im Folgenden werden die Eigenschaften von I_h im Herz und im Gehirn beschrieben.

1.1.1 Der kardiale I_h

Der autonome Herzschlag wird von spezialisierten Schrittmacherzellen im Sinusknoten kontrolliert, die vollkommen autonom spontane Aktionspotentiale generieren (DiFrancesco 1993). Diese Aktionspotentiale zeigen eine für Sinusknotenzellen typische langsame diastolische Depolarisationsphase, während der das Membranpotential langsam wieder bis zur Schwelle der Aktivierung von T-Typ Calciumkanälen ansteigt, wodurch das nächste Aktionspotential ausgelöst wird. Die diastolische Depolarisation wird maßgeblich durch die Aktivierung von I_h generiert. (Abb. 1.1-1).

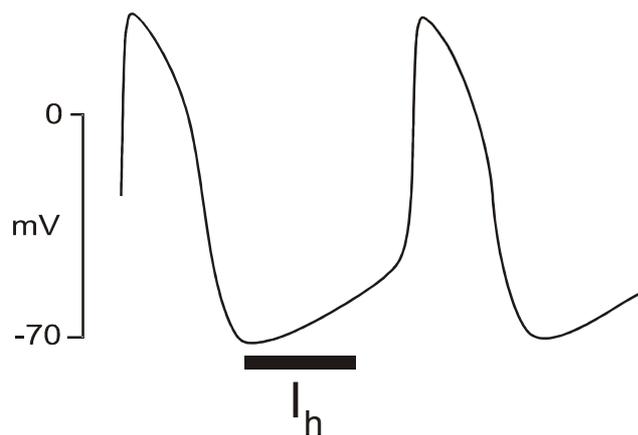


Abb. 1.1-1 Aktionspotential des Sinusknotens

Aktionspotential einer Sinusknotenzelle. Der schwarze Balken kennzeichnet den einwärts fließenden I_h . Abb. modifiziert nach Biel et al. (2002).

I_h ist nicht nur wichtig für die Generierung von Schrittmacherpotentialen, sondern auch für deren Regulation durch das autonome Nervensystem. Die Aktivierung des Sympathikus bewirkt über β_1 -Rezeptoren die Bildung von cAMP. Dadurch wird die Kanalaktivierung beschleunigt, da cAMP die Aktivierungsschwelle des Kanals zu positiveren Potentialen verschiebt (DiFrancesco et al. 1986, DiFrancesco und Tortora 1991) und so die diastolische Depolarisationsphase verkürzt wird. Als Konsequenz erhöht sich die Herzfrequenz (Brown et al. 1979). Bei betaadrenerger Stimulation des Herzens z.B. durch Adrenalin oder Isoprenalin wird über das G_s -Protein des Betaadrenorezeptors die Adenylatzyklase stimuliert und cAMP gebildet, das I_h aktiviert. Auf diese Weise kommt der positiv chronotrope Effekt der Betaadrenorezeptor-Agonisten zustande (DiFrancesco und Tortora 1991). Parasympathische Stimulation hingegen führt durch Erregung von muskarinischen Acetylcholinrezeptoren zur Reduktion des cAMP Spiegels in der Zelle und vermindert so die Offenwahrscheinlichkeit des I_h Kanals. Der I_h Strom nimmt ab und so erniedrigt sich die Herzfrequenz.

Ausser im Sinusknoten wurden I_h Ströme im sekundären Schrittmacher AV-Knoten (Noma et al. 1980) und in Purkinje-Fasern (DiFrancesco 1981) sowie auch in myokardialen Bereichen, die nicht zum Reizbildungs- und Reizleitungssystem gehören, nachgewiesen.

1.1.2 Der neuronale I_h

Im zentralen Nervensystem tritt I_h in einer Vielzahl von Neuronen auf (Lüthi und McCormick 1998, Pape 1996). Wie auch im Herz erfüllt I_h in einigen Teilen des Gehirns eine Schrittmacherfunktion und kontrolliert rhythmische Oszillationen von Einzelneuronen und neuronalen Netzwerken. Die Entstehung von neuronalen Rhythmen ist am intensivsten an thalamocorticalen Neuronen untersucht worden. Vom Thalamus aus werden sensorische Informationen zum Cortex weitergeleitet und so z.B. der Schlaf-/Wachrhythmus gesteuert (Lüthi und McCormick 1998, McCormick und Pape 1990). I_h ist dabei während der langsamen Depolarisationsphase eines Aktionspotentials aktiv (Abb. 1.1-2) und erwirkt zusammen mit T-Typ Calciumkanälen das rhythmische Feuern (McCormick und Pape 1990).

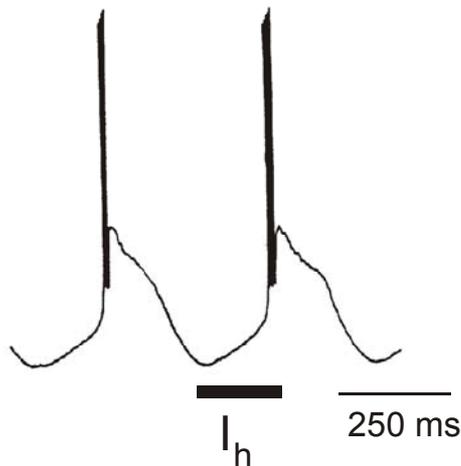


Abb. 1.1-2 I_h in Thalamusneuronen

Aktionspotentiale eines thalamischen Schrittmachenneurons. Der schwarze Balken kennzeichnet den einwärts fließenden I_h . Abb. Modifiziert nach Pape (1996).

Neben der Rolle als Schrittmacher trägt I_h zur Einstellung des Ruhepotentials bei und kann als Antwort auf überschüssende hyperpolarisierende Reize eine Depolarisation bewirken. Diese Depolarisation bewirkt z.B. in Photorezeptoren der Retina eine schnelle Adaptation auf helles Licht (Fain et al. 1978, Wollmuth und Hille 1992). In Dendriten moduliert I_h die Entstehung von EPSPs (exzitatorische postsynaptische Potentiale) durch Verstärkung des Einflusses distaler synaptischer Inputs (Robinson und Siegelbaum 2003). Darüberhinaus bewirkt I_h eine Modulation der synaptischen Plastizität (Beaumont und Zucker 2000). Die Rolle von I_h für das Ruhemembranpotential und thalamische Oszillationen wurde anhand HCN2 defizienter Mäuse bestätigt (Ludwig et al. 2003).

Im peripheren Nervensystem spielt I_h eine Rolle bei der Schmerzwahrnehmung und bei peripheren Neuropathien (Baker et al. 1987, Chaplan et al. 2003, Ingram und Williams 1994).

1.2 HCN Kanäle

1.2.1 Molekulare Identifizierung der HCN Gene

Im Jahr 1998 gelang es drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander, die Gene, die für Schrittmacherkanäle kodieren, zu klonieren.

Ludwig et al. (1998) untersuchten die EST (expressed sequence tag) Datenbank nach Sequenzen, die wie CNG Kanäle (Zyklonukleotid-gesteuerte Kanäle; Biel et al. 1999b) oder zyklonukleotidabhängige Proteinkinasen (Pfeifer et al. 1999) eine CNBD (Zyklonukleotid-Bindungstasche) enthalten, da vermutet wurde, dass I_h Kanäle durch direkte Bindung von zyklischen Nukleotiden aktiviert werden (DiFrancesco und Tortora 1991). Auf diese Weise konnten aus dem Mausgehirn drei homologe cDNAs isoliert werden (HAC1-3).

Durch einen Yeast-Two-Hybrid-Screen mit der SH3 Domäne der neuronalen Isoform von Src und einer cDNA Bibliothek aus Mausgehirn konnte von einer zweiten Gruppe per Zufall ein

als BCNG-1 bezeichneter Klon isoliert werden (Santoro et al. 1997). Nach einem Sequenzvergleich mit CNG Kanälen und Kaliumkanälen wurde dieser als ein durch zyklische Nukleotide modulierter Kaliumkanal bezeichnet. Später wurde durch funktionelle Expression gezeigt, dass es sich dabei tatsächlich um einen durch Hyperpolarisation aktivierten Ionenkanal handelte (Santoro et al. 1998).

Eine weitere full-length cDNA (HCN4) wurde schliesslich aus dem Herz verschiedener vertebrater Spezies kloniert (Ishii et al. 1999, Ludwig et al. 1999, Seifert et al. 1999).

Mit degenerierten Primern, um neue CNBDs zu amplifizieren, konnten Gauss et al. (1998) aus einer Seeigel-Sperma cDNA Bibliothek einen invertierten Vertreter dieser neuen Familie identifizieren (SPIH).

Eine einheitliche Nomenklatur der Kanäle wurde mit „hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated (HCN) channels“ geschaffen (Clapham 1998, Biel et al. 1999a).

1.2.2 Struktur der Säugetier-HCN Kanäle

Die vier Mitglieder der Säugetier-HCN-Familie (HCN1-HCN4) zeigen eine Sequenzhomologie von etwa 60% und sind strukturell eng mit CNG- und Kaliumkanälen verwandt (Abb. 1.2-1). Im Bereich vom ersten transmembranären Segment S1 bis zur CNBD ist die Homologie noch grösser, hier sind die Kanäle zu 80 bis 90% identisch, während N- und C-Terminus der Gene nur wenig Ähnlichkeiten zeigen, sowohl in Bezug auf ihre Länge als auch auf ihre Sequenz. Durch Hydrophobizitätsanalysen wurde gezeigt, dass die HCN Kanäle zur Familie der spannungsabhängigen Kaliumkanäle gehören, wodurch das Modell in Abb. 1.2-2 postuliert werden konnte.

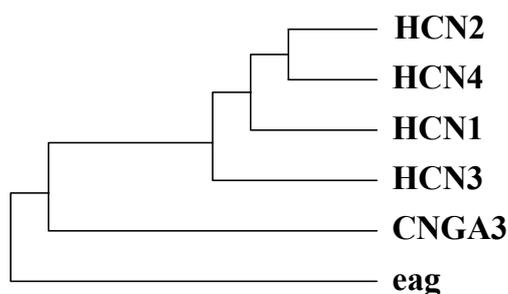


Abb. 1.2-1 Phylogenetischer Stammbaum der HCN Kanäle und verwandter Kanäle

Dargestellt sind die verwandtschaftlichen Beziehungen der HCN Kanäle untereinander wie auch zu CNG Kanälen (exemplarisch am CNGA3) und zu Kaliumkanälen (exemplarisch am eag Kanal der Maus). Der Stammbaum wurde durch Vergleich der Domänen S1-S6 und der CNBDs der Kanäle erstellt.

Wie spannungsabhängige Kaliumkanäle (Yellen 2002) bestehen die HCN Kanäle aus sechs transmembranären Helices, wobei S4 den positiv geladenen Spannungssensor darstellt, einer ionenleitenden Pore und den intrazellulär gelegenen N- und C-Termini. Die C-terminale CNBD ist wie bei CNG Kanälen von S6 durch den sogenannten C-Linker abgetrennt (Zong et al. 1998) (Abb. 1.2-2). Wie Kaliumkanäle (Doyle et al. 1998) assoziieren sich die HCN

Untereinheiten wahrscheinlich zu Tetrameren (Abb. 1.2-2). Die Vielfalt des nativen I_h kommt einerseits durch die Expression der vier HCN Gene zustande, zum anderen wurde durch erste Studien die Vermutung unterstützt, dass diese durch Bildung von Heterotetrameren aus verschiedenen HCN Isoformen zu erklären ist (Chen et al. 2001, Proenza et al. 2002, Ulens et al. 2001, Xue et al. 2002, Er et al. 2003). Bislang fehlten allerdings *in vivo* Studien und systematische biochemische Daten.

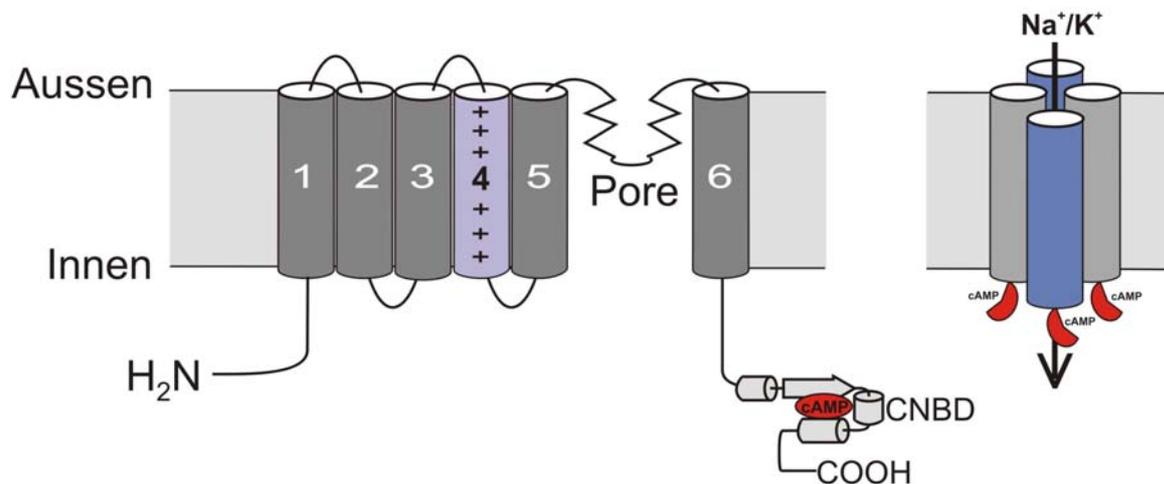


Abb. 1.2-2 Modell der transmembranären Struktur von HCN Kanälen

Dargestellt sind die sechs transmembranären Domänen S1 bis S6, wobei S4 den positiv geladenen Spannungssensor darstellt. Zwischen S5 und S6 liegt die Kanalpore. N- und C-Terminus liegen intrazellulär und im C-Terminus ist die Bindungstasche für zyklische Nukleotide (CNBD) ausgebildet. HCN Kanäle bilden wahrscheinlich Heterotetramere. Im rechten Bildteil sind vier HCN Untereinheiten dargestellt, die sich um die ionenleitende (Na^+ und K^+) Pore anordnen. Die CNBDs der vier Untereinheiten sind rot hervorgehoben.

1.2.3 Gewebsexpression der HCN Kanäle

HCN Kanäle werden in unterschiedlichem Ausmass v.a. im Herz, im Gehirn und in der Retina exprimiert. In den folgenden Abschnitten wird die genaue Verteilung näher beschrieben.

1.2.3.1 Gewebsexpression der HCN Kanäle im Herz

Im Herz konnten HCN1, HCN2 und HCN4 identifiziert werden (Ishii et al. 1999, Ludwig et al. 1998; 1999, Moosmang et al. 2001, Moroni et al. 2001, Santoro et al. 1998, Seifert et al. 1999, Shi et al. 1999, Yasui et al. 2001).

HCN2 wird ubiquitär im Herz exprimiert. Transkripte finden sich im Sinusknoten, vor allem aber in atrialen und ventrikulären Myozyten. HCN2 defiziente Mäuse zeigen kardiale Arrhythmien ausgehend vom Sinusknoten (Ludwig et al. 2003).

HCN4 ist die dominante HCN Isoform im Sinusknoten, wird aber geringer auch in atrialen und ventrikulären Myozyten exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass HCN4 Expression in Zusammenhang mit spontan aktiven Zellen des Reizleitungsgewebes zu bringen ist, wohingegen HCN2 Expression zur Funktion der nicht spontan aktiven Myozyten beiträgt. Die Deletion des HCN4 Gens in Mäusen führt zum Tod des Embryos. HCN4 scheint somit für die Entwicklung des kardialen Schrittmacherapparates essentiell zu sein (Herrmann et al. 2003).

Der HCN1 Kanal wird im Herz nur in Spuren exprimiert und es ist fraglich, ob er grosse Relevanz für kardiale Funktionen besitzt.

1.2.3.2 Gewebsexpression der HCN Kanäle im Gehirn

Alle vier HCN Isoformen werden im Gehirn von Säugetieren exprimiert (Monteggia et al. 2000, Moosmang et al. 1999, Santoro et al. 2000), wobei HCN3 die geringsten Expressionsraten zeigt. HCN2 ist in den meisten Gehirnregionen stark exprimiert, die Anwesenheit von HCN1 und HCN4 beschränkt sich auf spezifische Regionen.

Die HCN1 Untereinheit wurde in Pyramidenneuronen des Neocortex, in CA1 und CA3 Pyramidenneuronen des Hippocampus (etwas mehr in CA1) und in Neuronen des Stratum oriens und des Stratum lucidum des Hippocampus gefunden. Sehr schwach wird HCN1 ausserdem im Gyrus dentatus exprimiert. Viele HCN1 Transkripte finden sich in den inhibitorischen Korbzellen und Purkinje-Neuronen des Kleinhirns und im Bulbus olfactorius.

HCN2 wurde ebenfalls in CA1 und CA3 Pyramidenneuronen (etwas mehr in CA3) und in Neuronen des Stratum oriens und des Stratum lucidum des Hippocampus gefunden. Im Thalamus sind HCN2 und HCN4 hoch in den exzitatorischen thalamocorticalen Relay Neuronen exprimiert und HCN2 zudem in inhibitorischen thalamischen Neuronen. Starke Signale ergaben sich ausserdem im Bulbus olfactorius und im Kleinhirn. HCN2 wird darüber hinaus in vielen weiteren Regionen des Gehirns exprimiert.

HCN3 wird sehr schwach im gesamten Gehirn exprimiert. Lediglich im Bulbus olfactorius lässt sich HCN3 in grösseren Mengen nachweisen.

HCN4 wird neben dem Thalamus und dem Bulbus olfactorius schwach in Hippocampus und Neocortex exprimiert.

Die Daten zur Expression der HCN Kanäle im Gehirn spiegeln lediglich die Anwesenheit von mRNA wider. Um jedoch gesicherte Erkenntnisse zur Lokalisation in den teilweise sehr langen Neuronen zu gewinnen, wäre es nötig, Untersuchungen auf Proteinebene durchzuführen.

Im Gehirn scheint die funktionelle Heterogenität von I_h in etwa die molekulare Heterogenität der einzelnen HCN Isoformen wiederzuspiegeln. So ist der schnell aktivierende HCN1 sehr stark in CA1 Neuronen des Hippocampus exprimiert, wo ein sehr schnell aktivierender I_h nachgewiesen wurde. Thalamocorticale Relay Neurone, die einen langsamer aktivierenden I_h zeigen, exprimieren vor allem die langsamer aktivierenden Isoformen HCN2 und HCN4.

1.2.3.3 Gewebsexpression der HCN Kanäle in der Retina

In Photorezeptoren kommt fast nur HCN1 vor. HCN2 und HCN3 konnten in der inneren Körnerschicht nachgewiesen werden (Demontis et al. 2002, Moosmang et al. 2001).

1.2.4 Funktionelle Eigenschaften der HCN Kanäle

Nach heterologer Expression der HCN cDNAs z.B. in HEK Zellen bilden sich Ionenkanäle, die die grundlegenden Eigenschaften des nativen I_h zeigen: Aktivierung durch Hyperpolarisation, Modulation durch zyklische Nukleotide, Leitung von Natrium- und Kaliumionen und Blockade durch extrazelluläre Cäsiumionen (Ishii et al. 1999, Ludwig et al. 1998, 1999, Moosmang et al. 2001, Santoro et al. 1998, Seifert et al. 1999). Die in verschiedenen Zellen beobachteten I_h Ströme unterscheiden sich hauptsächlich in drei Eigenschaften voneinander: ihrer Aktivierungskinetik, der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung (3.3.2) und im Ausmass der Modulation durch zyklische Nukleotide (1.2.4.2).

1.2.4.1 Aktivierung durch Hyperpolarisation

Anders als die verwandten spannungsabhängigen Kationenkanäle aktivieren die HCN Kanäle bei hyperpolarisierten statt bei depolarisierten Membranpotentialen. Überraschenderweise besitzen HCN Kanäle wie die durch Depolarisation aktivierten Kanäle in S4 eine Abfolge von positiv geladenen Aminosäuren (Arginin und Lysin). Diese fungieren bei depolarisationsaktivierten Kanälen als sogenannter Spannungssensor (Horn 2002). In einer neueren Studie konnten erste Einblicke in den Mechanismus gewonnen werden, über den das gleiche positiv geladene Segment auch eine Aktivierung durch Hyperpolarisation vermitteln kann (Männikkö et al. 2002). Dabei bewegt sich der Spannungssensor S4 bei Membranhyperpolarisation zum Zellinneren hin, wodurch der Kanal geöffnet wird. Bei depolarisierten Potentialen wird der Kanal durch eine Auswärtsbewegung von S4 wieder geschlossen. Wie das Öffnen bzw. Schliessen der Kanäle durch die Bewegung von S4 zustande kommt, ist noch unklar. Spannungsabhängige Kaliumkanäle wie der Shaker Kanal reagieren auf diese Bewegungen von S4 entgegengesetzt, d.h. sie werden durch die Auswärtsbewegung geöffnet. Der Mechanismus der Kopplung der S4-Bewegung an die Kanalöffnung bzw. -schliessung muss sich somit von dem bei spannungsabhängigen Kaliumkanälen beobachteten unterscheiden.

Die HCN Kanäle unterscheiden sich in Bezug auf die Spannung ihrer halbmaximalen Aktivierung ($V_{0,5}$). $V_{0,5}$ ist ein Mass für den Spannungsbereich, in dem die Kanäle aktiviert werden können. Die in der Literatur beschriebenen Werte variieren sehr stark. Sie liegen zwischen -70mV und -100mV , wobei HCN2 tendentiell bei negativeren Potentialen aktiviert wird als HCN4 und HCN1 (Ishii et al. 1999, Ludwig et al. 1998, Moroni et al. 2000).

Die HCN Kanäle unterscheiden sich in der Geschwindigkeit ihrer Aktivierung. HCN1 ist mit einer Aktivierungskonstante von $\tau_{\text{akt}} = 100\text{-}300\text{ms}$ (Santoro et al. 1998, 2000) der am schnellsten aktivierbare Kanal. HCN2 nimmt mit $\tau_{\text{akt}} = 200\text{-}500\text{ms}$ eine intermediäre Position ein (Ludwig et al. 1998, Santoro et al. 2000), während HCN4 mit Werten für τ_{akt} von wenigen hundert Millisekunden bis zu mehreren Sekunden der „langsamste“ Kanal ist (Ishii et al.

1999, Ludwig et al. 1999, Seifert et al. 1999). HCN3 wurde in diesem Zusammenhang bisher nur ungenügend beschrieben. Die Aktivierungskinetik wird durch verschiedene Domänen innerhalb der HCN Kanäle gesteuert, u.a. von S1 und dem Linker zwischen S1 und S2 (Ishii et al. 2001).

1.2.4.2 Kanalmodulation

cAMP beschleunigt die Aktivierungskinetik von nativen und klonierten HCN Kanälen im Bereich physiologischer Konzentrationen ($K_a = 60\text{-}500\text{nM}$; Ludwig et al. 1998, Wang et al. 2001) und verschiebt $V_{0,5}$ um ca. 2 bis 20mV zu positiveren Potentialen. Auch cGMP kann auf diese Weise die Kanäle aktivieren, allerdings nur in 10 bis 100-fach höheren Konzentrationen als cAMP ($K_a = 6\mu\text{M}$ für HCN2; Ludwig et al. 1998). Bei HCN2 (12-14mV; Ludwig et al. 1998, 1999) und HCN4 (11-23mV; Ishii et al. 1999, Ludwig et al. 1999, Seifert et al. 1999) ist die Verschiebung durch cAMP am deutlichsten, während HCN1 nur minimal, wenn überhaupt, durch cAMP beeinflusst wird (2mV bis 5,8mV; Santoro et al. 1998, Wainger et al. 2001).

Die molekulare Wirkung von cAMP wird durch die Aufhebung der inhibitorischen Wirkung der CNBD auf den Kanal erklärt (Wainger et al. 2001, Wang et al. 2001). In Abwesenheit von cAMP interagiert der C-Terminus mit der Kernregion des Kanals, verschiebt so die Aktivierung in Richtung hyperpolarisierender Membranpotentiale und verhindert dadurch eine Kanalöffnung im physiologischen Bereich. Die Unterschiede in der Reaktion der HCN Kanäle auf cAMP kommen dadurch zustande, dass ihre CNBDs das „gating“ unterschiedlich stark inhibieren und so cAMP einen mehr oder weniger grossen Effekt auslösen kann.

Neben zyklischen Nukleotiden werden die Eigenschaften der HCN Kanäle auch durch intrazelluläre Protonen moduliert (Munsch und Pape 1999). Im sauren Milieu wird die Aktivierungskurve in Richtung hyperpolarisierter Spannungen verschoben und die Kinetik verlangsamt. Verantwortlich für diese Reaktion auf Protonen ist im murinen HCN2 ein Histidinrest an der Position 321 (His321), der sich am intrazellulären Ende von S4 befindet (Zong et al. 2001). Hohe Konzentrationen an extrazellulären Protonen verschieben die Aktivierungskurve dagegen zu depolarisierten Potentialen, was bei Ratten für die Geschmacksempfindung „sauer“ von Bedeutung ist (Stevens et al. 2001).

1.2.4.3 Ionenselektivität

I_h kommt durch Leitung von Kalium- und Natriumionen zustande, wobei etwa viermal soviel Kalium- wie Natriumionen fließen (Ho et al. 1994, Wollmuth und Hille 1992). Auch die heterolog exprimierten HCN Kanäle leiten diese beiden Ionen in einem ähnlichen Verhältnis ($P_{Na}/P_K = 0,15\text{-}0,25$; Gauss et al. 1998, Ludwig et al. 1998, Santoro et al. 1998). Aus dem Permeabilitätsverhältnis ergibt sich ein Umkehrpotential von -40 bis -25 mV. Dadurch kommt es bei physiologischen Membranpotentialen zu einem Netto-Einstrom von Natrium in die Zelle und durch die Membrandepolarisation zur Auslösung eines Aktionspotentials. Andere einwertige Ionen wie Lithiumionen werden nicht geleitet und durch Cäsiumionen kommt es gar zu einer Blockade der Kanäle. Auch zweiwertige Ionen und Anionen können

die HCN Kanäle nicht passieren. Wie bei Kaliumkanälen findet sich innerhalb der Pore von HCN Kanälen ein Kalium-Selektivitätsfilter bestehend aus der Aminosäuresequenz GYG (Glycin-Tyrosin-Glycin). In tetrameren Kaliumkanälen bilden die vier GYG Motive den engsten Teil der Pore, wodurch die Selektivität für Kaliumionen zustande kommt (Lu et al. 2001, Zhou et al. 2001). HCN Kanäle leiten neben Kalium- auch Natriumionen. Vermutlich ist die Pore der HCN Kanäle im Vergleich zu den Kaliumkanälen sterisch flexibler strukturiert, wodurch das grössere Natriumion passieren kann (Biel et al. 1999a).

1.3 Ziel der Arbeit

1. Ist die Bildung heteromerer HCN Kanäle möglich?

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mögliche Interaktionen zwischen den HCN Kanälen durch konfokale Mikroskopie, Ko-Immunpräzipitationen und die elektrophysiologischen Eigenschaften von koexprimierten HCN Isoformen aufzuklären.

2. Werden HCN Kanäle glycosyliert und welche Rolle spielt diese für die Funktion?

Da es erst zur Ausprägung der typischen HCN-Ströme kommt, wenn die Kanalproteine in die Plasmamembran integriert vorliegen, wurde die posttranslationale Glycosylierung als möglicher Targetingmechanismus näher untersucht. Durch Charakterisierung einer glycosylierungsdefizienten Mutante des HCN2 Kanals sollte die Bedeutung einer Glycosylierung herausgestellt werden.

3. Welche Kanalteile bestimmen die Geschwindigkeit und die Spannungsabhängigkeit der Kanalöffnung?

Anhand des HCN2 Kanals und des HCN1 Kanals sollten die funktionellen Eigenschaften einzelner cDNA-Bereiche näher charakterisiert werden. Mittels Mutagenese wurden rekombinante HCN2 Konstrukte entwickelt, um die cAMP-Abhängigkeit des Ionenkanals bestimmten Aminosäuren zuzuordnen. Durch Bildung von Chimären zwischen HCN1 und HCN2 sollten des weiteren die Einflüsse von N- und C-Terminus sowie der Kernregion der HCN Kanäle auf die Spannungsabhängigkeit und die Aktivierungskinetik untersucht werden.

4. Können Defekte in HCN Genen zu „Channelopathien“ führen?

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, die Möglichkeit einer Krankheitsmanifestation aufgrund eines HCN Defekts anhand von zwei Patientenkollektiven mit zerebralen bzw. kardialen Dysfunktionen zu untersuchen. Hierzu sollten Exons und Introns des HCN2 einer Gruppe von Patienten, die an Cayman Ataxie leiden, bzw. Exons des HCN2 und des HCN4 von Sick Sinus Syndrom Patienten durch Sequenzanalyse auf Punktmutationen bzw. durch Southern Blot Analyse auf grössere Deletionen hin untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Plasmide

Die hier verwendeten Plasmide sind Abkömmlinge des synthetisch hergestellten pBR322 (Bolivar et al.1977).

2.1.1 pcDNA3 und pcDNA3.1 Myc

Diese Plasmide (Invitrogen) dienen als Expressionsvektoren. Als solche können sie sowohl in *E.coli* als auch in eukaryotischen Zellen zur heterologen Expression von rekombinanten Proteinen verwendet werden. Die Transkription der inklonierten cDNA steht in beiden Fällen unter der Kontrolle von starken viralen Promotoren, was eine sehr hohe Expressionsrate ermöglicht. Desweiteren enthalten die Vektoren ein Polyadenylierungssignal, welches die Synthese eines Poly-A-Schwanzes an das 3'-Ende der mRNA und damit die Termination der Transkription steuert. Neben dem Ampicillinresistenzgen enthält pcDNA3 ein Neomycinresistenzgen zur Selektion von stabilen Transformanten, welches für die Phosphotransferase (Transposon Tn5) kodiert. Eukaryotische Zellen, die mit pcDNA3 transfiziert wurden, können in Gegenwart hoher Konzentrationen Geneticin (G418) überleben und so selektioniert werden.

Das pcDNA3.1 Myc Plasmid enthält C-terminal zur MKS das Gen für ein Myc-Epitop. Es wurde zur Klonierung von Fusionskonstrukten aus den HCN Kanälen und dem Myc-Epitop verwendet. Nach heterologer Expression entstanden so Fusionsproteine aus HCN Kanälen und Myc (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu), so dass mittels eines monoklonalen Anti-Myc-Antikörpers Immunpräzipitationen durchgeführt werden konnten. Die Klonierung ist in 2.1.4 beschrieben.

2.1.2 pIRES2-EGFP

Zur Lokalisierung von Kanalproteinen in HEK Zellen wurde mHCN2 cDNA in diesen Vektor (Clontech) kloniert. Es werden dadurch nach Transfektion des Plasmids sowohl das HCN Protein als auch EGFP in der gleichen Zelle exprimiert. Durch eine eigene Ribosomenbindungsstelle (IRES: internal ribosome entry site) für das EGFP Gen entsteht kein Fusionsprotein und somit bleiben die HCN Eigenschaften unangetastet, was eine unbeeinträchtigte elektrophysiologische Charakterisierung erlaubt.

2.1.3 pCR[®]2.1-TOPO[®]

Dieser Vektor (Invitrogen) ist geeignet zum Subklonieren von PCR-Stücken, die mit *Taq*-Polymerase amplifiziert wurden. Durch eine Fragment-unabhängige Transferase-Aktivität der *Taq* werden einzelne Deoxyadenosine (A) an die 3'-Enden der PCR-Produkte angefügt. Der linearisierte pCR[®]2.1-TOPO[®] hat einzelne überhängende 3'-Deoxythymidin (T)-Enden, so dass die Fragmente effektiv ligiert werden. An die T-Überhänge des Vektors ist kovalent

Topoisomerase I gebunden. Diese Bindung wird bei Anwesenheit eines DNA-Fragments mit A-Überhängen gespalten und das freigesetzte Enzym kann das PCR-Stück und den Vektor ligieren. Für diese Arbeit wurde der Vektor zum Sequenzieren von Bereichen aus dem hHCN2 Gen verwendet.

2.1.4 pDsRed1-N1, pEGFP-N1-N3, pECFP-Mem

Diese als „Living colours fluorescent protein vectors“ bezeichneten Plasmide (Clontech) wurden zur Lokalisierung von HCN Kanälen und deren Mutanten in HEK Zellen benutzt. Die Gene der vier HCN Kanäle (HCN1-4) wurden im Leserahmen mit den Genen für grün- bzw. rot-fluoreszierende Proteine (EGFP modifiziert aus *Aequorea victoria*, RFP aus *Discosoma sp.*) kloniert, was nach heterologer Expression in HEK Zellen zur Bildung von fluoreszierenden Fusionsproteinen führte. Anhand der Fluoreszenz in der Zelle nach UV-Anregung konnte unter dem Mikroskop die zelluläre Verteilung von Wildtyp- und mutanten Proteinen untersucht werden. Da die Markergene EGFP und RFP nach dem Einklonieren eines Fremdgens unter dem gleichen Promotor wie dieses stehen, muss durch PCR das STOP-Kodon des HCN Gens deletiert werden. Gleichzeitig wird an diese Stelle eine neue Schnittstelle aus der multiplen Klonierungsstelle des neuen Vektors eingefügt. Der grösste Teil der zu klonierenden Gene wurde durch Restriktionsverdau (2.4.1) mit Enzym1 und Enzym2 (Abb. 3.1-1) gewonnen und zusammen mit dem mit Enzym2 und Enzym4 geschnittenen PCR-Fragment in die mit Enzym1 und Enzym4 geschnittenen und dephosphorylierten (2.4.2) Vektoren ligiert (2.4.3). Die Klonierung in pcDNA3.1 Myc erfolgte analog. pECFP-Mem kodiert ein Fusionsprotein aus einem N-terminalen Fragment von Neuromodulin und ECFP, einer blau fluoreszierenden Variante von EGFP. Das Neuromodulinfragment enthält ein Signal für posttranslationale Palmitoylierung von Cystein, wodurch das ECFP zur Zellmembran geleitet wird. Dieses Konstrukt wurde zur Markierung von Zellmembranen in HEK Zellen bei mikroskopischen Experimenten verwendet.

2.2 Reinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.2.1 Präzipitation von Nukleinsäuren

Zur Aufkonzentrierung und Reinigung wurden Plasmide und DNA-Fragmente mit Ethanol gefällt (modifiziert nach Sambrook et al. 1989). Die wässrige Nukleinsäurelösung wurde hierzu mit 1/10 Volumen NaOAc 5M und dem 2,5 fachen Volumen EtOH 99,9%, -20°C versetzt und 10 min bei -80°C inkubiert. Die gefällte DNA wurde durch Abzentrifugieren (12000 x g, 15min, 4°C) abgetrennt, der Überstand dekantiert und das Pellet mit EtOH 70% gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet 5min in einer Vakuumzentrifuge (Speedvac) getrocknet und in einer geringen Menge Wasser aufgenommen.

2.2.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Mit Hilfe einer Phenol-Chloroform Mischung können störende Proteine wie Enzyme aus wässrigen Nukleinsäurelösungen entfernt werden. Diese wurde 1:1 mit Phenol-Chloroform-

Isoamylalkohol (25:24:1, Roth) versetzt, bis zur Emulsionsbildung gerüttelt und bis zur Phasentrennung abzentrifugiert (12000 x g, 5min). Die Nukleinsäuren in der wässrigen Oberphase wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Ethanol präzipitiert (2.2.1).

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren absorbieren elektromagnetische Strahlung im Bereich von 250–270 nm, was auf die aromatischen Ringsysteme der DNA-Basen zurückzuführen ist. Somit kann die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration durch Extinktionsmessung unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes erfolgen. Bei monochromatischem Licht der Wellenlänge 260 nm und einer Schichtdicke von 1cm entspricht eine gemessene Extinktion von 1:

- einer DNA-Konzentration (doppelsträngig) von 50µg/ml
- einer Oligonukleotidkonzentration (einzelssträngig) von 33µg/ml

Die Reinheit bzw. Freiheit von Proteinen der DNA wurde aus dem Verhältnis OD_{260}/OD_{280} abgeschätzt. Dieser Quotient sollte grösser als 1,7 sein.

2.3 Isolierung von Plasmid-DNA

2.3.1 Schnellisolierung von Plasmid-DNA (Alkalische Lyse)

Zur Schnellisolierung von Plasmid-DNA wurden die plasmidtragenden Bakterien (2.9) in NaOH/SDS lysiert, wobei Proteine und DNA denaturiert werden. Die Methode (Birnboim und Doly, 1979) basiert darauf, dass durch anschliessende Neutralisation mit Kaliumacetat die relativ kleine Plasmid-DNA wieder renaturiert, während das wesentlich grössere Bakterienchromosom denaturiert bleibt und mit den übrigen Zelltrümmern abgetrennt werden kann. Die in Lösung befindliche Plasmid-DNA wird mit Isopropanol gefällt und durch Waschen mit EtOH 70% von in Isopropanol unlöslichen Salzen befreit.

Ausgehend von einer *E.coli* Einzelkolonie wurde eine 7ml Übernachtskultur bei 37°C und 225rpm in LB⁺-Medium gestartet. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation geerntet (3500 x g, 10min, RT) und in 250µl Resuspensionspuffer MP1 (Tris-HCL 50mM pH8,0, EDTA 10mM, RnaseA 100µg/ml) aufgenommen. Die Zellen wurden durch fünfminütige Inkubation mit alkalischem Lysepuffer MP2 (NaOH 200mM, SDS 1%) aufgeschlossen, danach der Ansatz durch Zugabe von MP3 (Kaliumacetat 3M pH5,5) 15 min auf Eis neutralisiert. Nach Zentrifugation (12000 x g, 15min, 4°C) wurde der klare Überstand mit Isopropanol gefällt, das Pellet mit Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 20µl H₂O aufgenommen.

Dieses zeitsparende Verfahren ermöglichte die Suche nach korrekten rekombinanten Klonen, da mit der gewonnenen Plasmid-DNA Restriktions- (2.4.1) und Sequenzanalysen (2.8) durchgeführt werden konnten.

2.3.2 Plasmidisolierung und –reinigung durch Säulenchromatographie

Zur Gewinnung grösserer Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurde das Kit „Nucleobond AX“ (Macherey-Nagel) verwendet. Die Methode beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979; 2.3.1) in Verbindung mit einer chromatographischen Reinigung über eine Anionenaustauscher-Säule.

Mit einer 7ml Vorkultur ausgehend von einer *E.coli* Einzelkolonie wurde unter Antibiotikum-Zusatz eine 100ml LB⁺-Kultur angeimpft und über Nacht bei 37°C mit 225rpm geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die Kultur durch Zentrifugation geerntet (5000 x g, 10min, 4°C) und das Bakterienpellet in 12ml Puffer S1 (Tris/HCl 50mM, EDTA 10mM, Rnase A 100µg/ml pH8,0, 4°C) resuspendiert. Nach Zugabe von 12ml Puffer S2 (NaOH 200mM, SDS 1%) wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und bei RT 5min inkubiert. Durch Zugabe von 12ml Puffer S3 (Kaliumacetat 2,8mM pH5,1) kam es zur Neutralisation der Präparation und nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (75000 x g, 40min, 4°C). Der klare Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, wurde auf die vorher mit 6ml Puffer N2 (Tris 100mM, EtOH 15%, KCl 900mM pH6,3, Triton X-100 0,15%) äquilibrierte AX 500 Säule aufgebracht. Nach zweimaligem Waschen mit Puffer N3 (Tris 100mM, EtOH 15%, KCl 1150mM pH6,3) wurde die Plasmid-DNA mit 15ml Puffer N5 (Tris 100mM, EtOH 15%, KCl 1000mM pH6,3) eluiert, mit 10,5ml Isopropanol gefällt, abzentrifugiert (10000 x g, 30min, 4°C), mit 5ml Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation im Vakuum getrocknet. Die erhaltene hochreine DNA wurde in 500µl H₂O aufgenommen und zur Konzentrationsbestimmung bei 260nm photometrisch vermessen. Die Qualität wurde durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung überprüft.

Die auf diesem Weg gereinigte Plasmid-DNA wurde z.B. für PCR-Reaktionen, zur Transfektion eukaryotischer Zellen oder zur Konstruktion neuer rekombinanter Plasmide verwendet.

2.4 Enzymatische Modifikation von DNA

2.4.1 Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen (Synonym: Restriktionsenzyme) sind Endo-Desoxyribonukleasen, die spezifische Basensequenzen innerhalb einer DNA-Doppelhelix erkennen und beide DNA-Stränge spalten (Sambrook et al., 1989). Die hier verwendeten Typ II-Restriktionsenzyme spalten ihr Substrat innerhalb der meist palindromischen Erkennungssequenz, so dass Fragmente mit definierten Enden entstehen. Je nach Enzym erfolgt die Spaltung an gegenüberliegenden Positionen des DNA-Doppelstranges oder versetzt, so dass glatte Enden (blunt ends) oder überhängende Enden (sticky ends) entstehen. Die bei einer Spaltung entstehenden DNA-Enden besitzen eine 5'-Phosphat- und eine 3'-OH-Gruppe, was die spätere enzymatische Neuverknüpfung (Ligation, 2.4.3) kompatibler Enden ermöglicht. Restriktionsenzyme werden durch einen Buchstabencode nach dem Organismus benannt, aus dem sie isoliert wurden. Für diese Arbeit wurden Restriktionsenzyme für die Präparation von

DNA-Fragmenten zur Konstruktion rekombinanter Plasmide, für die Linearisierung von Plasmiden zur Transfektion von eukaryotischen Zellen (2.12.4) und zur Restriktionsanalyse rekombinanter Plasmide verwendet. Die verwendeten Enzyme der Fa.NEB, die entsprechenden Puffer, die Erkennungssequenzen sowie die Inkubationstemperaturen sind im Anhang (6.1) aufgeführt.

Der Restriktionsansatz wurde bei optimaler Temperatur 1,5h (analytischer Ansatz) bzw. 3-15h (präparativer Ansatz) inkubiert und danach durch Gelelektrophorese (2.6) die Restriktion überprüft bzw. Fragmente isoliert. Eine Einheit (1U) Restriktionsendonukleaseaktivität entspricht der Menge Enzym, die nötig ist, um 1µg DNA/h quantitativ zu schneiden.

2.4.2 Dephosphorylierung von DNA durch alkalische Phosphatase

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (**calf intestine phosphatase**: CIP) spaltet endständige 5'-Phosphatgruppen von DNA-Molekülen ab. Die Dephosphorylierung von DNA-Molekülen verhindert die durch DNA-Ligase katalysierte Zirkularisierung linearer, doppelsträngiger DNA-Moleküle, da dieses Enzym einen endständigen 5'-Phosphatrest benötigt. So wird die Religierung eines linearisierten Vektors unterbunden, was die Klonierungseffizienz der einzubauenden Fremd-DNA erhöht.

Nach Linearisierung eines Vektors im präparativen Massstab wurden direkt zum Reaktionsansatz 10U CIP (NEB) und 0,1Vol 10xNEB3 zugegeben. Dieser Ansatz wurde 1h bei 37°C inkubiert und danach das Enzym durch Hitze (75°C, 10min) inaktiviert. Derart präpariert wurde die Vektor-DNA über ein Agarosegel gereinigt und eluiert (2.6.4) und für Ligationsansätze (2.4.3) verwendet.

2.4.3 Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

T4-DNA-Ligase (NEB) katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 3'-Hydroxyl- und einem 5'-Phosphatende von doppelsträngigen DNA-Fragmenten (Weiss et al., 1968). Sie wurde eingesetzt, um Fremd-DNA und Vektor-DNA kovalent zu rekombinanter Plasmid-DNA zu verknüpfen.

Ca. 50fMol linearisierter, dephosphorylierter Vektor und ca. 100fMol Fremd-DNA wurden mit Ligasepuffer (NEB) und T4-DNA-Ligase (NEB) 3-16h bei 16°C inkubiert. Das entstandene rekombinante Plasmid wurde anschliessend in *E.coli* transformiert (2.1.4).

2.5 Adapterligation

Um Gene N- oder C-terminal zu verkürzen, wurden speziell konstruierte Adaptern eingesetzt. Dazu wurden von der Fa. MWG 5'-kinasierte Oligonukleotide synthetisiert, die zueinander in der Kernregion komplementär waren. Die Randstücke entsprachen den Überhängen ausgewählter Restriktionsenzyme. Je nach Einsatzgebiet (N- oder C-terminal) enthielten die Oligonukleotide die Kodons für einen Transkriptionsstart (ATG) oder ein STOP-Kodon. Zur Überprüfung der Ligation wurden ausserdem Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme integriert.

Je 100pMol Oligonukleotid wurden zusammenpipettiert und 2min im Wasserbad auf 75°C erhitzt. Nach 30 minütigem Abkühlen in einem Becherglas, das mit dem vorher verwendeten Wasser gefüllt war, wurden 2µl der Mischung zur Ligation in ein Plasmid, das mit dem den Überhängen des Adapters entsprechenden Enzym geschnitten war, eingesetzt (2.4.3).

2.6 Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten

Nukleinsäuren werden bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld im Gel nach Masse und Konformation (linear, offenzirkulär bzw. superhelikal) aufgetrennt. Aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats sind Nukleinsäuren negativ geladen und wandern daher bei der Elektrophorese zur Anode. Je grösser die Moleküle sind, desto geringer ist die Laufgeschwindigkeit. Durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid, mit welchem die Gelmatrix versetzt wurde, können die aufgetrennten Fragmente im UV-Licht (302nm) als diskrete Bande sichtbar gemacht werden. Ein DNA-Standard (1kb Ladder, Gibco) ermöglicht die Grössen- und Konzentrationsabschätzung durch Vergleich der Laufstrecken und Fluoreszenzintensitäten. Um den Verlauf der Elektrophorese bei Tageslicht zu kontrollieren, wurden dem Auftragspuffer farbige Marker zugegeben: Bromphenolblau, das mit DNA-Fragmenten von 10-100bp wandert und Xylencyanol, das in Höhe von 5kb-Banden läuft.

2.6.1 Lösungen

| 10xTBE | | Probenpuffer 6xdye | |
|-------------------|------|---------------------------|-------|
| Tris (Roth) | 0,9M | Ficoll Typ 400 (Sigma) | 18% |
| Borsäure (Roth) | 0,9M | EDTA pH8,0 | 0,12M |
| EDTA pH8,0 (Roth) | 20mM | 10xTBE | 60ml |
| | | Bromphenolblau (Merck) | 0,15% |
| | | Xylencyanol FF (Sigma) | 0,15% |
| | | Lagerung: -20°C | |

| Ethidiumbromidstammlösung | Elektrophoresepuffer 1xTBE | |
|----------------------------------|-----------------------------------|----|
| 10mg/ml (Roth) | 10xTBE | 1T |
| | H ₂ O | 9T |

2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten im Bereich von 15kb bis 1kb wurde die horizontale Gelelektrophorese durchgeführt. Für analytische und präparative Zwecke kamen 0,7%ige Gele zum Einsatz (8x8 cm). Zur Herstellung wurden 0,35g Agarose (Roth) in 50ml 1xTBE im

Mikrowellenherd aufgekocht, bis sie vollständig gelöst waren. Nach Abkühlung im Wasserbad auf 50°C wurde Ethidiumbromid zu einer finalen Konzentration von 800ng/ml zugegeben und die Mischung in eine Gelform gegossen (Sambrook et al.1989).

Den DNA-Proben wurde vor dem Auftragen 1/6 Vol 6xdye zugegeben. Die Elektrophorese erfolgte für 1-3h bei 100V mit 1xTBE als Laufpuffer. Als Grössenvergleich wurden pro Gel 700ng 1kb Ladder aufgetragen. Zur Dokumentation der Gele wurde ein elektronisches Bilderfassungsgerät der Fa. Biorad (Gel Doc 2000) verwendet.

2.6.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente der Grössen von 1000bp bis 50bp wurden durch vertikale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Die 5%igen Gele hatten eine Trennstrecke von 15 cm und als Laufpuffer wurde auch hier 1xTBE verwendet.

analytisches (0,75mm Dicke) Polyacrylamidgel

Rothiphoresegel (Verhältnis Acrylamid/NN'- 3,8ml
Bisacrylamid= 29:1, 40%, Roth)

| | |
|------------------|---------|
| 10xTBE | 3ml |
| TEMED (Sigma) | 0,1% |
| APS (Sigma) | 63µl |
| H ₂ O | ad 30ml |

Die Mischung wurde sofort zwischen 2 Glasplatten gegossen.

Für präparative Gele (1,5mm Dicke) wurden die doppelten Mengen eingesetzt. Den DNA-Proben wurden 1/6 Vol 6xdye zugegeben und die Elektrophorese erfolgte für 10min bei 100V, danach für 50min bei 260V. 700ng kb Ladder dienten als Grössenstandard. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 5min lang in Ethidiumbromidlösung (0,5µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht mittels Gel Doc 2000 dokumentiert und ausgewertet.

2.6.4 Isolierung von Nukleinsäurefragmenten durch Elektroelution

Um ein bestimmtes DNA-Fragment nach der Elektrophorese wieder aus dem Gel zurückzugewinnen, wurde es unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit 300µl 1xTBE in einen ausgekochten Dialyseschlauch (Sigma) überführt. In einer horizontalen Elektrophoresekammer auf Eis wurde die DNA bei 145mA 1,5h aus dem Gel eluiert. Durch Ethanol-fällung konnte sie präzipitiert und anschliessend weiter untersucht werden.

2.7 Polymerase-Kettenreaktion

2.7.1 Prinzip und Anwendung

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) (Saiki et al., 1988) ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von definierten Nukleinsäuresequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen. Der zyklisch verlaufende Prozess beruht auf der Eigenschaft von DNA-Polymerasen, einen Einzelstrang zum Doppelstrang aufpolymerisieren zu können, sofern ihnen ein kurzer, doppelsträngiger Bereich als Primer zur Verfügung steht. Es sind zwei Oligonukleotid-Primer erforderlich, die an den Rändern der zu amplifizierenden Sequenz liegen, und spezifisch an den kodierenden bzw. den nicht-kodierenden Strang eines DNA-Stückes binden.

Die DNA-Matrize wird zunächst durch Hitzedenaturierung aufgeschmolzen. Dann können die Primer, die in grossem molarem Überschuss vorliegen, an ihre entsprechende Zielsequenz binden (Annealing). Ausgehend von diesem kurzen doppelsträngigen Bereich wird der fehlende, komplementäre Einzelstrang in 5'→3'-Richtung synthetisiert (Elongation). Bei Wiederholung dieser Reaktionsfolge kommt es nach jedem Zyklus zu einer Verdopplung der DNA und damit zu einer exponentiellen, selektiven, etwa 10^6 - 10^7 -fachen Anreicherung der durch die Oligonukleotide flankierten DNA-Sequenz. Theoretisch entstehen bei n Zyklen 2^{n-1} amplifizierte Moleküle.

Für diese Arbeit wurde die PCR zur gezielten Mutation von DNA eingesetzt (25 Zyklen). Durch die Wahl von sequenzspezifischen Primern (MWG), in denen die gewünschte Mutation vorlag, konnten einzelne Basenpaare mutiert werden und so auch neue Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingeführt werden. Durch die Methode der überlappenden Primer (Overlap-PCR; 20 Zyklen) war es möglich, auch innerhalb eines DNA-Abschnitts bestimmte Regionen auszutauschen. Dazu wurden zunächst von der zu mutierenden Stelle aus in beide Richtungen (5' und 3') zwei Einzel-PCRs durchgeführt, wobei die Primer mit der Mutation an der zu mutierenden Stelle komplementär waren. Durch eine dritte PCR mit den äusseren Primern, die auch für die Einzel-PCRs verwendet wurden, konnte das gesamte Fragment amplifiziert werden.

Weiter wurden mittels PCR DNA-Bereiche aus humaner genomischer DNA amplifiziert (30 Zyklen), um diese auf Mutationen hin zu untersuchen. Für die Southern Blot Analyse dieser DNA wurden per PCR Gensonden konstruiert (25 Zyklen).

2.7.2 Standardprotokoll

Die PCR wurde in einem Thermo Cycler (Biometra) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial dienten 10-20ng an Plasmid oder ca. 1µg wässriger genomischer DNA. Zwei thermostabile DNA-Polymerasen wurden zur Amplifizierung von DNA verwendet:

- Die *Taq*-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* diente zur Amplifizierung von Sequenzen aus genomischer DNA.

- Die „cloned“ *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*, deren Verwendung durch eine „proof reading“ Funktion zu einer geringeren Fehlerwahrscheinlichkeit führt, wurde für die Klonierung rekombinanter Plasmide verwendet.

Reaktionen und Lösungen

| 10xcloned <i>Pfu</i>-Puffer (Stratagene) | | 2xMasterAmp™ PCR PreMix (Epicentre) | |
|---|--------|--|-------|
| Tris-HCL pH8,8 | 200mM | Tris-HCL pH8,3 | 200mM |
| MgSO ₄ | 20mM | KCl | 100mM |
| KCl | 100mM | each dNTP | 400µM |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 100mM | MgCl ₂ | 3-7mM |
| Triton X-100 | 1% | MasterAmp PCR Enhancer | 0-8 x |
| nuklease-freies BSA | 1mg/ml | | |

Reaktionsansatz *Pfu*

| | |
|--|---------|
| Primer 1 (10pmol/µl) | 2,5µl |
| Primer 2 (10pmol/µl) | 2,5µl |
| dNTP (je 1,25mM; Roth) | 8µl |
| 10xcloned <i>Pfu</i> -Puffer | 5µl |
| cDNA | 20ng |
| cloned <i>Pfu</i> (Stratagene) (2,5U/µl) | 1µl |
| H ₂ O | ad 50µl |

Reaktionsansatz *Taq*

| | |
|------------------------------|-------|
| Primer 1 (10pmol/µl) | 2,5µl |
| Primer 2 (10pmol/µl) | 2,5µl |
| Premix J (Epicentre) | 25µl |
| genomische DNA | 1µl |
| <i>Taq</i> (Promega) (5U/µl) | 1µl |
| H ₂ O | 18µl |

Die beschriebenen Reaktionsansätze wurden der in Tab. 1 aufgeführten Reaktionsfolge unterzogen.

Tab. 1: Dauer und Temperatur der einzelnen Reaktionsschritte einer PCR

| Phase | Initiale Denaturierung | Zyklus (z.B. 1-25) | Verlängerung (Extension) |
|-------------------|------------------------|--------------------|--------------------------|
| Denaturierung | 94°C, 3min | 94°C, 1min | |
| Primer-Anlagerung | | 50-68°C, 1min | |
| Polymerisation | | 72°C, 1-3min | 72°C, 5min |

Die Polymerisationszeit richtet sich nach Polymerase und Länge des zu amplifizierenden Stückes. Die *Pfu*-Polymerase synthetisiert ca. 500bp/min, die *Taq*-Polymerase ca.

1000bp/min. Die Temperaturen für das Primer-Annealing wurden an die jeweiligen Oligonukleotide angepasst.

2.8 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzanalyse von Plasmid-DNA und PCR-Fragmenten erfolgte nach der von Sanger et al. (1977) entwickelten Didesoxymethode. Dabei synthetisiert eine DNA-Polymerase *in vitro* an einer einzelsträngigen DNA-Matrize den komplementären Strang beginnend an der Stelle, an die ein Oligonukleotid bindet. In Anwesenheit von 2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs) kommt es zu Kettenabbrüchen, da eine OH-Gruppe in 3'-Position der Nukleotide für eine Verlängerung der DNA notwendig ist. Bei sorgfältiger Wahl des Verhältnisses zwischen dNTPs und ddNTPs entsteht eine Mischung aus DNA-Fragmenten jeder möglichen Länge. Die unterschiedlich langen DNA-Fragmente werden durch den Einbau der mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Didesoxynukleotide markiert. So können alle vier DNA-Basen in einem Ansatz sequenziert werden, da jede einen anderen Farbstoff trägt.

2.8.1 Primer

Als Primer wurden Oligonukleotide (MWG) mit Kettenlängen zwischen 18 und 24bp verwendet. Für die terminalen Bereiche der cDNA wurden Einheitsprimer, die komplementär zur angrenzenden Vektorsequenz waren, verwendet. Für grössere Fragmente kamen sequenzspezifische Primer zum Einsatz. Die Bindungspositionen lagen mindestens 20bp vor dem zu identifizierenden Bereich.

2.8.2 Sequenzierreaktion

| | | | | |
|-----------------------------------|-------|---------------|------------|-------|
| DNA (300-500ng) | 1µl | Denaturierung | 95°C, 2min | } 25x |
| Primer (10pmol/µl) | 1µl | Denaturierung | 95°C, 30s | |
| H ₂ O | 6,5µl | Annealing | 50°C, 40s | |
| DMSO | 1µl | Elongation | 60°C, 4min | |
| Ready Reaction Mix (Perkin Elmer) | 2,5µl | | | |

Die vier ddNTPs, die bei unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszieren (ddGTP: 540nm, ddATP: 570nm, ddTTP: 600nm, ddCTP: 630nm), dNTPs und *Taq*-Polymerase sind in dem Ready Reaction Mix enthalten. Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler der Fa. Biometra.

Da nur ein Primer zugegeben wird, findet hier nur eine lineare und nicht wie bei der PCR eine exponentielle Vermehrung der DNA-Matrize statt.

Das Reaktionsprodukt wurde durch Ethanol-fällung (2.2.1) präzipitiert, um nicht fluoreszierende Nukleotide abzutrennen. Das Pellet wurde in 30µl TSR (Template suppression reagent, Perkin Elmer) resuspendiert, 2min bei 95°C denaturiert und in einem

ABI PrismTM 310 Sequenzierautomaten (Perkin Elmer) mittels Kapillarelektrophorese analysiert. Die DNA-Fragmente wandern dabei durch eine polymergefüllte Kapillare unter Spannung (12,2 kV) in 5'→3'-Richtung durch einen Laserdetektor. Aus der Abfolge der Farbsignale errechnet dann der Sequenzierautomat die Nukleotidabfolge.

2.9 Bakterienkultur und –transformation

2.9.1 Verwendeter Stamm

Zur Amplifikation von Plasmiden wurde als Wirtsorganismus der *E.coli* Stamm XL1-blue MRF' (Stratagene) verwendet, dessen Genotyp wie folgt beschrieben wird: $\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mrcCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F'proABlacI}^q \text{Z}\Delta\text{M15 Tn10(Tet}^r\text{)]}$.

2.9.2 Nährmedium und Antibiotika

Die Aufzucht der Bakterien erfolgte in Luria-Bertani Medium mit Glucose (LB⁺). Vor der Verwendung wurde das Medium für 10 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert.

Luria-Bertani Medium ⁺

| | |
|--------------------|-----------|
| Peptone (Roth) | 10g |
| Hefeextrakt (Roth) | 5g |
| NaCl (Roth) | 5g |
| Glucose (Roth) | 1g |
| H ₂ O | ad 1000ml |

pH7,2-7,5

Zur Selektion plasmidtragender Bakterien wurde dem LB⁺-Medium kurz vor der Anzucht das dem verwendeten Vektor entsprechende Antibiotikum zugegeben (Endkonzentration Ampicillin: 100µg/ml; Endkonzentration Kanamycin: 30µg/ml). Die wässrigen Stammlösungen mit 50mg/ml Ampicillin-Natrium (Roth) bzw. 10mg/ml Kanamycin (Sigma) wurden sterilfiltriert und in Aliquots bei –20°C gelagert.

Für die Plattenkultur wurden dem LB⁺-Medium vor dem Autoklavieren 15g/l Agar (Roth) zugefügt. Nach dem Abkühlen auf 50°C wurde das Antibiotikum (Endkonzentration Ampicillin: 50µg/ml; Endkonzentration Kanamycin: 30µg/ml) zugesetzt und das Medium in sterile Petrischalen gegossen.

2.9.3 Kultivierung

Die Kultivierung von *E.coli* erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C. Flüssigkulturen wurden in Glasröhrchen oder Erlenmeyerkolben unter Schütteln mit 225rpm bei 37°C herangezogen. Zur kurzfristigen Aufbewahrung und zur Separation von Einzelkulturen wurden die Bakterienstämme auf antibiotikahaltige LB⁺-Platten ausgestrichen, bei 37°C

inkubiert und bis zu 8 Wochen bei 4°C gelagert. Zum Zwecke der langfristigen Aufbewahrung wurden logarithmisch wachsende Kulturen 1:1 mit autoklaviertem Glycerol gemischt und bei -80°C aufbewahrt.

2.9.4 Transformation von *E.coli*

2.9.4.1 Präparation kompetenter Bakterienzellen

Als kompetente Zellen bezeichnet man Bakterien, die in der Lage sind, exogene DNA aufzunehmen. Für diese Arbeit wurden *E.coli* Bakterien durch Behandlung mit DMSO kompetent gemacht. 100ml LB⁻-Medium (wie LB⁺ ohne Glucose) wurden mit 1ml einer Übernachtskultur ausgehend von einer frischen Einzelkolonie von *E.coli* XL1-blue beimpft. Sobald eine OD₆₀₀ von 0,35 bis 0,38 erreicht war, wurde die Kultur abgekühlt und abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 15ml 1xTSS resuspendiert, in Portionen von je 450µl aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

1xTSS (Transformation and storage solution)

| | |
|------------------------------|---------|
| PEG (Polyethylenglycol) 3350 | 12,5ml |
| MgCl ₂ 1M | 2,5ml |
| DMSO | 2,5ml |
| LB ⁻ | ad 50ml |

2.9.4.2 Transformation

Die Aufnahme freier DNA durch Bakterienzellen bezeichnet man als Transformation (Mandel und Higa 1970). Ein so übertragenes Plasmid wird bei geeignetem Selektionsdruck stabil auf die Tochterzellen vererbt und kann durch die neu erworbene Antibiotikaresistenz nachgewiesen werden.

400µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, zu einem Plasmid oder Ligationsansatz (2.4.3) pipettiert und zur DNA-Aufnahme auf Eis gestellt (30min). Nach 1h Schütteln mit 2,6ml LB⁺-Medium bei 37°C wurde die Suspension auf Ampicillin- bzw. Kanamycinplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Identifizierung positiver rekombinanter Klone wurden Einzelkolonien einer alkalischen Lyse unterzogen (2.3.1).

2.10 Isolierung genomischer DNA aus Blut

Zur Gewinnung von genomischer DNA aus menschlichem Blut wurde das „High pure PCR Template Preparation Kit“ (Roche) benutzt. Dabei werden die Zellen in Gegenwart von Guanidin-HCl durch kurze Inkubation mit Proteinase K lysiert, währenddessen alle Nukleasen inaktiviert werden. Die zellulären Nukleinsäuren binden selektiv an spezielle Glasfasern eines Säulchens, von dem sie nach einigen Waschschrinen hochrein wieder eluiert werden können.

200ml Citratblut wurde mit 200µl Bindepuffer (Guanidin-HCl 6M, Harnstoff 10mM, Tris-HCl 10mM, Triton X-100 20% pH4,4) und 40µl Proteinase K (20µg/µl) 10min bei 72°C inkubiert. Nach Zusatz von 100µl Isopropanol wurde der Ansatz auf eine Reinigungssäule aufgebracht und 1min bei 4000 x g zentrifugiert. Im Folgenden wurde die Säule einmal mit Inhibitor Removal Puffer (Guanidin-HCl 5M, Tris-HCl 20mM pH6,6, EtOH 40%) und zweimal mit Waschpuffer (NaCl 20mM, Tris-HCl 2mM pH7,5, EtOH 80%) gespült. Zwischen den Waschschrritten erfolgte wie oben eine einminütige Zentrifugation. Durch Elution (Tris 10mM pH8,5) wurde die genomische DNA aus der Säule gewonnen.

2.11 Southern Blot Analyse

2.11.1 Herstellung ³²P-markierter Gensonden

Um ³²P-markierte Gensonden zu erhalten, wurde das „random primed labelling“ Verfahren angewendet. Das als Matrize eingesetzte DNA-Fragment stammte aus einer PCR-Reaktion (2.7). Ein Gemisch aus Zufalls-Hexanukleotiden (Roche) diente dabei als „random“-Primer (Feinberg und Vogelstein 1983). Am 3'-Ende der DNA begann die Synthese des komplementären Strangs durch das Klenow-Enzym (Roche) und ³²P-markiertes dCTP wurde in den Strang eingebaut. Überschüssige Desoxyribonukleosidtriphosphate wurden über eine NickTM Column (Pharmazia) säulenchromatographisch abgetrennt. Die gereinigte Sonde wurde mit TE-Puffer (Tris 1M pH8,0, EDTA 0,5M pH8,0) eluiert und ihre spezifische Aktivität mittels eines Szintillationszählers bestimmt.

2.11.2 Southern Hybridisierung

Bei der Methode (Southern 1975) werden gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente auf eine Trägermembran übertragen und dort immobilisiert. Dabei bleibt das Trennmuster der Banden erhalten und es entsteht eine Kopie des ursprünglichen Gels. Dieser Blot wird mit einer ³²P-markierten DNA-Sonde hybridisiert und durch Autoradiographie analysiert. Für diese Arbeit wurde hiermit humane genomische DNA im Bereich des HCN2 Gens untersucht.

Nach Elektrophorese der mit Restriktionsenzymen verdauten DNA wurde das Agarosegel in HCl 0,2N geschwenkt, wobei es durch partielle Depurinierung zu DNA-Strangbrüchen kam und somit der Transfer von langen Molekülen erleichtert wurde. Um die DNA zu denaturieren, wurde das Gel 30min in NaOH 0,5N, NaCl 1,5M inkubiert. Nach Neutralisation in Tris 0,5M pH8,0, NaCl 3M wurde das Gel in eine mit 10xSSC gefüllte Metallschale auf einen mit 10xSSC getränkten Schwamm gelegt und mit einer Nylonmembran (HybondTM-N, Amersham) bedeckt. Ein Stapel Saugpapier über der Membran erwirkte die Kapillarkräfte, die den Puffer durch das Gel nach oben saugten. Dabei wanderten die Nukleinsäure-Moleküle mit und blieben an der Membran haften. Nach 18h wurde die Membran mit UV-Licht bestrahlt und bei 80°C 2h gebacken, um die DNA kovalent an die Aminogruppen der Nylonmembran zu binden.

Hybridisierung

Die Nylonmembran wurde mit 1ml Churchpuffer pro 5cm² in Hybridisierungsrollen 3h bei 60°C in einem Hybridisierungssofen inkubiert. Anschliessend wurde frischer Churchpuffer mit 5x10⁶cpm/ml ³²P-markierter DNA-Sonde in die Rolle mit der Membran gefüllt und der Ansatz über Nacht bei 60°C hybridisiert.

Nach 16h wurden unspezifisch- und nicht-gebundene Sonde durch Waschen entfernt:

- 15min in 2xSSC, 0,1%SDS, 60°C
- 30min in 0,4xSSC, 0,1%SDS, 65°C
- 40min in 0,4xSSC, 0,1%SDS, 68°C

Auf die Membran wurde für 4 Tage ein Hyperfilm[®] (Amersham) aufgelegt und zwischen zwei signalverstärkenden Folien bei -80°C gelagert. Anhand der Schwärzung des entwickelten Films konnten die DNA-Fragmente, die mit der Gendsonde hybridisiert hatten, identifiziert werden.

2.11.3 Lösungen

| Churchpuffer | | 20xSSC | |
|--|----------|--|-----------|
| Natriumphosphatpuffer pH7,4 | 0,5M | NaCl | 175,3g |
| BSA (Roth) | 1% | Na ₃ Citrat*2H ₂ O (Merck) | 88,2g |
| SDS (Roth) | 7% | H ₂ O | ad 1000ml |
| EDTA pH8,0 | 1mM | | |
| Heringssperma-DNA (Sigma) | 0,1mg/ml | | |
| Natriumphosphatpuffer pH 7,4 | | | |
| 1M Na ₂ HPO ₄ (Roth) | 387ml | | |
| 1M NaH ₂ PO ₄ (Roth) | 113ml | | |

2.12 Kultur eukaryotischer Zellen

2.12.1 Verwendete Zelllinie

Für die Expression in eukaryotischen Zellen wurde die permanente Zelllinie HEK 293 (HEK) (ATCC®Nr.CRL 1573, Graham et al. 1977) verwendet. HEK Zellen sind humane embryonale Nierenzellen (**human embryonic kidney cells**), die stabil mit dem humanen Adenovirus Typ 5 transfiziert sind.

2.12.2 Nährmedium

Minimum essential medium (MEM-Medium)

Das MEM-Medium (Gibco) ist sehr gut für das Wachstum von Säugerzellen geeignet, da es Aminosäuren, Vitamine, Glucose und Mineralien (Eagle 1959) enthält und so die *in vitro* Kulturbedingungen den *in vivo* herrschenden so weit wie möglich angeglichen sind. Das verwendete Medium enthält L-Glutamin in einer stabilisierten Form als Dipeptid (L-Alanin-L-Glutamin; GlutamaxTM; Gibco)

Kurz vor Gebrauch wurden dem Medium 50ml FBS (Biochrom) zugesetzt, um die Versorgung mit bestimmten Wachstumsfaktoren, Hormonen, Anheftungsfaktoren u.ä. zu gewährleisten, da die HEK Zellen in rein synthetischen Medien nicht überleben. Um das Wachstum von Bakterien in der Zellkultur zu unterdrücken, wurde dem Medium ausserdem eine Mischung von Penicillin G und Streptomycin (Biochrom) mit der Endkonzentration von 100U/ml Penicillin G und 100µg/ml Streptomycin zugesetzt.

Selektionsmittel

Zur Selektionierung und anschliessenden Kultur von Zellen, die durch das Gen für Aminoglycosid-Phosphotransferase (APH-Gen vom Transposon Tn 5 aus *E.coli*, Southern et al. 1982) eine entsprechende Resistenz tragen (Neo-Resistenzgen), wurde Geneticin (G418; Roche) eingesetzt (Selektion: 400µg/ml; Kultur: 200µg/ml). Dieses Antibiotikum ist auch für Eukaryoten toxisch, da es durch Bindung an die 80S-Ribosomen die Proteinbiosynthese hemmt.

2.12.3 Kultur

HEK Zellen wachsen in adhärenenten Kulturen, sogenannten Monolayern, angeheftet an Plastik-Kulturgefässe aus Polystyrol (Sarstedt). Die Zellen wurden in Brutschränken bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 6% zur Konstanthaltung des pH-Werts im Medium kultiviert. Alle verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch auf 37°C vorgewärmt.

PBS pH7,4

NaCl (Roth) 40,0g

KCl (Roth) 1,0g

Na₂HPO₄*12H₂O 14,5g

KH₂PO₄ (Roth) 1,2g

H₂O ad 5000ml

0,05%Trypsin/0,02%EDTA

Stammlösung (Biochrom): 0,5%Trypsin/0,2%
EDTA mit PBS 1:10 verdünnen; Lagerung: -20°C

Einfriermedium

MEM/FBS (ohne Antibiotikum) 90%

DMSO 10%

Aussäen, Passagieren und Ernten von Zellen

Alle drei Wochen wurde ein frischer Gefrierstock von -196°C aufgetaut und in eine Kulturflasche mit vorgelegtem Medium ausgesät. Wenn die Gefässe konfluent bewachsen waren, wurden die Zellen passagiert und dabei im Verhältnis 1:10 verdünnt. Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch kurze Behandlung mit Trypsin/EDTA voneinander und von der Gefäßwand abgelöst. Nach Trypsininaktivierung durch Zugabe von Medium wurden die Zellen gut resuspendiert und auf folgende Weisen weiterverarbeitet:

- Zentrifugation (1000 x g, 10min) und Aufbewahrung in Einfriermedium bei -196°C
- Überführung in ein neues Kulturgefäss und weitere Inkubation mit Medium
- nach Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer Aussäen für eine spätere Transfektion

2.12.4 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Beim Einbringen von fremden Genen in eukaryotische Zellen wird zwischen zwei unterschiedlichen Strategien unterschieden, der transienten und der stabilen Transfektion. Bei der transienten Transfektion (Calciumphosphat-Methode, Lipofektion) wird die zirkuläre DNA unabhängig vom Genom der Wirtszelle (episomal) transkribiert, die eingeschleusten Gene sind allerdings nur vorübergehend aktiv und gehen im Verlauf weiterer Zellteilungen wieder verloren. Nach stabiler Transfektion (Elektroporation) wird das Fremdgen zufällig ins Genom der Wirtszelle integriert, dort mit diesem vermehrt und bei entsprechender Selektion an die Tochterzellen weitergegeben.

Calciumphosphat-Methode

Zur Gewinnung grösserer Mengen rekombinanten Proteins für Membranpräparationen wurden HEK Zellen mit der von Graham et al. (1973) beschriebenen Methode in einem nach Ishiura et al. (1982) modifizierten Puffer transfiziert. Es kommt dabei zur Bildung eines Calciumphosphat-DNA-Präzipitats. Der feinkörnige Niederschlag setzt sich auf den Zellen ab und wird von diesen endozytiert.

3×10^6 HEK 293 Zellen wurden in Petrischalen (152cm^2) ausgesät und im Brutschrank (37°C , 6% CO_2) inkubiert. Nach 36h wurden die Zellen transfiziert. Der Transfektionsmix wurde 20min bei RT inkubiert, danach tropfenweise auf die Zellen gegeben und die Schalen 18h bei 3% CO_2 und 35°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten zwei Waschschrte mit PBS und nach weiteren 48h im Brutschrank bei 37°C und 6% CO_2 wurden die Zellen durch Zentrifugation (1000 x g, 10min) geerntet.

Verwendete Lösungen

| BBS (2xBES-buffered solution) | | Transfektionsmix | |
|---|-----------|-------------------------|-----------|
| BES (Sigma) | 50mM | CaCl ₂ 2,5M | 150µl |
| NaCl | 280mM | BBS | 1500µl |
| Na ₂ HPO ₄ pH6,95 | 1,5mM | Plasmid-DNA | 72µg |
| H ₂ O | ad 800ml | H ₂ O | ad 3000µl |
| pH6,95 einstellen (NaOH) | | | |
| H ₂ O | ad 1000ml | | |
| Sterilfiltrieren, Lagerung: -20°C | | | |

Lipofektion

Liposomen bilden mit Plasmid-DNA in serumfreier Lösung Komplexe, die mit der Zellmembran verschmelzen und durch Endozytose ins Zellinnere gelangen (Felgner et al. 1987). Die Transfektionseffizienz ist hier im Vergleich zur Calciumphosphat-Methode wesentlich erhöht.

Die Transfektion fand in 6- bzw. 24-Lochplatten statt. Für die Elektrophysiologie und die Mikroskopie waren die 24-Lochplatten mit sterilen Glascoverslips ausgelegt. Eine geeignete Zellzahl wurde in die Platten ausgesät (6-Loch: 500000, 24-Loch: 20000-30000) und 6h später wurde der Transfektionsmix (pro Loch einer 24-Lochplatte [2cm²] wurden 24,25µl serumfreies MEM mit 0,75µl Fugene[®]6 5min bei RT inkubiert, danach 0,25µg DNA zupipettiert und der Ansatz 30min bei RT inkubiert) tropfenweise auf die Zellen gegeben. Etwa 72h nach der Transfektion war genügend Protein exprimiert, um weitere Untersuchungen durchzuführen.

Elektroporation von HEK Zellen mit hHCN4/pcDNA3 (stabile Zelllinie)

Die Elektroporation ist eine physikalische Methode, um DNA in Zellen einzubringen. Die Zellmembran agiert als elektrischer Kondensator und ist somit unfähig, Ströme durchzulassen (ausser durch Ionenkanäle). Durch Anlegen eines pulsierenden elektrischen Feldes wurde die Membran an einigen Stellen aufgebrochen und die entstehenden Poren im nm Bereich erlaubten die Diffusion von DNA in das Zytoplasma und den Zellkern (Neumann et al. 1982). Um die Integrationswahrscheinlichkeit ins Wirtsgenom zu erhöhen, wurde hHCN4/pcDNA3 vorher mit SspI linearisiert. Nach der Elektroporation blieben die Zellen kurz auf Eis, damit sich die Membran langsam wieder schliessen konnte. Dann erfolgte der Transfer zurück in das Kulturmedium. Als Selektionsmarker wurde G418 (Geneticin) verwendet.

HEK Zellen wurden trypsiniert und in einer Konzentration von 10⁷ Zellen/ml in PBS aufgenommen. 0,8ml dieser Verdünnung wurden in eine kalte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 0,4cm) gefüllt, 5min auf Eis abgekühlt, das linearisierte Plasmid

(hHCN4/pcDNA3) zugegeben und bei 1000V/25 μ F elektroporiert (Gene PulserTMII, Biorad). Nach 10min auf Eis wurde der Ansatz auf 8 Petrischalen (145cm²) verteilt und mit Nährmedium inkubiert. Nach 48h wurde die Kultur in Gegenwart von 400 μ g/ml G418 weitergeführt.

Um einheitliche Zellpopulationen zu erhalten, wurden nach 4 Wochen Kultur, während derer immer wieder vereinzelt wurde, Einzelkolonien mit einer Einweg-Pipettenspitze gepickt und weiterkultiviert. Als Nachweis, dass hHCN4 stabil exprimiert wird, wurden die Klone elektrophysiologisch (2.19) und durch Western Blot (2.15) untersucht.

2.13 Membranpräparation

HCN Kanäle werden funktionell in der Zellmembran exprimiert. Durch Differentialzentrifugation ist es möglich, diese sog. Mikrosomenfraktion, die auch Membranen intrazellulärer Kompartimente mit einschliesst, von den restlichen Zellbestandteilen zu trennen. Da Kanalproteine nach einer Zellzerstörung sehr schnell von Proteasen gespalten werden, wurden alle Arbeitsschritte bei 4°C durchgeführt und den verwendeten Lösungen eine Mischung aus verschiedenen Proteaseinhibitoren zugesetzt.

2.13.1 Lösungen

Proteaseinhibitoren

Die Lösungen wurden bei –20°C gelagert und kurz vor Gebrauch dem Lysepuffer im Verhältnis 1:1000 zugesetzt (Jodacetamid 1:300)

- 1mg/ml Leupeptin (Calbiochem) in EtOH 50%
- 1mM Pepstatin A (Sigma) in EtOH 50%
- 1mg/ml Antipain (Calbiochem) in EtOH 50%
- 100mM PMSF (Fluka) in EtOH 100%
- 1M 1,10-Phenanthrolin (Fluka) in EtOH 100%
- 1M Benzamidin (Sigma) in H₂O
- 300mM Jodacetamid (Sigma) in H₂O

Lysepuffer

| | |
|-----------------|------|
| MOPS (Roth) | 20mM |
| Sucrose (Merck) | 0,3M |
| EDTA pH7,4 | 1mM |
| Lagerung: 4°C | |

2.13.2 Durchführung

Die bei –80°C gelagerten HEK Zellpellets (nach Calciumphosphat-Transfektion) wurden auf Eis in Lysepuffer aufgenommen und in einem Glas-Teflonhomogenisator („Potter“, Fa. Braun) mit 10 Hüben homogenisiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation (16000 x g, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet nochmals analog behandelt. Die Überstände

wurden vereinigt und die Mikrosomenfraktion durch Ultrazentrifugation abgetrennt (45min, 100000 x g, 4°C), in 100µl Lysepuffer aufgenommen, resuspendiert und aliquotiert bei -80°C gelagert. Die Präparation von Membranen aus Mausgehirn (C57black6) erfolgte analog, nachdem die Gehirne mechanisch auf Eis zerkleinert worden waren.

2.14 Quantifizierung von Proteinen

Der Proteingehalt von Membranpräparationen wie auch von Komplettlysaten zur Immunpräzipitation wurde mittels der Bradford-Methode bestimmt. Hierzu wurde eine BSA-Standardreihe von 1-30µg Protein ad 100µl NaCl 0,15M nach Zugabe von je 1ml Coomassie Brilliantblau G250 Lösung erstellt. Nach 2min bei RT wurde die Absorption bei 595 nm vermessen. Die Proteinproben wurden analog vermessen und vom Photometer (Eppendorf Bio Photometer) anhand der Standardreihe quantifiziert.

Coomassie Brilliantblau G250 Lösung

| | |
|--------------------------------------|---|
| Coomassie brillant blue G250 (Merck) | 50mg |
| EtOH 95% | 25ml |
| H ₃ PO ₄ | 50ml |
| H ₂ O | ad 500ml nach Filtrieren Lagerung bei 4°C |

2.15 Western Blot Analyse

2.15.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach Lämmli (1970) durchgeführt. Die Anlagerung von SDS an Proteine führt zur Auflösung übergeordneter Raumstrukturen und zur Solubilisierung unlöslicher Proteinaggregate (z.B. Einschlusskörper). Durch den Zusatz von SDS hängt die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle weitgehend nur noch von ihrer Grösse ab, da die starke negative Ladung des gebundenen Anions die proteineigenen überdeckt. Durch Zugabe von reduzierenden Agentien wie DTT werden zusätzlich alle Disulfid-Brücken getrennt. Ein Grössenstandard (Benchmark Protein Ladder, Gibco) diente als Vergleichsmassstab. Die Prozentigkeit der Gele richtete sich nach den zu analysierenden Proteinen. Für HCN1 und HCN2 wurden 6%ige Gele, für HCN4 5%ige Gele verwendet.

Zur Elektrophorese wurde eine Mini-Gel Apparatur der Fa. Biorad (Protean 3) verwendet und anschliessend wurden die getrennten Proteine spezifisch durch Immunoblot nachgewiesen.

Lösungen**5xElektrophoresepuffer**

| | |
|------------------|-----------|
| Tris | 15,1g |
| Glycin (Roth) | 72g |
| SDS (Roth) | 5g |
| H ₂ O | ad 1000ml |

Lagerung: 4°C

6xProbenpuffer

| | |
|-----------------------------------|---------|
| Tris-Cl/SDS pH6,8 | 7ml |
| Glycerol (Merck) | 3ml |
| SDS | 1g |
| Bromphenolblau | 1,2mg |
| DTT (Zusatz nur bei Ko-IP) (Roth) | 0,93g |
| H ₂ O | ad 10ml |

Lagerung: -20°C

4xTrenngelpuffer

| | |
|--------|------|
| Tris | 1,5M |
| SDS | 0,4% |
| pH 8,8 | |

4xSammelgelpuffer

| | |
|--------|------|
| Tris | 0,5M |
| SDS | 0,4% |
| pH 6,8 | |

5% Trenngel

| | |
|------------------------|--------|
| Acrylamid für SDS-PAGE | 2,5ml |
| 4xTrenngelpuffer | 3,75ml |
| H ₂ O | 8,75ml |
| TEMED | 10µl |
| APS 20% | 30µl |

6% Trenngel

| | |
|------------------------|--------|
| Acrylamid für SDS-PAGE | 3ml |
| 4xTrenngelpuffer | 3,75ml |
| H ₂ O | 8,25ml |
| TEMED | 10µl |
| APS 20% | 30µl |

Sammelgel

| | |
|------------------------|--------|
| Acrylamid für SDS-PAGE | 0,65ml |
| 4xSammelgelpuffer | 1,25ml |
| H ₂ O | 3,05ml |
| TEMED | 5µl |
| APS 20% | 25µl |

Acrylamid für SDS-PAGE (Roth)

| | |
|---------------------------|------|
| Acrylamid | 30% |
| N,N'Methylen-bisacrylamid | 0,8% |

Zur Herstellung der Gele wurden Glasplatten mit 1,5mm Spacer in die Giessvorrichtung gesetzt, das Trenngel bis 2cm unter den oberen Rand gegossen und mit Isopropanol

überschichtet. Nach 1h wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel eingefüllt, in das ein Kamm mit 10 Taschen gesteckt wurde.

Die Proteinproben wurden mit 6xProbenpuffer versetzt, 5min bei 98°C denaturiert und in die Taschen des Gels eingebracht. Die Elektrophorese in 1xElektrophoresepuffer dauerte bei 100V ca. 2h.

2.15.2 Immunologische Detektion durch Western Blot

Die Anwesenheit von HCN1, HCN2 und HCN4 in den Membranpräparationen und Proteinlysaten sollte spezifisch durch Western Blot nachgewiesen werden. Dazu wurden die aufgetrennten Proben vom SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Unter Verwendung spezifischer Antikörper und einer sensitiven Chemolumineszenzmethode (ECL, Amersham) konnten nativ und heterolog exprimierte HCN Kanalproteine auf der Membran detektiert werden. Dabei bindet ein sekundärer Antikörper (Amersham), der an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, an den membrangebundenen primären Antikörper. Diese Peroxidase oxidiert Luminol, wodurch ein lichtemittierender, angeregter Übergangszustand eintritt. Die Chemolumineszenz lässt sich mit einem speziellen Film (Hyperfilm ECL, Amersham) dokumentieren.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden das SDS-Gel, Filterpapiere (Schleicher und Schüll) und die Nitrocellulosemembran (Hybond ECL, Amersham) mit Transferpuffer getränkt und der Blot folgendermassen in die Blottingapparatur (Mini Trans Blot[®], Biorad) eingebaut: Schwamm, Filter, Gel, Membran, Filter, Schwamm. Dieser „Sandwich“ wurde senkrecht in eine mit Transferpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gestellt und 1h bei 300mA geblottet. Zur Visualisierung des Markers und zur ersten Abschätzung des Laufverhaltens der Proben wurde die Membran 5min in Ponceau-S-Lösung gebadet und nach teilweiser Entfärbung mit H₂O der Marker mit Bleistift nachgezogen. Nach Waschen des Blots in 1xTBST folgte über Nacht eine Blockierung bei 4°C (in 1xTBST mit 5% BSA), um freie Protein-Bindungsstellen zu besetzen.

Nach 17h wurde der Blot 10min mit 1xTBST gewaschen und anschliessend 2h mit Antikörperverdünnung (Anti-HCN1, Anti-HCN4: 1:500 und Anti-HCN2: 1:250 in 1xTBST + 0,1%BSA) inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschritten mit 1xTBST wurde der Blot 1h mit sekundärem Antikörper (Amersham ECL rabbit 1:2000 in 1xTBST + 0,1% BSA) hybridisiert und danach fünf Mal gewaschen. Zur Visualisierung der Banden wurde die Membran 1min mit ECL Reagens (Amersham) behandelt und danach das Ergebnis durch Auflegen eines Films (Hyperfilm, Amersham) in der Dunkelkammer sichtbar gemacht.

Lösungen

| Transferpuffer | | 10xTBS | |
|-----------------------|-----------|------------------|-----------|
| Tris | 3,03g | Tris | 12,1g |
| Glycin | 14,4g | NaCl | 80,23g |
| Methanol (Roth) | 200ml | H ₂ O | ad 1000ml |
| H ₂ O | ad 1000ml | | |

| 1xTBST | | Ponceau-S-Lösung | |
|----------------|------|-------------------------|----------|
| 1xTBS | | Ponceau S (Sigma) | 0,5g |
| Tween20 (Roth) | 0,1% | Eisessig (Roth) | 1ml |
| | | H ₂ O | ad 100ml |

2.16 Deglycosylierung von Proteinen

N-Glycosidase F ist ein Enzym, das alle Typen Asparagin-gebundener N-Glycanketten spaltet. Da Glycosylierungen als posttranslationale Modifikationen beim Targeting zur Zellmembran eine wichtige Rolle spielen, gibt ein Verdau mit dem Enzym Aufschlüsse über Transportmechanismen von speziellen Proteinen.

50-200µg Membranprotein aus transfizierten HEK Zellen oder Mausgehirn wurden durch Kochen in β-Mercaptoethanol 0,1M und SDS 0,5% denaturiert. Die Reaktion wurde auf Tris 15mM, Orthophenanthrolin 20mM und Triton X-100 1% gebracht und über Nacht mit 5U N-Glycosidase F (Roche) bei 37°C verdaut. Die Proteinmischung wurde durch SDS-PAGE und Immunoblot (0) weiter untersucht.

2.17 Ko-Immunpräzipitation

Durch Fällung eines Proteinkomplexes aus zwei Proteinen mit einem spezifischen Antikörper gegen das erste Protein, und Nachweis durch Western Blot mit einem Antikörper gegen das zweite, können Protein-Interaktionen nachgewiesen werden. Zum Isolieren des Gemisches verwendet man Protein A Sepharose-Kügelchen als feste, abzentrifugierbare Matrix. Es handelt sich hier um ein stabile, quervernetzte Form der Agarose, an die kovalent Protein A aus *Staphylococcus aureus* gebunden ist, das die Fähigkeit besitzt, Immunglobuline zu binden (Chenais et al. 1977).

2.17.1 Zellkultur und –lyse

Je zwei HCN Isoformen, deren Interaktion untersucht werden sollte, wurden nach Ko-Transfektion der entsprechenden cDNAs in HEK Zellen exprimiert. In 6-Lochplatten wurden je 500000 Zellen ausgesät und mit Fugene[®]6 wurden pro Loch 0,6µg cDNA jedes Plasmids transfiziert. Dabei war immer ein HCN Kanal mit einem Myc-tag versehen, um diesen mittels eines monoklonalen Antikörpers später zu isolieren. Nach 72h wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, da ansonsten FBS unspezifisch an die Protein A Sepharose-Kügelchen binden kann. Mit einem Plastikschaaber wurden die Zellen von der Oberfläche abgelöst und 10min in 500µl Triton-Lysepuffer (2.17.2) bei 4°C inkubiert. Das Detergens Triton X-100 lysiert die Zellmembran, während der Zellkern und andere intrazelluläre Kompartimente intakt bleiben. Danach wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (12000 x g, 4°C) abgetrennt und das überstehende Lysat für die Ko-Immunpräzipitation eingesetzt. Die Zellyse aus Mausgehirn (C57black6) erfolgte unmittelbar nach der Organentnahme. Das komplette Gehirn wurde in einem Glas-Teflonhomogenisator („Potter“, Braun) mit 10 Hüben in Triton-Lysepuffer homogenisiert und wie oben zentrifugiert.

2.17.2 Ko-Immunpräzipitation

Im Falle der HEK Zellysate wurden 30µl Protein A Sepharose-Kügelchen in PBS mit 1µl Anti-Myc-Antikörper (Cell signalling) und je 500µl Zellysate und HNTG-Puffer in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vereinigt und bei 4°C 16h in einem Rollhybridisierer inkubiert. Nach Abzentrifugieren (12000 x g, 4°C) wurden die Kügelchen drei Mal mit HNTG-Puffer gewaschen und dazwischen wieder zentrifugiert (12000 x g, 4°C). Die Detektion mit einem Antikörper gegen das zweite Protein erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese und Immunoblot. Die Ko-Immunpräzipitation aus Mausgehirnlysate erfolgte mit je 2mg (Bestimmung nach Bradford, 2.14) Gesamtproteinlysate unter Verwendung von 2µl Anti-HCN2-Antiserum statt Anti-Myc-Antikörper. Als Negativkontrolle wurde statt des ersten Antikörpers ein Antikörper gegen CNG6 verwendet.

| Triton-Lysepuffer | | HNTG-Puffer | |
|--------------------------|-------|--------------------|-------|
| HEPES pH7,5 (Sigma) | 50mM | HEPES pH7,5 | 50mM |
| NaCl | 150mM | NaCl | 150mM |
| Glycerol | 10% | Glycerol | 10% |
| EDTA pH8,0 | 5mM | EDTA pH8,0 | 5mM |
| Triton X-100 (Roth) | 1% | Triton X-100 | 0,1% |

Beiden Puffern wurde kurz vor Gebrauch eine Proteasehemmermischung (2.12.1) zugesetzt.

2.18 Konfokale Mikroskopie

Mit dieser Methode sollte die Lokalisierung von fluoreszenzmarkierten HCN Kanalproteinen und eine eventuelle Koloaliation unterschiedlicher Konstrukte in HEK Zellen untersucht werden. Dabei regt ein Laser des LSM 510 META (Zeiss) in nur einer genau definierten Ebene die Fluorochrome der Probe an, das emittierte Licht gelangt auf einen Detektor und es wird über einen Computer ein „optischer Schnitt“ des Präparats dargestellt. Die Besonderheit gegenüber herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopen ist die exakte Erfassung einer dünnen Ebene durch Einsatz einer Lochblende, wodurch kein Streulicht aus darüber- oder darunterliegenden Ebenen erfasst wird. Es können in einem Arbeitsgang mehrere Fluorochrome kurz hintereinander mit den entsprechenden Wellenlängen angeregt werden, was die Untersuchung unterschiedlicher fluoreszenzmarkierter Proteine in einer Zelle ermöglicht. Zur Transfektion der HEK Zellen wurden Fusionskonstrukte aus HCN Kanälen mit Genen für fluoreszierende Proteine verwendet (2.1.4).

2.18.1 Zellkultur

Je 30000 HEK Zellen wurden in mit Glasdeckelchen ausgelegte 24-Lochplatten ausgesät. Damit die Zellen besser hafteten, wurden die Glasflächen vorher mit 0,1mg/ml Poly-L-lysine (Sigma) 30min bei 37°C beschichtet und danach mit PBS gewaschen. Pro Loch wurden mit Fugene[®]6 (2.12.4) 0,2µg DNA je Konstrukt transfiziert. Nach 90h wurden die Glasdeckelchen mit PBS gewaschen und 10min bei RT mit Paraformaldehyd 4% in PBS fixiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit PBS, dann wurden die Gläschen mit der Zellseite nach oben auf Objektträger (Marienfeld) gelegt und mit einem dünnen Glasplättchen, das mit einem Tropfen Permafluor „mounting medium“ (Immunotech) versehen war, bedeckt. Bei 4°C härtete dieses Einbettmedium aus und die so präparierten Zellen konnten konfokal mikroskopiert oder zunächst für mehrere Tage gelagert werden. Um die Zellmembran zu visualisieren, wurden jedem Tranfektionsansatz ausserdem 0,2µg/well pEGFP-Mem (2.1.4) zugesetzt.

2.18.2 Mikroskopie

Die Untersuchungen am LSM 510 META wurden mit einem 63x Ölimmersionsobjektiv durchgeführt. Je nach fluoreszierendem Protein wurden unterschiedliche Laser und Wellenlängen zur Anregung benutzt (Tab. 2).

Tab. 2 Anregungswellenlängen der verwendeten fluoreszierenden Proteine

| Protein | Laser | Anregungswellenlänge |
|---------|---------|----------------------|
| EGFP | Argon/2 | 488nm |
| RFP | HeNe1 | 543nm |
| EGFP | Argon/2 | 458nm |

Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mit der von der Fa. Zeiss bereitgestellten Software (Confocal Microscopy Software Release 3.0).

2.19 Elektrophysiologische Untersuchungen

2.19.1 Grundlagen und Durchführung

Die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden mit der Ganzzell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik (Hamill et al. 1981) bei RT durchgeführt. HEK Zellen wurden zwei bis drei Tage nach Transfektion auf Deckgläschen ausgesät (2.12) und in einer Kammer unter mikroskopischer Beobachtung gemessen. Testsubstanzen wie zyklische Nukleotide wurden über die Pipette zugesetzt. Die Ableitung erfolgte mit Hilfe von Glaselektroden (Patch Pipetten), die an einen Axopatch 200 B Verstärker (Axon Instruments) gekoppelt waren. Die Patchpipette wurde auf die Zelloberfläche gebracht und durch Sog der unter der Pipettenöffnung befindliche Membranausschnitt in die Pipette eingesaugt. Hierdurch erhöhte sich der Pipettenwiderstand bis in den Gigaohmbereich (Gigaseal). Das Membranstück wurde durch kurzzeitigen starken Unterdruck durchbrochen und als Fläche lag hierdurch die gesamte Zelloberfläche der Messung zugrunde. Nach dem Durchriss hatte das Zellinnere direkte Verbindung zur Pipettenlösung und wurde von dieser dialysiert. Die Daten wurden bei 10kHz unter Verwendung der pCLAMP 8 Software (Axon Instruments) aufgenommen und analysiert.

| Badlösung (extrazellulär) | | Pipettenlösung (intrazellulär) | |
|----------------------------------|-------|---------------------------------------|-------|
| NaCl (Merck) | 110mM | KCl | 130mM |
| MgCl ₂ (Merck) | 0,5mM | NaCl | 10mM |
| CaCl ₂ (Merck) | 1,8mM | MgCl ₂ | 0,5mM |
| HEPES | 5mM | EGTA (Sigma) | 1mM |
| KCl (Merck) | 30mM | HEPES | 5mM |
| pH7,4 (NaOH) | | Mg-ATP (Sigma) | 3mM |
| | | pH7,4 (KOH) | |

2.19.2 Messprotokolle

Ausgehend von einem Haltepotential von -40mV wurde für $3,25\text{s}$ das Membranpotential auf Werte zwischen -140mV und -30mV geklemmt (Vorpulse). Anschliessend wurde ein 500ms langer Testpuls von -140mV appliziert. Die Tail-Ströme, die unmittelbar nach dem letzten Schritt zu -140mV aufgenommen wurden, sind als Stromdichte (pA/pF) dargestellt. Die Daten wurden nach Normalisierung mittels der Boltzmann Funktion gefittet: $(I - I_{\min}) / (I_{\max} - I_{\min}) = [1 - \exp([V_m - V_{0,5}] / k)]$.

Die Zeitkonstanten der Kanalaktivierung (τ_{act}) von HCN Kanälen und deren Mutanten wurden nach hyperpolarisierenden Pulsen (4,25s) auf -140mV durch „fitten“ mittels einer Exponentialfunktion ermittelt.

Die Neuraminidase-Behandlung erfolgte wie durch Tyrell et al. (2001) beschrieben. Transfizierte HEK Zellen wurden vor der Messung für sechs Stunden mit $0,3\text{U/ml}$ Neuraminidase Typ X (Sigma) inkubiert. Vor der Aufnahme wurde das Enzym durch die extrazelluläre Lösung ausgewaschen. Als Kontrolle dienten unbehandelte, transfizierte HEK Zellen.

Die Messungen zur Bestimmung der cAMP-Abhängigkeit von mHCN2 und Mutanten 1-3 wurden mit einer cAMP-Konzentration von 1mM durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Heteromerisierung von HCN Kanälen

Die in der Literatur beschriebenen I_h Studien zeigen eine grosse Variabilität in Bezug auf die Aktivierungskinetik, die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und die Modulation durch cAMP. Diese Unterschiede sind zum Teil durch die Eigenschaften von HCN1-4 zu erklären. Für spannungsabhängige Kaliumkanäle wurde gezeigt, dass sie in Form von Heterotetrameren in der Zellmembran vorliegen (Yellen 2002) und es so *in vivo* zur Ausbildung eines charakteristischen Stroms kommt. Basierend auf der grossen strukturellen Ähnlichkeit mit spannungsabhängigen Kaliumkanälen ist es denkbar, dass auch HCN Kanäle diese Struktur ausbilden. In heterologen Expressionssystemen wurden bisher erste Hinweise auf die Bildung von Heteromultimeren zwischen HCN1 und HCN2 gefunden (Chen et al. 2001, Ulens und Tygat, 2000, Xue et al. 2002). In neonatalen Kardiomyozyten deuten Versuche auf eine Interaktion zwischen HCN2 und HCN4 hin (Er et al. 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals systematisch die Heteromerisierung zwischen HCN Isoformen untersucht.

3.1.1 Klonierung von Fusionsproteinen

Zur Visualisierung der HCN Kanäle per Mikroskopie und zum Präzipitieren mit spezifischen Antikörpern (3.1.4) wurden die Gene für mHCN1, mHCN2 und mHCN3 (Ludwig et al. 1998) und für hHCN4 (Ludwig et al. 1999) aus dem Expressionsvektor pcDNA3 im Leserahmen an den N-Terminus von Genen für fluoreszierende Proteine bzw. für das Myc-Epitop in die Vektoren pDsRed1-N1, pEGFP-N1-N3 und pcDNA3.1 Myc kloniert (2.1.4) (Abb. 3.1-1).

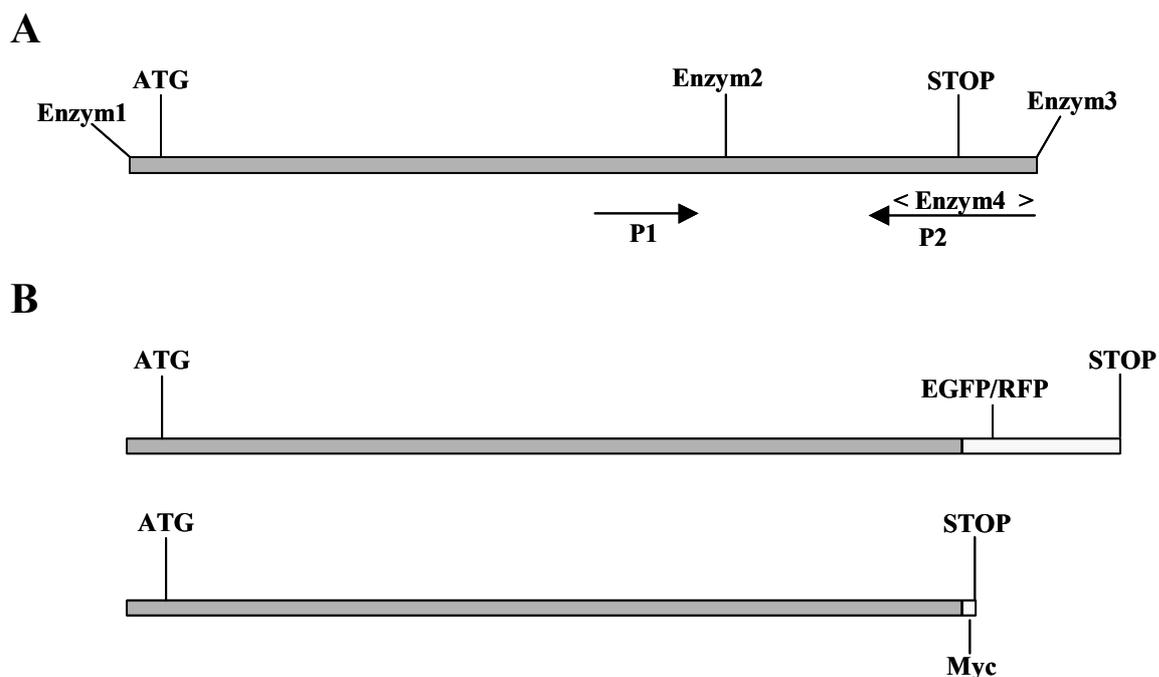


Abb. 3.1-1 Klonierung der HCN Gene in die „Living colours fluorescent protein vectors“ pDsRed1-N1, pEGFP-N1, pEGFP-N3 und in pcDNA3.1 Myc.

A: Gezeigt ist schematisch ein HCN Gen, das über Enzym1 und Enzym3 in pcDNA3 kloniert ist. Durch PCR mit Primerpaar P1/P2 wird anstelle des STOP-Kodons eine Schnittstelle der MKS des neuen Vektors eingefügt (< Enzym 4 >), wobei P2 die entsprechende Mutation trägt (Zur genauen Klonierung siehe 2.1.4.). Die für die einzelnen Konstrukte verwendeten Enzyme und Primerpaare sind in Tab. 3, die Sequenzen der Primer in 6.2 aufgelistet. B: Dargestellt ist die schematische Abbildung der aus der Klonierung in A resultierenden Fusionskonstrukte von HCN Kanälen mit EGFP bzw. RFP (720bp bzw. 681bp) und Myc-tag (29bp). Die dunkelgrauen Bereiche stellen die HCN Gene dar, die hellgrauen Bereiche die Gene für EGFP bzw. RFP und für Myc-tag. Die Genexpression erfolgt vom ATG der HCN Sequenz bis zum STOP-Kodon des Markerproteins.

Tab. 3 Enzyme und Primerpaare zur Klonierung der Fusionsproteine.

| Konstrukt | Enzym1 | Enzym2 | Enzym4 | P1 | P2 | Vektor |
|----------------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------------|
| mHCN1-EGFP | HindIII | ApaLI | BamHI | BM132F | BM135R | pEGFP-N3 |
| mHCN1-Myc | HindIII | ApaLI | BamHI | BM132F | BM135R | pcDNA3.1 Myc |
| mHCN2-EGFP | EcoRI | XhoI | KpnI | BM39F | BM35R | pEGFP-N1 |
| mHCN2-RFP | EcoRI | XhoI | KpnI | BM39F | BM35R | pDsRed1-N1 |
| mHCN2-Myc | EcoRI | XhoI | XbaI | BM39F | BM42R | pcDNA3.1 Myc |
| mHCN3-EGFP | HindIII | XmaI | AccI | BM40F | BM34R | pEGFP-N1 |
| mHCN3-RFP | HindIII | XmaI | AccI | BM40F | BM34R | pDsRed1-N1 |
| mHCN3-Myc | HindIII | XmaI | BamHI | BM40F | BM43R | pcDNA3.1 Myc |
| hHCN4-EGFP | EcoRI | BamHI | KpnI | BM41F | BM51R | pEGFP-N1 |
| hHCN4-RFP | EcoRI | BamHI | KpnI | BM41F | BM51R | pDsRed1-N1 |
| hHCN4-Myc | EcoRI | BamHI | XhoI | BM41F | BM50R | pcDNA3.1 Myc |
| Mut.Gly2-EGFP | EcoRI | XhoI | KpnI | BM39F | BM35R | pEGFP-N1 |

3.1.2 Elektrophysiologische Untersuchung von mHCN2-EGFP und hHCN4-RFP

Zur funktionellen Charakterisierung der Fusionsproteine wurden HEK Zellen exemplarisch mit mHCN2-EGFP und hHCN4-RFP transfiziert und im Ganzzellmodus Stromkurven aufgezeichnet. EGFP und RFP sind im Gegensatz zum Myc-Epitop sehr grosse Proteine (EGFP: 27kDa, RFP: 26kDa) und so sollte der Nachweis erbracht werden, dass die Kanaleigenschaften grundsätzlich nicht verändert werden. Es ergaben sich bei den Messungen (Abb. 3.1-2) keine auffälligen Unterschiede im Vergleich zu nicht-fusionierten Kanälen. Sowohl nach Transfektion von mHCN2-EGFP als auch von hHCN4-RFP wurden nach Hyperpolarisation Einwärtsströme beobachtet, wobei mHCN2 charakteristisch schneller aktivierte.

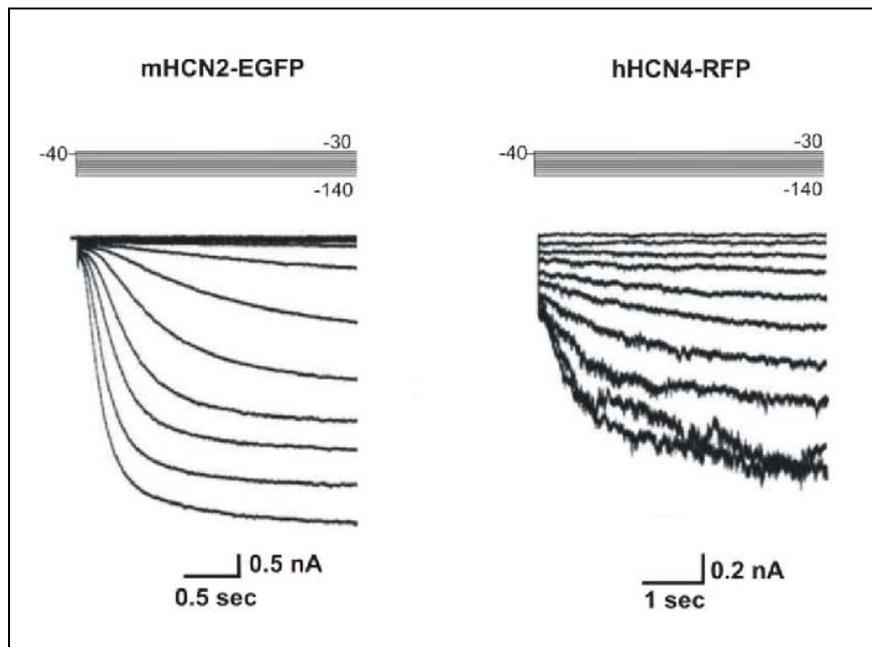


Abb. 3.1-2 Elektrophysiologische Untersuchung von mHCN2-EGFP und hHCN4-RFP

Dargestellt sind Ganzzellströme von HEK Zellen, die transient mit mHCN2-EGFP (links) bzw. mit hHCN4-RFP (rechts) transfiziert wurden.

3.1.3 Untersuchung der Ko-Lokalisation durch konfokale Mikroskopie

Die Ko-Lokalisation von jeweils zwei HCN Kanälen wurde 90h nach transienter Transfektion der beschriebenen fluoreszierenden Fusionskonstrukte in HEK Zellen durch konfokale Mikroskopie untersucht (2.18). In Abb. 3.1-3 sind die Ergebnisse nach Transfektion von mHCN1-EGFP, mHCN2-RFP und pECFP-Mem zur Visualisierung der Plasmamembran gezeigt. Sowohl mHCN1 (A) als auch mHCN2 (B) befinden sich in der Plasmamembran (C), wie die exemplarische Überlagerung der Einzelbilder von mHCN1-EGFP und der Plasmamembran zeigt (E). D zeigt die Kolokalisation der beiden Proteine in der Zellmembran durch die fast durchgängige Gelbfärbung.

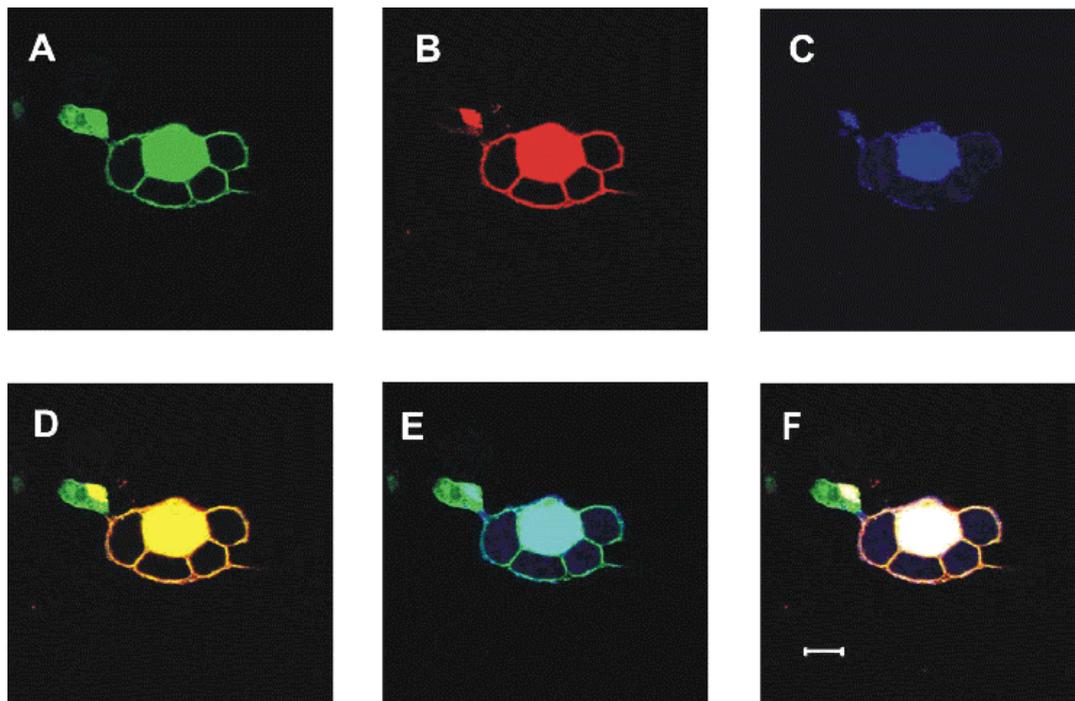


Abb. 3.1-3 Konfokale Mikroskopie von HEK Zellen nach Transfektion von HCN1-EGFP, HCN2-RFP und pECFP-Mem

Zu sehen ist eine Gruppe von 4 intakten Zellen. Der zentrale, gefärbte Bereich stellt eine fünfte, zugrundegegangene Zelle dar. A: mHCN1-EGFP; B: mHCN2-RFP; C: pECFP-Mem (Marker zur Visualisierung der Zellmembran); D: Überlagerung von A und B; E: Überlagerung von A und C; F: Überlagerung von A, B und C. Der Balken zeigt 10 μ m an.

Auch alle anderen Zweierkombinationen von HCN Untereinheiten wurden konfokalmikroskopisch untersucht. In Abb. 3.1-4 (siehe nächste Seite) sind die Kombinationen mHCN1-EGFP/mHCN3-RFP (A-C) , mHCN1-EGFP/hHCN4-RFP (D-E), mHCN2-EGFP/mHCN3-RFP (G-H), mHCN2-EGFP/hHCN4-RFP (K-M) und mHCN3-EGFP/hHCN4-RFP (N-P) zu sehen. Alle Ionenkanäle sind im Bereich der Plasmamembran lokalisiert und ausser mHCN2-EGFP und mHCN3-RFP lässt sich für alle Kombinationen eine Kolokalisation beobachten (Gelbfärbung im überlagerten Bild). Bei mHCN2-EGFP/mHCN3-RFP erscheint das überlagerte Bild (I) diffus. Die punktuelle Gelbfärbung kommt eventuell durch benachbarte, aber nicht kolokalisierte Kanäle zustande.

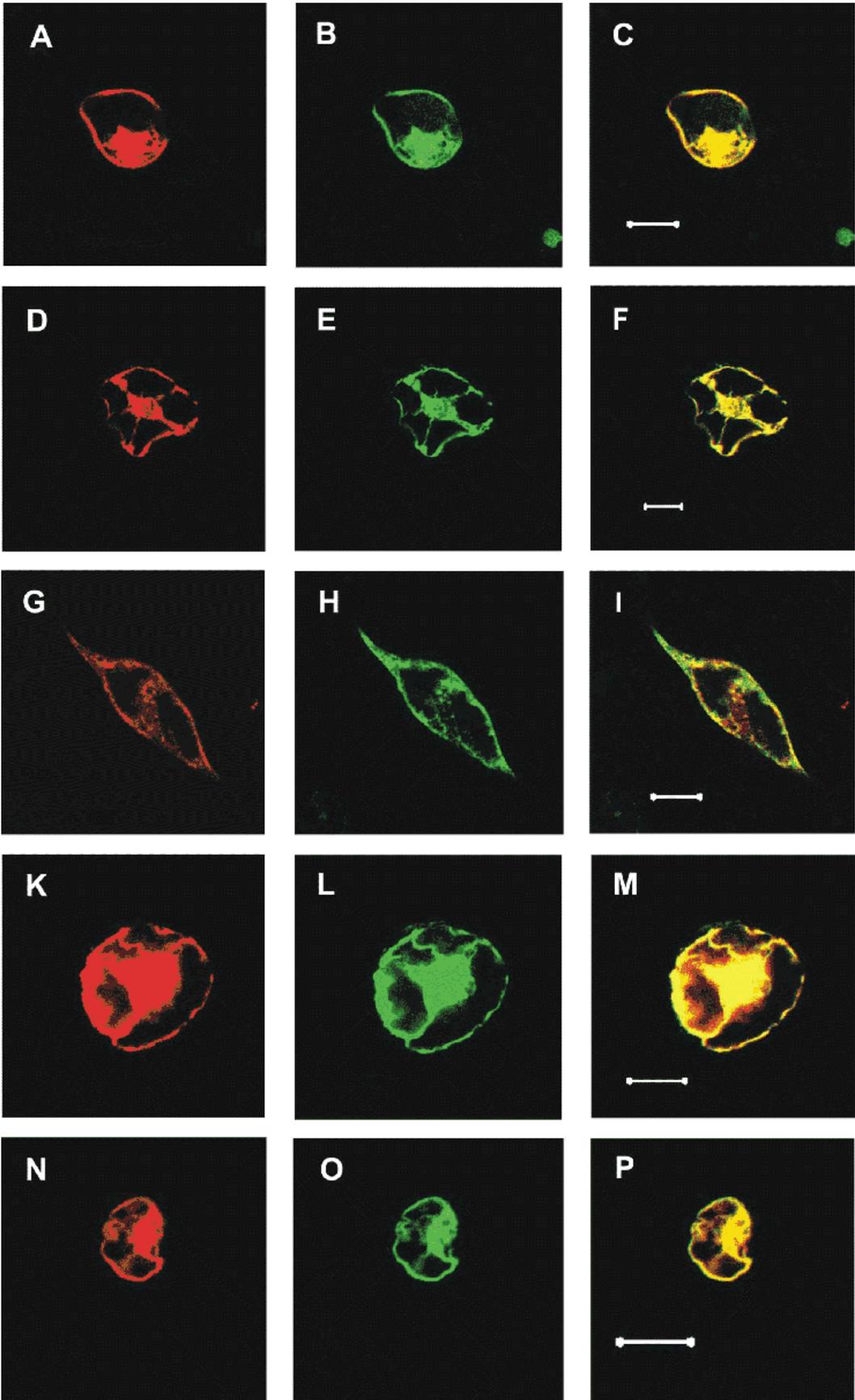


Abb. 3.1-4 Konfokale Mikroskopie von HEK Zellen nach Transfektion von fluoreszierenden HCN Untereinheiten

A-C: mHCN1-EGFP/mHCN3-RFP, D-E: mHCN1-EGFP/hHCN4-RFP, G-H: mHCN2-EGFP/mHCN3-RFP, K-M: mHCN2-EGFP/hHCN4-RFP, N-P: mHCN3-EGFP/hHCN4-RFP. Die Aufnahmen C, F, I, M und P zeigen jeweils die überlagerten Bilder der entsprechenden Reihe. Die Balken zeigen 10µm an.

3.1.4 Ko-Immunpräzipitation von HCN Kanälen

Der Nachweis einer direkten Interaktion von HCN Kanälen sollte mittels Ko-Immunpräzipitationen (2.17) erbracht werden. *In vivo* wurde die Ko-IP aus totalem Mausehirnlysate mit einem Antikörper gegen mHCN2 durchgeführt. mHCN1 und mHCN2 bilden im Gehirn Heteromere (Abb. 3.1-5), da der Komplex mit Anti- HCN2 gefällt werden und mit Anti-HCN1 detektiert werden konnte. HCN1 liegt hier ausschliesslich in einer ca. 125kDa schweren glycosylierten Form vor (3.2.1).

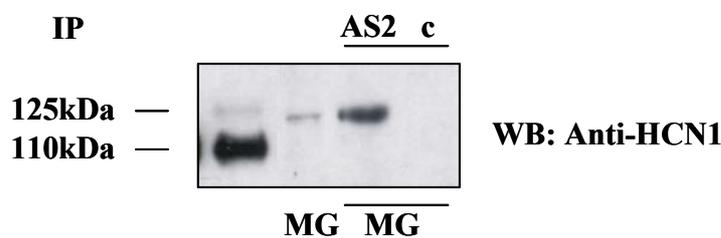


Abb. 3.1-5 Ko-Immunpräzipitation aus Mausehirn

Western Blot visualisiert mit Anti-HCN1. MG: Mausehirnlysate; AS2: Anti-HCN2; c: Anti-CNG6; Zum Grössenvergleich sind 75µg totales Mausehirnlysate (MG) und 10µg Membranpräparation aus mHCN1-transfizierten HEK Zellen (ganz links) aufgetragen.

Zum Nachweis einer Interaktion der übrigen HCN Kanäle wurden jeweils zwei cDNAs in HEK Zellen transfiziert, wobei immer eine HCN Isoform mit einem Myc-tag (3.1.1) versehen war. Nach Präzipitation der Komplexe aus dem Zellysate mit einem Anti-Myc-Antikörper wurden die Proteine durch SDS PAGE aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern gegen die zweite Untereinheit nachgewiesen. Nur im Falle einer Interaktion zwischen zwei HCN Kanälen lässt sich so im Western Blot ein Signal detektieren. Der verwendete Lysepuffer soll nur Membranen lysieren und andere intrazelluläre Kompartimente sowie den Zellkern intakt belassen. Nach den Western Blots aus Abb. 3.1-6 besteht eine Interaktion zwischen mHCN1 und mHCN2, mHCN1 und mHCN3, mHCN1 und hHCN4, mHCN2 und hHCN4 sowie mHCN3 und hHCN4. Für mHCN2 und mHCN3 lässt sich auch mit dieser Methode keine Interaktion nachweisen.

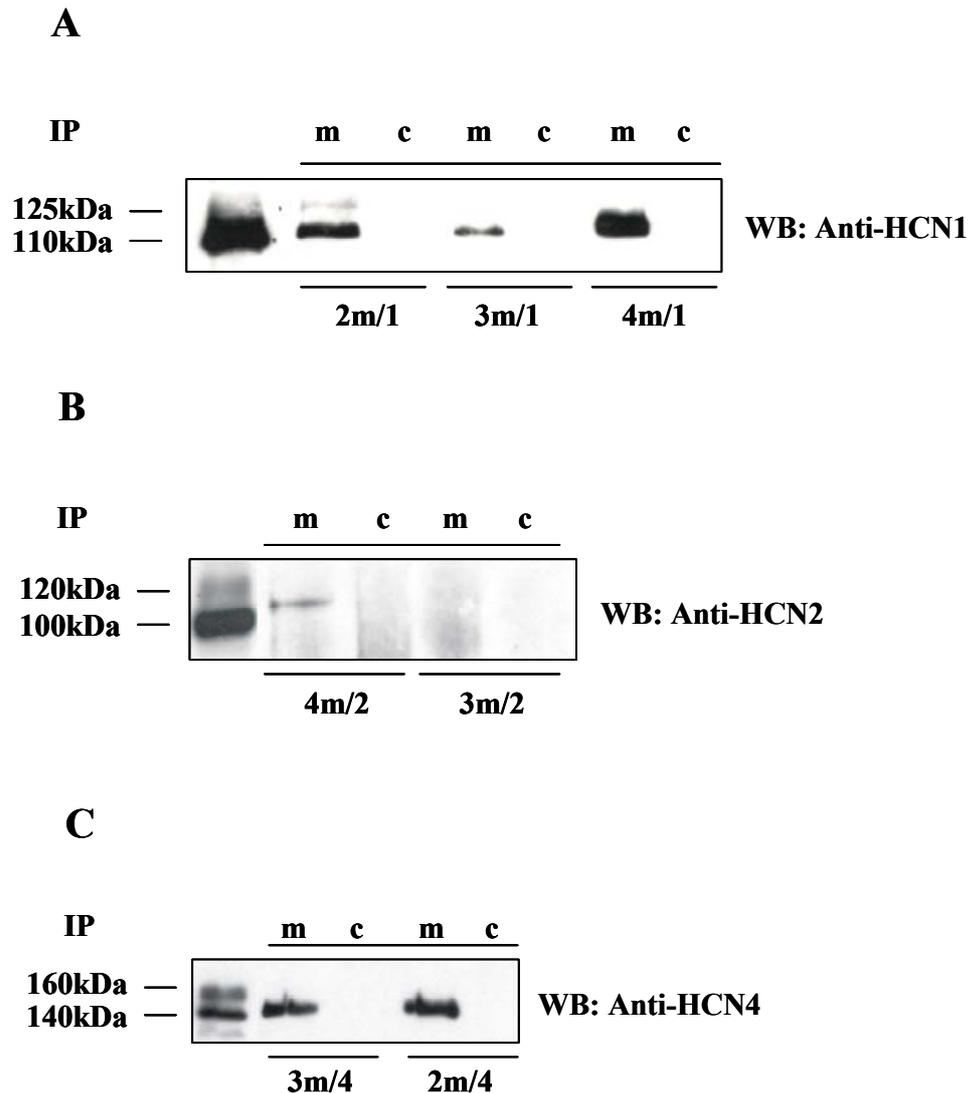


Abb. 3.1-6 Ko-Immünpräzipitation von HCN Untereinheiten

Gezeigt sind Western Blots mit den Ergebnissen der Ko-Immünpräzipitationen aus HEK Zellen. 2m: mHCN2-Myc; 3m: mHCN3-Myc; 4m: hHCN4-Myc; 1: mHCN1/pcDNA3; 2: mHCN2/ pcDNA3; 3: mHCN3/pcDNA3; 4: hHCN4/pcDNA3; m: Anti-Myc (Cell signalling); c: Anti-CNG6. Antikörper für den Immunoblot: A: Anti-HCN1 (Alomone); B: Anti-HCN2; C: Anti-HCN4 (Alomone). Zum Grössenvergleich ist auf der linken Bahn jeweils eine Membranpräparation aus mit mHCN1/pcDNA3 (A; 10 μ g), mHCN2/pcDNA3 (B; 10 μ g) bzw. hHCN4/pcDNA3 (C; 30 μ g) transfizierten HEK Zellen aufgetragen.

3.1.5 Elektrophysiologische Charakterisierung von HCN Interaktionen

Die einzigen HCN Kanäle, für die mit den beschriebenen Methoden keine Interaktion gezeigt werden konnte, sind mHCN2 und mHCN3. Diese Beobachtung sollte durch elektrophysiologische Messungen in HEK Zellen bestätigt werden. Zur erleichterten Lokalisierung wurden dafür Fusionskonstrukte aus HCN Kanälen und fluoreszierenden Proteinen verwendet. mHCN2-EGFP bzw. mHCN2-EGFP und mHCN3-RFP wurden transient in HEK Zellen transfiziert und nach Messung im Ganzzellmodus wurden die

Stromdichten, $V_{0,5}$ und die Zeitkonstanten τ_{akt} bestimmt. Tab. 4 zeigt die ermittelten Werte. In Abb. 3.1-7 sind zwei charakteristische Stromspuren für mHCN2-EGFP bzw. für die Kombination mHCN2-EGFP und mHCN3-RFP gezeigt. Die Stromdichte wurde nach Kotransfektion von mHCN2-EGFP und mHCN3-RFP um 43% reduziert, was auf einen inhibitorischen Effekt hindeutet. Bei Vergleich von $V_{0,5}$ und τ_{akt} ergeben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Ansätzen. Die ermittelte $V_{0,5}$ entspricht in beiden Fällen der von Wildtyp mHCN2, so dass mHCN3-RFP hier nicht zum gemessenen Strom beitragen kann. Die Geschwindigkeit der Aktivierung ist in beiden Fällen im Vergleich zu Wildtyp mHCN2 (ca.200ms) signifikant erniedrigt, was durch die Fusion mit EGFP verursacht wird. Da sich aber kein Unterschied zwischen mHCN2-EGFP und mHCN2-EGFP + mHCN3-RFP feststellen lässt, liefern diese Untersuchungen keinen Hinweis auf eine Interaktion zwischen mHCN2 und mHCN3.

Tab. 4 Stromdichten, $V_{0,5}$ und τ_{akt} -Werte für mHCN2-EGFP und mHCN2-EGFP mit mHCN3-RFP

| | mHCN2-EGFP | n | mHCN2-EGFP + mHCN3-RFP | n |
|-------------------------------------|---------------|----|------------------------|----|
| Stromdichte (pA/pF) | 184 ± 23 | 34 | 105 ± 29 | 18 |
| $V_{0,5}$ (mV) | -103.0 ± 0.92 | 16 | -99.24 ± 2.26 | 5 |
| τ_{akt} (ms) | 406.4 ± 21.28 | 20 | 498.3 ± 68.15 | 8 |

Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM angegeben

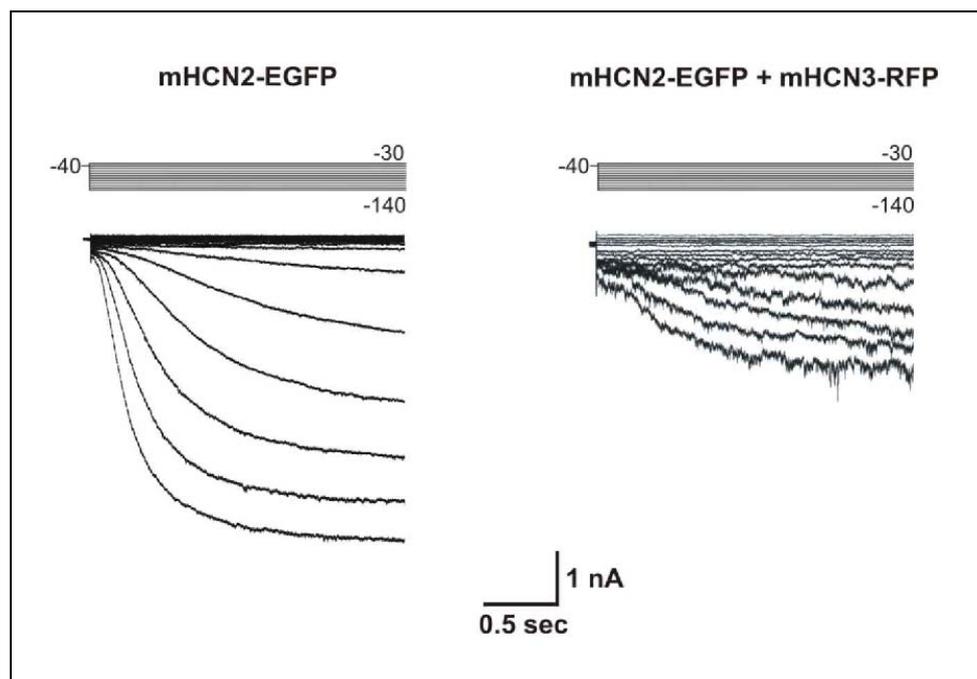


Abb. 3.1-7 Stromspuren von mHCN2-EGFP und mHCN2-EGFP mit mHCN3-RFP

Dargestellt sind Stromkurven, die durch Ganzzellmessungen von transient mit mHCN2-EGFP (links) bzw. mHCN2-EGFP und mHCN3-RFP (rechts) transfizierten HEK Zellen nach hyperpolarisierenden Pulsen abgeleitet wurden.

3.2 Glycosylierung von HCN Kanälen

Die posttranslationale Glycosylierung von Plasmamembran- und Sekretproteinen spielt eine entscheidende Rolle beim Transport innerhalb der Zelle. Frühere Studien gaben Hinweise darauf, dass auch HCN1 durch N-Glycosylierung modifiziert wird (Santorro et al. 1997). Deren Bedeutung blieb allerdings unbeantwortet und sollte in dieser Arbeit durch biochemische und funktionelle Studien am Beispiel des global exprimierten HCN2 erarbeitet werden.

3.2.1 Enzymatische Deglycosylierung von HCN Kanälen

N-Glycosidase F ist ein Enzym aus *Flavobacterium meningosepticum* (Elder et al. 1982, Plummer et al. 1984), das alle Typen Asparagin-gebundener N-Glycanketten spaltet und zum Nachweis glycosylierter HCN Untereinheiten verwendet wurde (Abb. 3.2-1). Die unbehandelten HCN Proteine aus transfizierten HEK Zellen zeigen im Western Blot zwei Banden. Die untere entspricht jeweils der theoretisch berechneten von ca. 105kDa (mHCN1), ca. 95kDa (mHCN2) und ca. 130kDa (hHCN4), wobei die Proteine hier stets ca. 5kDa höher laufen, was z.B. durch gehäuftes Vorkommen bestimmter Aminosäuren erklärt werden kann (z.B. HCN2: Prolin). Die oberen Banden sind je nach Untereinheit 15-25 kDa grösser. Nach Inkubation mit N-Glycosidase F werden die grösseren Banden abgebaut und die kleineren werden entsprechend intensiver. Im Mausgehirn lassen sich fast ausschliesslich die grösseren, glycosylierten Banden detektieren, die nach Enzymbehandlung zum Grossteil abgebaut vorliegen.

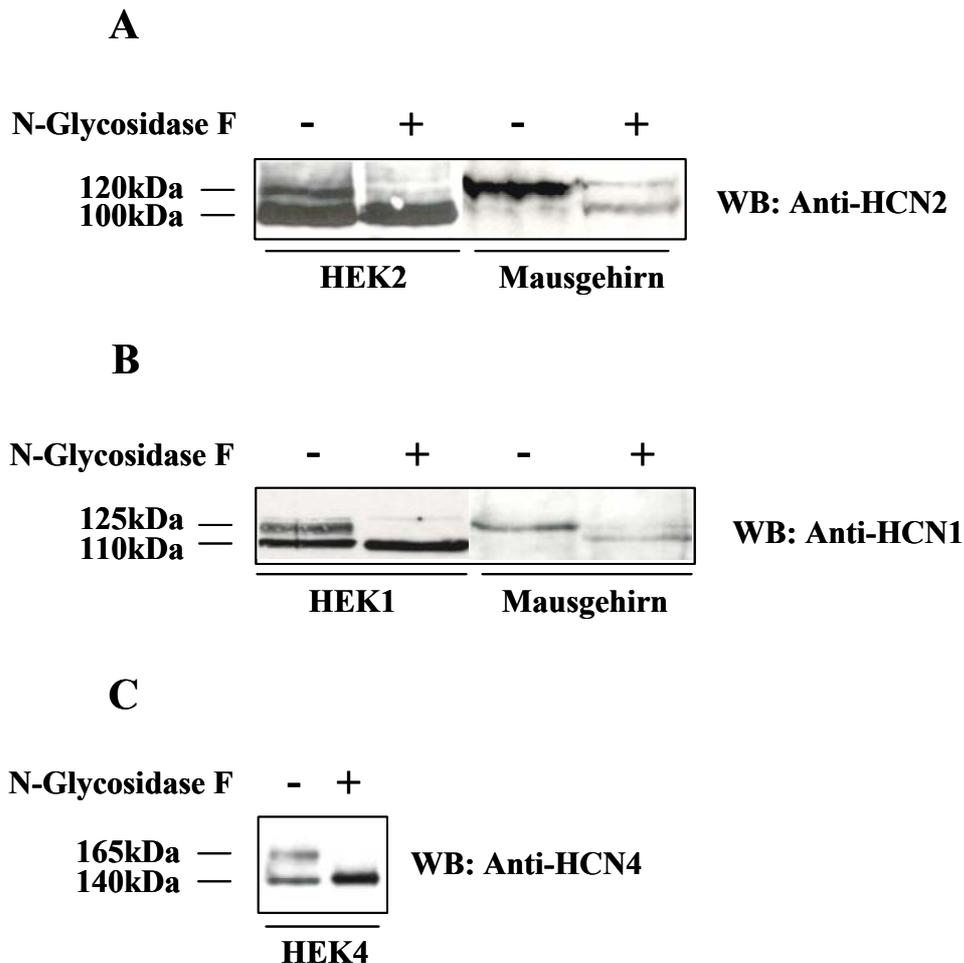


Abb. 3.2-1 Enzymatische Deglycosylierung von HCN Untereinheiten

Western Blots visualisiert mit Anti-HCN-Antikörpern; Membranpräparationen aus stabil transfizierten (mHCN1/pcDNA3: HEK1 und hHCN4/pcDNA3: HEK4; siehe auch 2.12.4) bzw. transient transfizierten (mHCN2/pcDNA3: HEK2) HEK Zellen (40µg mHCN2, 30µg mHCN1, 50µg hHCN4) bzw. 100µg Membranpräparationen aus Mausgehirn wurden über Nacht mit N-Glycosidase F verdaut (+) bzw. nur mit Puffer inkubiert (-). Verwendete Antikörper für den Immunoblot: A: Anti-HCN2; B: Anti-HCN1; C: Anti-HCN4.

3.2.2 Deglycosylierung von mHCN2 durch Mutagenese

Um den für die Glycosylierung verantwortlichen Aminosäurerest zu bestimmen, wurde mittels des Programms „Prosite“ des DKFZ Heidelberg exemplarisch die Sequenz des mHCN2 auf Asparagin-Glycosylierungserkennungssequenzen hin durchsucht. Grundsätzlich kann diese Modifizierung an Asparaginresten nur bei Vorliegen der Sequenz N-(P)-[ST]-(P) erfolgen ((P): jede Aminosäure ausser Prolin, [ST]: Serin oder Threonin). An den Aminosäurepositionen 380-383 befindet sich im mHCN2 eine solche Erkennungssequenz (NHSW), die nach der vermuteten Struktur für HCN Kanäle in einem für Glycosylierungen notwendigerweise extrazellulären Bereich liegt (Schleife zwischen Segment S5 und der Pore). Durch PCR wurde dieser Asparaginrest zu Glutamin (Q) mutiert, um die Effekte einer

fehlenden Glycosylierung zu untersuchen (Abb. 3.2-3). Zur Lage des Asparagin 380 siehe Abb. 3.2-2.

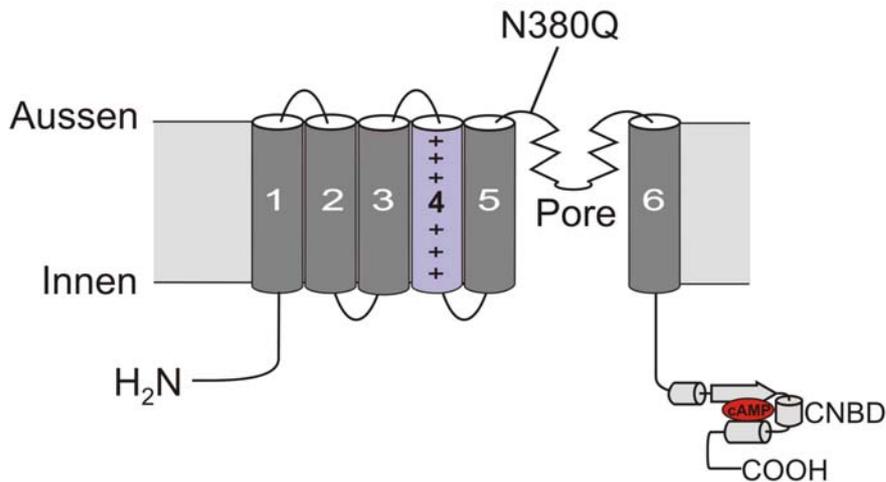


Abb. 3.2-2 Lage der Glycosylierungsstelle im mHCN2

Schematische Abbildung des mHCN2 Kanals. An Position 380 in der Schleife zwischen S5 und der Kanalpore befindet sich der in dieser Arbeit mutierte Asparaginrest.

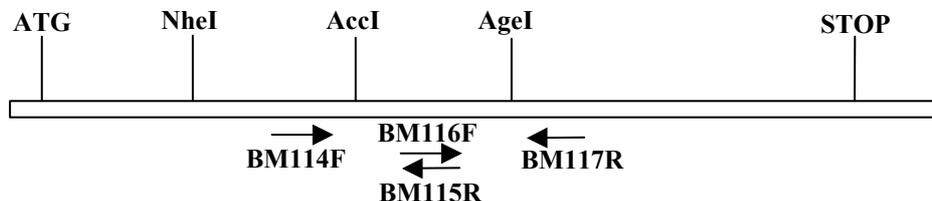


Abb. 3.2-3 Konstruktion einer glycosylierungsdefizienten Mutante von mHCN2 (Mut.Gly2)

Durch überlappende PCR ausgehend von mHCN2/pcDNA3 mit den Primern BM114F – BM117R wurde N380 (ntAAC) zu Q380 (ntCAG) mutiert. Das PCR-Fragment wurde mit AccI und AgeI geschnitten. Durch Verdau von mHCN2/pcDNA3 mit NheI und AccI wurde ein zweites Stück präpariert, da AccI in pcDNA3 schneidet. Diese beiden Teile wurden in mit NheI und AgeI geschnittenen und dephosphorylierten mHCN2/pcDNA3 ligiert.

Das mutante Konstrukt Mut.Gly2 wurde wie auch Wildtyp mHCN2 nach Calciumphosphat-Transfektion in HEK Zellen exprimiert und die präparierten Membranen durch Western Blot untersucht (Abb. 3.2-4). Die mit mHCN2/pcDNA3 transfizierten Zellen zeigen eine glycosylierte und eine unglycosylierte Fraktion, wobei die glycosylierte nach Verdau mit N-Glycosidase F abgebaut wird (3.2.1). Durch die Mutation N→Q in Mut.Gly 2 wurde die Glycosylierungssequenz zerstört, was durch die Abwesenheit der ca. 120kDa grossen Bande bestätigt wird.

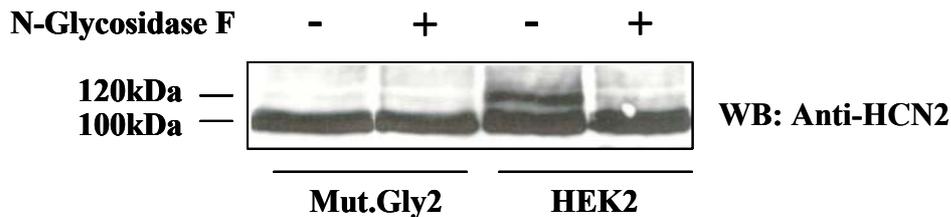


Abb. 3.2-4 N-Glycosidase F-Behandlung von mHCN2 und Mut.Gly2

Western Blot nach N-Glycosidase F-Verdau (+) bzw. Inkubation mit Puffer (-) von Membranpräparationen aus HEK Zellen. Primärer Antikörper: Anti-HCN2. Pro Gelspur wurden 40µg HEK Mut.Gly2 bzw. 40µg HEK mHCN2 (HEK2) geladen.

3.2.3 Zelluläre Verteilung von glycosylierungsdefizientem mHCN2

Mut.Gly2 wurde wie in 3.1.1 beschrieben in pEGFP-N1 kloniert (Mut.Gly2-EGFP), um die zelluläre Lokalisation des mutierten Kanals zu klären (Abb. 3.2-5). Die Expression von mHCN2-EGFP in HEK Zellen zeigt, wie schon beschrieben, die plasmamembranäre Verteilung des Ionenkanals (A-C). Mut.Gly2 hat die Fähigkeit, zur Zellmembran zu gelangen durch Deletion der Glycosylierungsstelle verloren, was durch die gesamtzelluläre Verteilung des Konstruktes und die fehlende Überlagerung mit dem Zellmembranmarker ECFP-Mem deutlich wird (D-E). Wird Mut.Gly2 jedoch mit hHCN4-RFP (H) kotransfiziert, so ist die Membranständigkeit wieder gegeben (G) und für beide Proteine ist aufgrund der Gelbfärbung im überlagerten Bild eine Kolo-kalisation nachweisbar (I). Die Interaktion zwischen mHCN2 und hHCN4 muss also bereits vor dem Eintritt in die Plasmamembran stattfinden. Nach Kotransfektion von Mut.Gly2 (K) mit mHCN3-RFP (L) wird die Mutante nicht zur Zellmembran transportiert, wohingegen mHCN3-RFP in der Plasmamembran detektiert werden kann. Das überlagerte Bild zeigt nur eine diffuse Gelbfärbung (M).

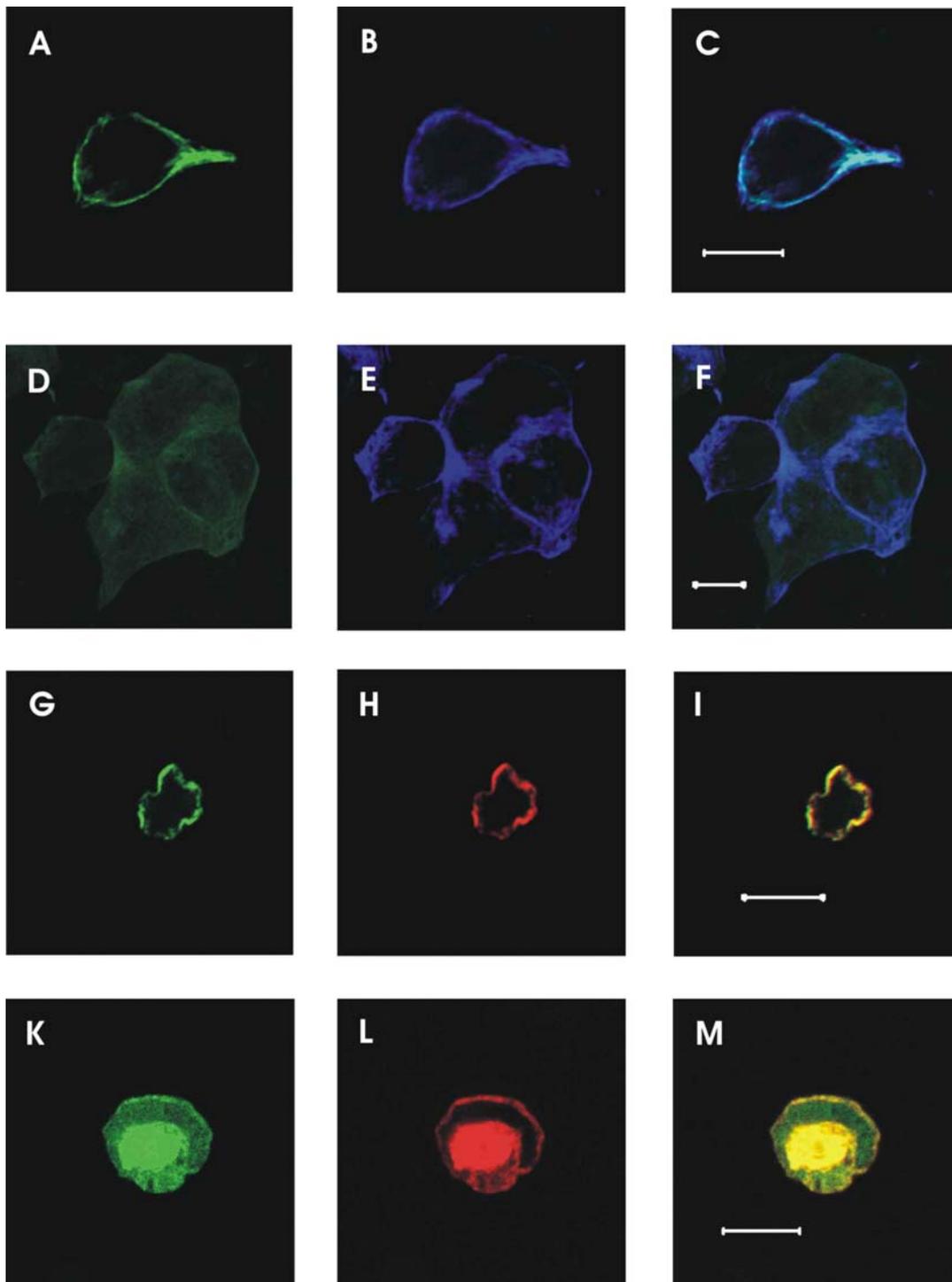


Abb. 3.2-5 Lokalisierungsstudien von mHCN2, Mut.Gly2 und mHCN3 in HEK Zellen

Konfokalmikroskopische Aufnahmen nach transienter Transfektion von HEK Zellen mit mHCN2-EGFP (A), pECFP-Mem (B,E) und Mut.Gly2-EGFP (D, G). In C und F sind zur Beurteilung der Membranständigkeit Überlagerungen von A und B bzw. D und E gezeigt. G-I: HEK Zellen wurden mit Mut.Gly2-EGFP (G) und hHCN4-RFP (H) kotransfiziert; I stellt das überlagerte Bild dar. K-L: HEK Zellen transfiziert mit Mut.Gly2-EGFP (K) und mHCN3-RFP (L). M zeigt die Überlagerung von K und L. Die Balken zeigen 10 μ m an.

Durch Ko-Immunpräzipitation von Mut.Gly2 und hHCN4 wurde die in Abb. 3.2-5 beobachtete Kolokalisation bestätigt. Das entsprechende Signal im Western Blot ist etwas schwächer als bei einer Präzipitation von mHCN2 und hHCN4 (Abb.3.2-6).

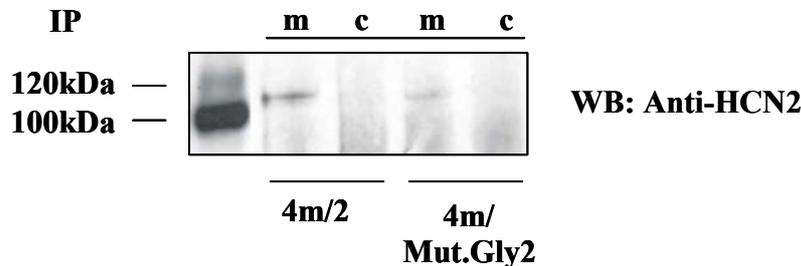


Abb.3.2-6 Ko-Immunpräzipitation von Mut.Gly2 und hHCN4

Western Blot mit Anti-HCN2 als primärem Antikörper. 4m: hHCN4-Myc; 2: mHCN2/pcDNA3; Mut.Gly2: Mut.Gly2/pcDNA3; m: Anti-Myc (Cell signalling); c: Anti-CNG6. Auf der linken Bahn sind zum Grössenvergleich 10µg Membranpräparation aus mit mHCN2/pcDNA3 transfizierten HEK Zellen aufgetragen.

3.2.4 Elektrophysiologische Charakterisierung von Mut.Gly2 und mHCN2

Abschliessend sollte der Effekt einer fehlenden Glycosylierung auf die Formation funktioneller Kanäle elektrophysiologisch in HEK Zellen untersucht werden (Abb. 3.2-7). Es wurden sowohl die Ganzzellströme von transient transfizierten mHCN2 Kanälen und Mut.Gly2 wie auch der Effekt von Neuraminidase auf den stabil transfizierten mHCN2 Kanal gemessen. Abb. 3.2-7 A zeigt charakteristische Stromspuren von mHCN2, die durch hyperpolarisierende Pulse hervorgerufen werden. Im Gegensatz dazu lassen sich mit den für HCN Kanäle gebräuchlichen hyperpolarisierenden Pulsen bei Mut.Gly2 keine Ionenströme beobachten (B). In Abb. 3.1-6 C ist eine Strom-Spannungsbeziehung von mHCN2 und Mut.Gly2 gezeigt. Neuraminidase entfernt enzymatisch Sialinsäurereste von der Zelloberfläche. Die Behandlung von stabil mit mHCN2 transfizierten HEK Zellen mit Neuraminidase (E) zeigt keinen signifikanten Einfluss (F) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (D).

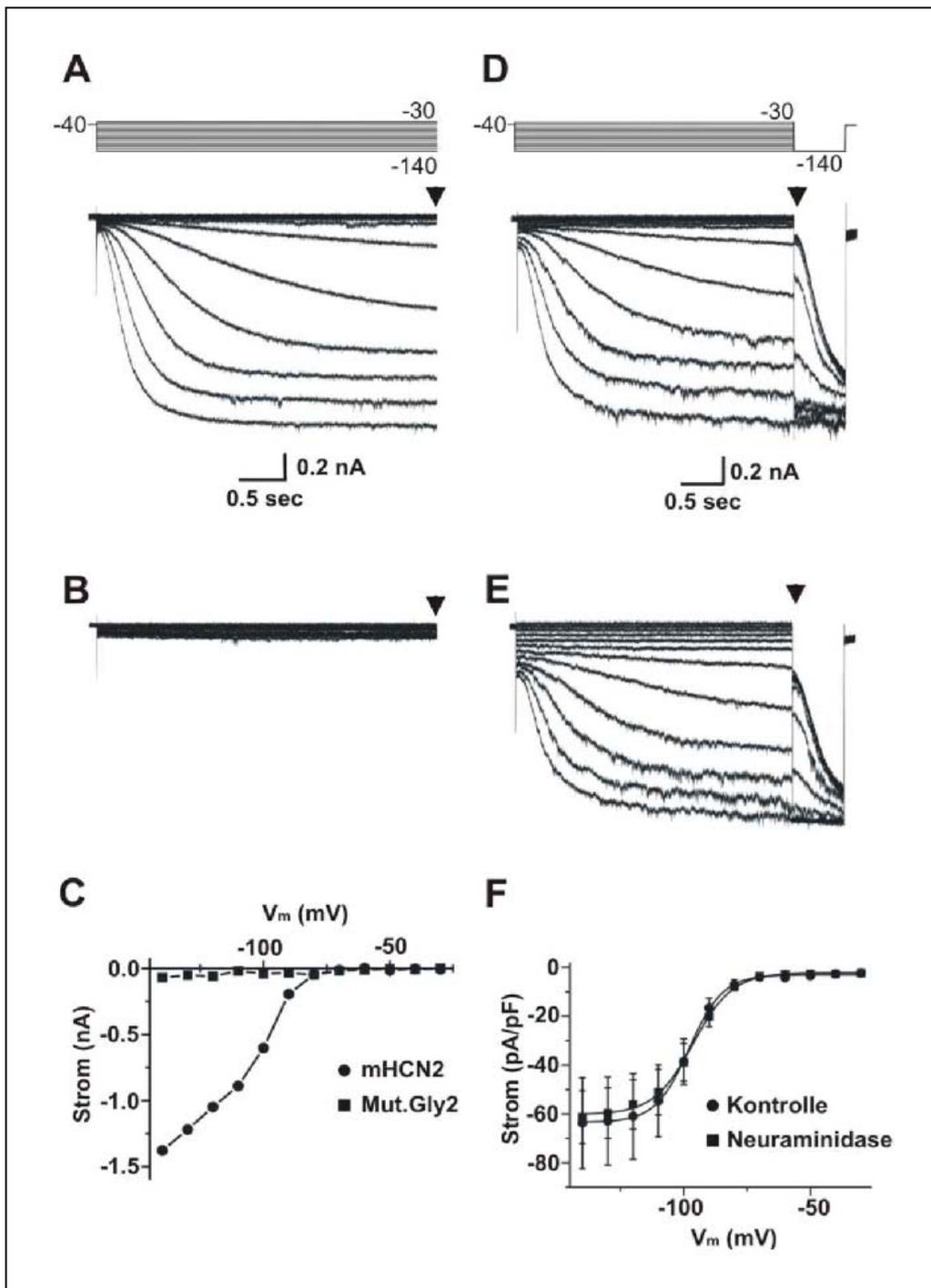


Abb. 3.2-7 Elektrophysiologische Charakterisierung von mHCN2 und Mut.Gly2

A-B: Ganzzellströme von HEK Zellen, die transient mit mHCN2/pcDNA3 (A) bzw. Mut.Gly2/pcDNA3 transfiziert wurden. C: Strom-Spannungskurven von mHCN2 und Mut.Gly2. Die Gleichgewichtsströme aus A und B wurden an den mit einem Pfeil gekennzeichneten Stellen aufgenommen. D-E: Stromspuren von stabil transfizierten HEK mHCN2 Zellen mit (E) oder ohne (D) Vorbehandlung mit Neuraminidase. F: Aktivierungskurven von mHCN2 nach (Neuraminidase) und ohne (Kontrolle) Neuraminidase-Behandlung. Die Tail-Ströme wurden unmittelbar nach dem Spannungswechsel auf -140mV (Pfeile in D und E) gemessen; die Balken kennzeichnen eine Anpassung der Daten nach der Boltzmann Gleichung. V_m : Membranspannung. Die $V_{0,5}$ -Werte und k -Werte sind für mHCN2 $-97,8\text{mV}$ und $6,7\text{mV}$ ($n=15$) sowie für Mut.Gly2 $-96,3\text{mV}$ und $7,8\text{mV}$ ($n=17$).

3.3 Funktionelle Eigenschaften von HCN Kanälen

3.3.1 cAMP Abhängigkeit

Um den Einfluss von zyklischen Nukleotiden auf die Aktivierung der HCN Kanäle näher zu charakterisieren, sollten im mHCN2 Kanal die für die Ligandenbindung potentiell bedeutenden Aminosäuren mutiert werden. Das Ziel war es, einen kleinstmöglichen Eingriff in der Bindungstasche vorzunehmen, um so einen Kanal zu erhalten, der nur noch spannungsabhängig aktiviert wird. Von CNG Kanälen wie auch von anderen zyklonukleotidgesteuerten Proteinen wie CAP oder PKA ist bekannt, dass ein zwischen den verschiedenen Proteinen hochkonservierter Arginin-Rest im β_7 -Faltblatt der CNBD essentiell für die Ligandenbindung ist (Tibbs et al. 1998) (siehe Sequenzvergleich in Abb. 3.3-1). Die auf das Arginin folgende Aminosäure (HCN Kanäle und CNG Kanäle: Threonin, PKA: Alanin) wurde in zyklonukleotid-abhängigen Proteinkinasen für die cGMP bzw. cAMP-Spezifität der Proteine verantwortlich gemacht (Shabb et al. 1990). Da sowohl die cAMP-sensitiven HCN Kanäle, wie auch die cGMP-sensitiven CNG Kanäle an dieser Stelle ein Threonin besitzen, scheidet diese Möglichkeit für diese beiden Kanalfamilien aus. In CNG Kanälen wird dieser Threonin Rest inzwischen eher als bedeutend für die initiale Ligandenbindung und weniger für die Selektivität angesehen (Alterhofen et al. 1991). Zur Lage dieser Aminosäuren siehe Abb. 3.3-3.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|---|---|---|---|----|----|----|----|----|---|---|----------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| mHCN1 | L | L | T | K | -- | -- | -- | -- | -- | G | R | R | T | A | S | V | R | A | D | T | Y | C | |
| mHCN2 | L | L | T | R | -- | -- | -- | -- | -- | G | R | R | T | A | S | V | R | A | D | T | Y | C | |
| mHCN3 | L | L | T | R | -- | -- | -- | -- | -- | G | R | R | T | A | S | V | R | A | D | T | Y | C | |
| hHCN4 | L | L | T | R | -- | -- | -- | -- | -- | G | R | R | T | A | S | V | R | A | D | T | Y | C | |
| SpHCN | L | L | T | R | -- | -- | -- | -- | -- | E | R | R | V | A | S | V | K | C | E | T | Y | C | |
| CNGA3 | I | L | N | I | K | G | S | K | S | G | N | R | R | T | A | N | I | R | S | I | G | Y | S |
| PKA | L | L | M | N | -- | -- | -- | -- | -- | R | P | R | A | A | T | V | V | A | R | G | P | L | |
| CAP | L | F | E | E | G | -- | -- | -- | -- | Q | E | R | S | A | W | V | R | A | K | T | A | C | |

β_7 -Faltblatt

Abb. 3.3-1 Sequenzvergleich von HCN Kanälen mit CNGA3, PKA und CAP

Dargestellt ist ein Vergleich der Sequenzen von mHCN1-3, hHCN4, SpHCN (HCN Kanal aus Seeigelsperma), CNGA3, PKA (Proteinkinase A) und CAP (catabolite activator protein aus E.coli) im Bereich um das β_7 -Faltblatt der CNBD. Die Lage des β_7 -Faltblatts wurde aus den Kristallstrukturanalysen des CAP abgeleitet (Weber und Steitz 1987). Fett gedruckt ist der konservierte Argininrest R (mHCN2: Position 591), der im Rahmen dieser Arbeit mutiert wurde.

3.3.1.1 Konstruktion von Punktmutanten des mHCN2 Kanals

Zur Lokalisierung und zur Charakterisierung der cAMP-Abhängigkeit wurden ausgehend von mHCN2/pcDNA3 Punktmutanten konstruiert, um den beschriebenen Arginin-Rest an Position 591 bzw. den Threonin-Rest an Position 592 auszutauschen (Abb. 3.3-2 und Abb. 3.3-3). Dabei kam es zu folgenden Aminosäureverschiebungen:

- Mutante 1: R591 → E591 (nt CGT → GAG)
- Mutante 2: R591 → D591 (nt CGT → GAC)
- Mutante 3: R591 T592 → E591 A592 (nt CGTACG → GAAGCG)

Zum Ersatz des basischen Arginins wurden bewusst saure Aminosäuren gewählt, um einen grösstmöglichen Effekt zu erzielen.

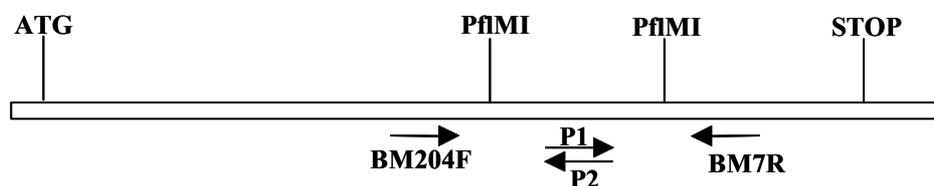


Abb. 3.3-2 Konstruktion der Mutanten 1-3 des mHCN2/pcDNA3

Durch überlappende PCR wurden mittels der Primer P1 und P2 zwischen den beiden PflMI-Erkennungsstellen die Mutationen eingeführt. Mutanten 1 und 2: P1= BM2F, P2= BM1R (degenerierte Primer); Mutante 3: P1= BM4F, P2= BM3R. Die PCR-Fragmente wurden mit PflMI geschnitten und in den mit PflMI geschnittenen und dephosphorylierten mHCN2/pcDNA3 ligiert.

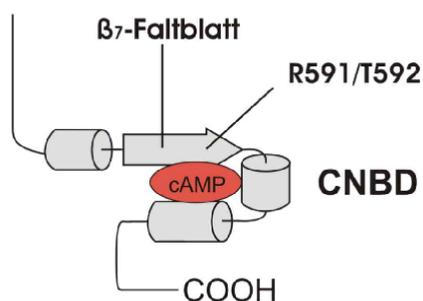


Abb. 3.3-3 Lage der mutierten Positionen bei den Mutanten 1-3

Schematische Abbildung der CNBD und des absoluten C-Terminus des mHCN2 Kanals. R591/T592 befinden sich im β_7 -Faltblatt der CNBD.

3.3.1.2 Elektrophysiologische Charakterisierung der Mutanten 1-3

Der Wildtyp mHCN2 Kanal und die Mutanten 1-3 wurden im Ganzzellmodus mit und ohne cAMP gemessen. Es wurde jeweils die halbmaximale Aktivierung ermittelt (Tab. 5). Es zeigte sich, dass bei den Mutanten 1-3 die für den Wildtyp charakteristische Verschiebung

der Aktivierungskurve in Gegenwart von cAMP zu positiveren Potentialen nicht mehr erreicht wird (Abb. 3.3-4).

Tab. 5 halbmaximale Aktivierung ($V_{0,5}$) von mHCN2 und den Mutanten 1-3

| | ohne cAMP | | mit cAMP | | $\Delta V_{0,5}$ (mV) | P ($\Delta V_{0,5}$) |
|----------------------|-----------------|----|-----------------|----|-----------------------|------------------------|
| | $V_{0,5}$ (mV) | n | $V_{0,5}$ (mV) | n | | |
| Wildtyp mHCN2 | $-89,7 \pm 0,8$ | 19 | $-71,1 \pm 0,9$ | 8 | 18,6 | $\leq 0,05$ |
| Mutante 1 | $-90,9 \pm 1$ | 6 | $-92,0 \pm 0,9$ | 10 | -1,1 | $> 0,05$ |
| Mutante 2 | keine Daten | | $-92,1 \pm 1,1$ | 11 | keine Daten | |
| Mutante 3 | $-88,4 \pm 1,0$ | 3 | $-93,1 \pm 1,3$ | 11 | -4,7 | $> 0,05$ |

Aufgeführt sind die Werte für die halbmaximalen Aktivierungen von Wildtyp mHCN2 und den Mutanten 1-3 nach Messung ohne bzw. mit cAMP. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. $\Delta V_{0,5}$ gibt die Differenz der $V_{0,5}$ Werte zwischen den Messungen mit bzw. ohne cAMP an. Bei $P (\Delta V_{0,5}) \leq 0,05$ wurde die Differenz als statistisch signifikant angenommen. n gibt die jeweilige Anzahl der gemessenen Zellen an.

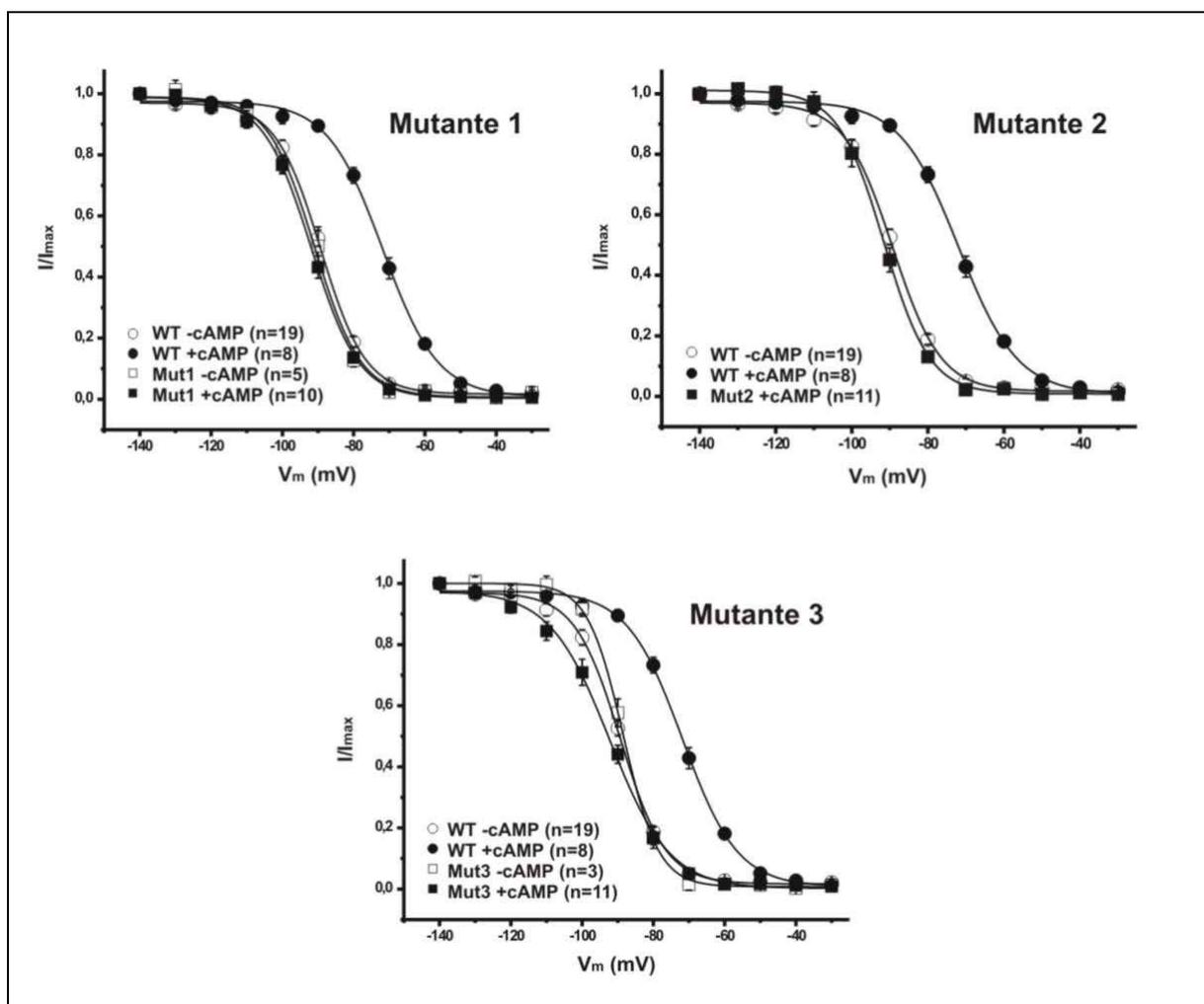


Abb. 3.3-4 Aktivierungskurven der Mutanten 1-3 mit und ohne cAMP

Im Ganzzellmodus wurde I_h unter Kontrollbedingungen (ohne cAMP) und in Gegenwart von 1mM cAMP an transient mit mHCN2/pcDNA3 bzw. den Mutanten 1-3 transfizierten HEK Zellen gemessen. Die Aktivierungskurven wurden mit Hilfe der normalisierten Leitfähigkeiten ermittelt. I : Strom, I_{max} : maximaler Strom, V_m : Membranspannung. Mut1: Mutante 1, Mut2: Mutante 2, Mut3: Mutante 3.

3.3.2 Aktivierungskinetik und Spannungsabhängigkeit

Die HCN Kanäle unterscheiden sich hauptsächlich in Bezug auf ihre Spannungsabhängigkeit und ihre Aktivierungskinetik. So liegt die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte halbmaximale Aktivierung $V_{0,5}$ des mHCN2 Kanals bei ca. -91mV , die des mHCN1 Kanals bei ca. -81mV . Die Zeitkonstante der Aktivierung für den mHCN2 Kanal beträgt ca. 250ms, die des mHCN1 Kanals ca. 40ms. Um die dafür verantwortlichen Bereiche in den HCN Genen zu identifizieren, wurden verkürzte mHCN2 Kanäle und Chimären aus mHCN1 und mHCN2 konstruiert (3.3.2.1).

3.3.2.1 Konstruktion von verkürzten mHCN2 Kanälen und chimären Kanälen aus mHCN1 und mHCN2

Die Mutanten 5-7 stellen Minimalkanäle des mHCN2 ohne C-Terminus (Mutante 5), ohne N- und C-Terminus (Mutante 6) bzw. ohne N-Terminus (Mutante 7) dar (Abb. 3.3-7). Die Konstruktion ist in Abb. 3.3-5 dargestellt.

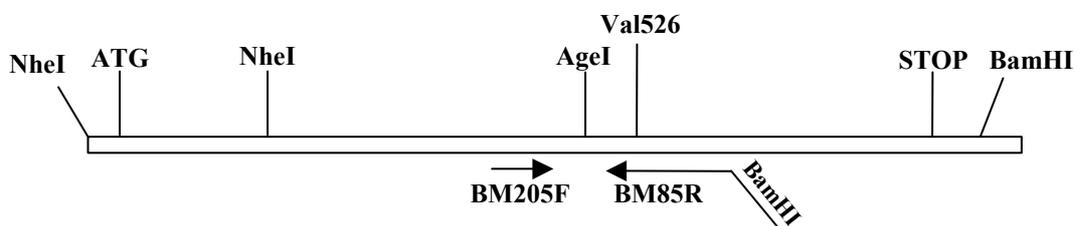


Abb. 3.3-5 Konstruktion der Mutanten 5-7

Mutante 5 : Mit BM205F und BM85R (mit nicht bindendem BamHI-Überhang) wurde ein PCR-Fragment amplifiziert, mit AgeI und BamHI geschnitten und in den mit AgeI und BamHI geschnittenen und dephosphorylierten mHCN2/pIRES-EGFP ligiert. BM85R trägt unmittelbar nach der Aminosäure Valin 526 ein STOP Kodon.

Mutante 6: Mit den Primern BM89F und BM84R wurde ein Linker mit NheI-Überhängen konstruiert (2.5) und in die mit NheI geschnittene und dephosphorylierte Mutante 5 ligiert.

Mutante 7: die Konstruktion erfolgte wie bei Mutante 6, nur mit mHCN2/pIRES-EGFP als Ausgangsplasmid.

Die Mutanten 8-12 sind Chimären aus mHCN1 und mHCN2 (Abb. 3.3-7). Da sich die Sequenzen an den Übergängen nicht genau entsprechen, wurden Primer benutzt, die die Erkennungssequenzen für NheI und PflMI enthielten. PflMI kommt bei beiden Kanälen genau am Ende von S6 vor, jedoch sind die Überhänge nicht kompatibel, da das Enzym in mHCN1

und mHCN2 unterschiedliche Sequenzen erkennt. Die Konstruktion der Mutanten 8-12 ist in Abb. 3.3-6 dargestellt.

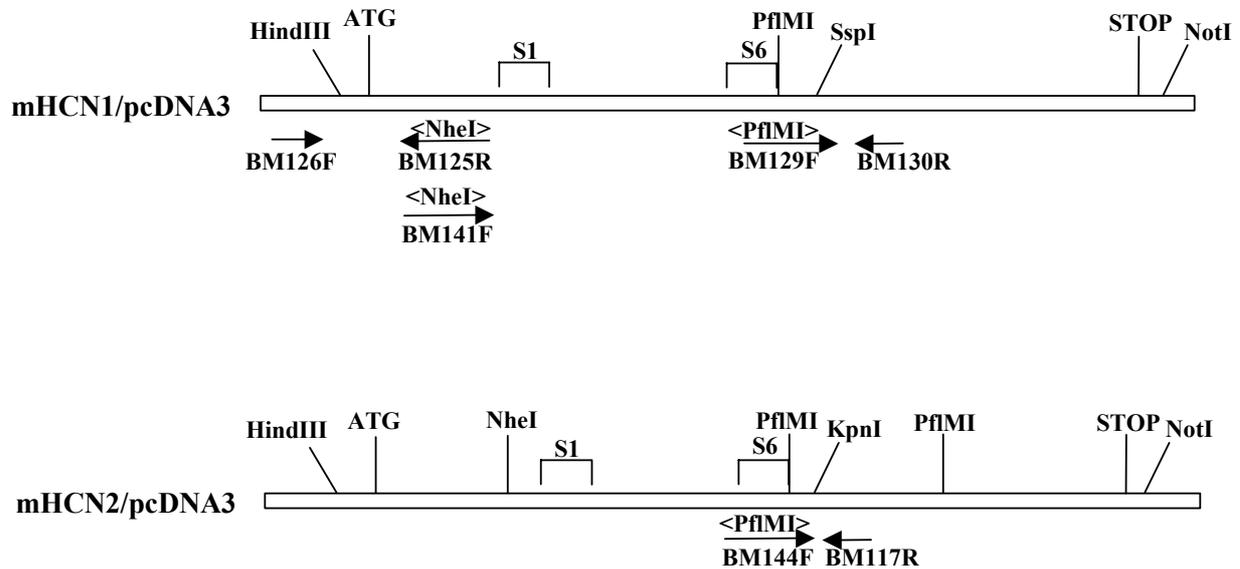


Abb. 3.3-6 Konstruktion der Mutanten 8-12

Mutante 8: Durch PCR wurde ausgehend von mHCN1/pcDNA3 ein Stück zwischen BM126F und BM125R amplifiziert und mit HindIII und NheI geschnitten. BM125R trägt die Erkennungssequenz für NheI. Das Stück wurde in mit HindIII und NheI geschnittenen und dephosphorylierten mHCN2/pcDNA3 ligiert.

Mutante 9: Zwischen BM129F und BM130R wurde ausgehend von mHCN1/pcDNA3 ein PCR-Stück amplifiziert und mit PflMI und SspI geschnitten. BM129F trägt die Erkennungssequenz für PflMI, wie sie in mHCN2 vorliegt. Aus mHCN1/pcDNA3 wurde durch Verdau ein Stück zwischen SspI und NotI gewonnen. Beide Stücke wurden in mit PflMI und NotI geschnittenen und dephosphorylierten mHCN2/pcDNA3 ligiert.

Mutante 10: Mit BM141F und BM130R wurde ausgehend von mHCN1/pcDNA3 ein PCR-Stück amplifiziert und mit NheI und PflMI verdaut. BM141R trägt eine NheI-Erkennungssequenz. Ein zweites Fragment wurde durch mHCN2/pcDNA3 Verdau mit HindIII und NheI gewonnen. Beide Teile wurden in mit HindIII und PflMI geschnittenen und dephosphorylierten mHCN1/pcDNA3 ligiert.

Mutante 11: Per PCR wurde von mHCN2/pcDNA3 mit BM144F und BM117R ein Stück amplifiziert und mit PflMI und KpnI geschnitten. BM144F trägt die PflMI-Erkennungssequenz aus mHCN1. Aus mHCN2/pcDNA3 wurde ein zweites Stück durch Verdau mit KpnI und NotI gewonnen. Beide Fragmente wurden in mit PflMI und NotI geschnittenen mHCN1/pcDNA3 ligiert.

Mutante 12: Aus Mutante 8 wurde ein Fragment durch Verdau mit Hind III und NheI und aus mHCN2/pcDNA3 ein zweites durch Schneiden mit NheI und PflMI präpariert. Beide Stücke wurden in mit HindIII und PflMI geschnittene Mutante 9 ligiert.

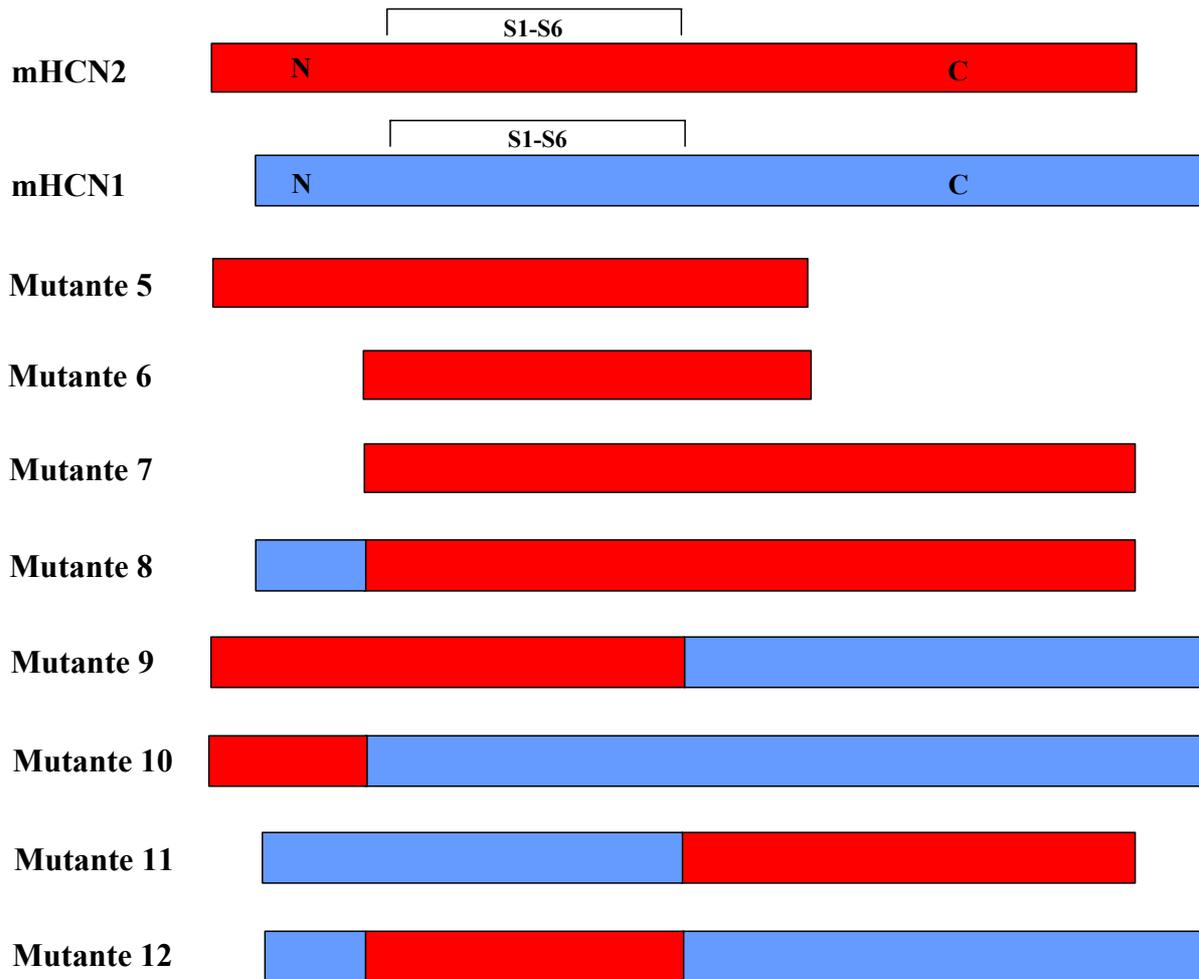


Abb. 3.3-7 Struktur der Mutanten 5-12

Gezeigt ist schematisch die Struktur der Mutanten 5-12. Rote Bereiche stellen cDNA Sequenzen aus mHCN2 dar, blaue Bereiche stammen ursprünglich aus mHCN1. S1-S6: transmembranäre Segmente einschliesslich der Pore. N: N-Terminus, C: C-Terminus.

3.3.2.2 Elektrophysiologische Charakterisierung der Mutanten 5-12

Die Eigenschaften der Mutanten 5-12 wurden nach transienter Transfektion der cDNAs in HEK Zellen im Ganzzellmodus bestimmt. Tab. 6 gibt eine Übersicht über die ermittelten Werte für die halbmaximalen Aktivierungen und die Zeitkonstanten.

Tab. 6 Halbmaximale Aktivierungen $V_{0,5}$ und Zeitkonstanten τ_{akt} der Mutanten 5-12

| | $V_{0,5}$ (mV) | n | τ_{akt} (ms) | n |
|-------------------|------------------|----|-------------------|----|
| mHCN1 | -81,2 | 7 | 36,8±4,5 | 8 |
| mHCN2 | -90,9 | 7 | 269±46 | 8 |
| Mutante 5 | keine Expression | | keine Expression | |
| Mutante 6 | keine Expression | | keine Expression | |
| Mutante 7 | -93,1 | 7 | 334±20 | 7 |
| Mutante 8 | -94,2 | 9 | 247±13 | 10 |
| Mutante 9 | -79,7 | 10 | 131±10 | 9 |
| Mutante 10 | -69,3 | 7 | 53,2±9,3 | 6 |
| Mutante 11 | -83,7 | 10 | 81,5±6,1 | 15 |
| Mutante 12 | -80,7 | 10 | 272±29 | 9 |

Nach Transfektion von Mutante 5 und Mutante 6 konnte nach hyperpolarisierenden Pulsen kein Einwärtsstrom gemessen werden, was darauf schliessen lässt, dass keine Expression stattfand. Die übrigen Mutanten exprimierten gut und es konnten die in Tab. 6 aufgeführten Werte für die halbmaximale Aktivierung und die Zeitkonstanten ermittelt werden.

Durch Vergleich der Werte mit der Struktur der Mutanten (Abb. 3.3-7) konnte der für die Aktivierungskinetik verantwortliche Bereich auf die Kernregion zwischen S1 und S6 der Kanäle eingengt werden. Die Mutanten 7, 8 und 12 verhalten sich in Bezug auf die Geschwindigkeit der Kanalöffnung fast wie Wildtyp mHCN2, wogegen Mutante 10 und Mutante 11, die in diesem Bereich mHCN1 Sequenzen tragen, sehr schnell aktivieren. Mutante 9 aktiviert mit einer Zeitkonstante, die intermediär zwischen mHCN1 und mHCN2 liegt.

Für die Spannungsabhängigkeit der Kanäle scheint dagegen der C-Terminus der Proteine verantwortlich zu sein. Die Mutanten 7, 8 und 11, die hier aus mHCN2 Sequenzen bestehen, aktivieren bei negativeren Potentialen als die Mutanten 9, 10 und 12, deren C-Terminus dem mHCN1 entspricht.

3.4 Genomische Analyse des hHCN2 und des hHCN4

3.4.1 Cayman Ataxie

3.4.1.1 Hintergrund

Die autosomal rezessive zerebellare Cayman Ataxie ist charakterisiert durch psychomotorische Retardierung und auffallende Dysfunktionen im Bereich des Kleinhirns wie z.B. Tremor und ataktischen Gang (Johnson et al. 1978) und kommt unter isolierten Bevölkerungsgruppen auf Grand Cayman Island vor. Durch „linkage“-Analyse wurde der mögliche Genlocus der Erkrankung auf Chromosom 19p13.3 gefunden (Nystuen et al. 1996), wo auch das humane HCN2 Gen lokalisiert ist. Der Phänotyp der Betroffenen zeigt einige Parallelen zu dem von HCN2-Knockout Mäusen (Ludwig et al. 2003), v.a. in Hinblick auf die Ataxie. Diese beiden Tatsachen legten die Vermutung nahe, dass ein Defekt im HCN2 Gen ursächlich für die Krankheit sein könnte.

3.4.1.2 Sequenzierung der Exons 1-8 von hHCN2

Ausgehend von genomischen DNA-Proben zweier Patienten (zur Verfügung gestellt von Dr. P. Benke, Miami), sollten die 8 Exons des humanen HCN2 Gens (hHCN2, AC005559, Lamerdin et al. 1998, Ludwig et al. 1999) auf eventuelle Mutationen hin untersucht werden. Abb. 3.4-1 zeigt die Exon-Intron Struktur des hHCN2.

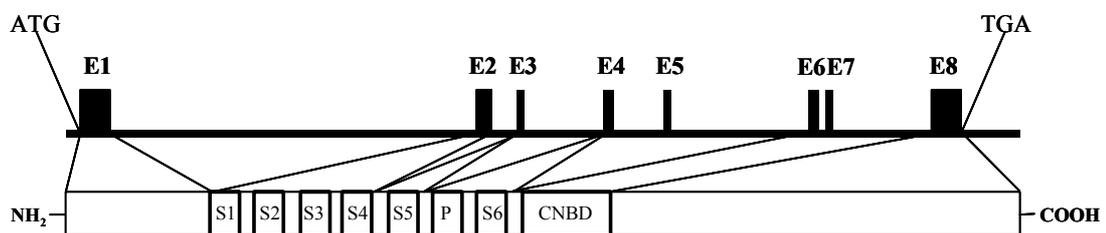


Abb. 3.4-1: Exon-Intron Struktur des hHCN2

Gezeigt sind schematisch die Segmente S1-S6, die Pore und die CNBD und die Bereiche auf dem Gen, die die Proteinabschnitte kodieren (Exons 1-8; E1-E8). Die Bereiche zwischen den Exons (Introns) sind als schwarze Striche dargestellt. ATG: Transkriptionsstart; TGA: STOP-Kodon.

Um die einzelnen Exons sequenzieren zu können, wurden zunächst für jedes Exon Primerpaare konstruiert, die eine PCR-Amplifikation mit Ausnahme der Exon-Intron-Übergänge erlauben sollten (Abb. 3.4-3). Die *Taq*-Polymerase konnte die gewünschten Bereiche gut amplifizieren, die Fragmente wurden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, elektroeluiert und präzipitiert. Die Sequenzierung der Fragmente ergab zunächst diverse Punktmutationen und Deletionen in den Exons 6 und 7. Bei dem Versuch, genomische Bereiche zu amplifizieren, die sich über mehrere Exons und Introns erstreckten, erschienen auf den analytischen Gelen mit Ausnahme einer PCR von Exon3 bis Exon4 immer Banden mit Längen der entsprechenden cDNA hHCN2. Es schien, als würde genomische

DNA erfasst, deren Introns deletiert wurden. Durch Sequenzierung dieser Produkte bestätigte sich diese Vermutung. Es handelte sich hier um eine korrekt gespleisste, jedoch an verschiedenen Stellen mutierte cDNA von hHCN2. Eine BLAST Recherche mit den gefundenen „mutierten“ Bereichen aus Exon 6 führte zu einem „working draft“ Klon mit der Bezeichnung RP11-215H14 auf Chromosom1 (Birren et al., 2000). Das Resultat bei Eingabe der vergebenen Zugangsnummer AC026830 bei NCBI ergab allerdings eine Sequenz auf Chromosom 15 (NT_022021), die durch Vergleich mit hHCN2 cDNA (Ludwig et al. 1999) eine Homologie von 91% hervorbrachte (Abb. 3.4-2). Es handelt sich hier vermutlich um ein Pseudogen des hHCN2, das durch reverse Transkription von mRNA des hHCN2 entstanden ist und als cDNA wieder ins Genom integriert wurde. Dem Pseudogen lässt sich kein eindeutiger Transkriptionsstart zuordnen und es fehlt ihm im Vergleich zu hHCN2 die 5'-"untranslated" Region und somit auch der entsprechende Promoter. Pseudogene sind v.a. unter Säugetieren weit verbreitet, so z.B. unter Globin-Genen (Leder et al. 1980), und da sie funktionslos bleiben, können sie aufgrund des fehlenden Selektionsdrucks im Laufe der Zeit mutieren.

| | | |
|-----------------|--|------|
| hHCN2 | GGCCGGCGGGCGGGCGGGCGGCTCCGCTCCGCACTGCCCGGGCGCCGCTCGCC ATGG GACG | 60 |
| Pseudogen_hHCN2 | --gtcat-tactta-ga--a----aaa-atat-t-t-t.--ttg-gag-t-tca---g- | 59 |
| hHCN2 | CGCGCGGGGGCGGGCGGGCGCCGGGGAGAGCCCGGGCGGACCCCGCGCCGGGGCCGC | 120 |
| Pseudogen_hHCN2 | -ttca--ca-at-tct-g--taac--ccat-taaa-a-tt--a-tggt--g---ct---- | 119 |
| hHCN2 | CGCCGCGCCGCGCCGCGCCGCGCCCCCAACAGCAGCCGCGCCGCGCCGCGCCGCGC | 180 |
| Pseudogen_hHCN2 | tc-gca-tg-cgg--g-cgc-t-g--atgg-cgc--gcgg-ggcggcgg--g-n--g-g | 179 |
| hHCN2 | CCCCCGGGCCCCGGGGCCCGCCCCCAGCACCCGCCCCGGGCCGAGGCGTTGCCCC | 240 |
| Pseudogen_hHCN2 | agag---c-c-a---tcg-tc-c----aa-----g----- | 239 |
| hHCN2 | CGGAGGCGGCGGATGAGGGCGGCCCGCGGGCCGGCTCCGCAGCCGCGACAGCTCGTGCG | 300 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----g-----a--g-----a----- | 299 |
| hHCN2 | GCCGCCCCGGCACCCCGGGCGGGCGAGCACGGCCAAGGGCAGCCCGAACGG .CGAGTGC | 359 |
| Pseudogen_hHCN2 | --a-----t-----a-----g-----c----- | 359 |
| hHCN2 | GGGCGCGGGCAGCCGAGTGCAGCCCCGCGGGGCCCGAGGGCCCGGGCGGGGGCCCAAG | 419 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----t----- | 419 |
| hHCN2 | GTGTCTGTTCTCGTGCCGCGGGCGGCCTCGGGCCCCGGCCGGGGCCGGGGCCG | 473 |
| Pseudogen_hHCN2 | ----a----t-----c-----gcccggg----- | 479 |
| hHCN2 | GCGGAGGAGGCGGGCAGCGAGGAGGCGGGCCCGCGGGGGAGCCGCGCGGCAGCCA .GGC | 532 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----c-----t--- .-----c-----c-----ttg--- | 538 |
| hHCN2 | CAGCTTCATGCAGCGCCAGTTCGGCGCGCTCCTGCAGCCGGGCGTCAACAAGTTCGCT | 592 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----c-----t----- | 598 |
| hHCN2 | GCGGATGTTTCGCGAGCCAGAAGCCGTGGAGCGGAGCAGGAGCGGTCAAGTCGGCGGG | 652 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----c-----a----- | 658 |
| hHCN2 | GGCCTGGATCATCCACCCGTACAGCGACTTCAGGTTCTACTGGGACTTCACCATGCTGCT | 712 |
| Pseudogen_hHCN2 | -t----- | 718 |
| hHCN2 | GTTTCATGGTGGGAAACCTCATCATCATCCCAGTGGGCATCACCTTCTTCAAGGATGAGAC | 772 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----c----- | 778 |
| hHCN2 | CACTGCCCCGTGGATCGTGTTCAACGTGGTCTCGGACACCTTCTTCTCATGGACCTGGT | 832 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----t-----g----- | 838 |
| hHCN2 | GTTGAACTTCCGCACCGGCATTGTGATCGAGACAACACGGAGATCATCCTGGACCCCGA | 892 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----aa-- | 898 |
| hHCN2 | GAAGATCAAGAAGAAGTATCTGCGCACGTGGTTCGTGGTGGACTTCGTGTCTCCATCCC | 952 |
| Pseudogen_hHCN2 | ----- . . .-----cg-----a----- | 955 |
| hHCN2 | CGTGGACTACATCTTCTTATTGTGGAGAAGGGCATTGACTCCGAGGTCTACAAGACGGC | 1012 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----c--c-----c----- | 1015 |
| hHCN2 | ACGCGCCCTGCGCATCGTGCGCTTACCAAGATCCTCAGCCTCCTGCGGCTGCTGCGCCT | 1072 |
| Pseudogen_hHCN2 | gt-----g----- | 1075 |
| hHCN2 | CTCACGCCTGATCCGCTACATCCATCAGTGGGAGGAGATCTTCCACATGACCTATGACCT | 1132 |
| Pseudogen_hHCN2 | ---g-----c----- | 1135 |

| | | |
|-----------------|---|------|
| hHCN2 | GGCCAGCGCGGTGATGAGGATCTGCAATCTCATCAGCATGATGCTGCTGCTCTGCCACTG | 1192 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----c--t-----c-----t----- | 1195 |
| hHCN2 | GGACGGCTGCCTGCAGTTCCTGGTGCCTATGCTGCAGGACTTCCCGCGCAACTGCTGGGT | 1252 |
| Pseudogen_hHCN2 | ---t-----g-c-----t----- | 1255 |
| hHCN2 | GTCCATCAATGGCATGGTGAACCACTCGTGGAGTGAAGTGTACTCCTTCGCACCTTCAA | 1312 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----g-----c-----t----- | 1315 |
| hHCN2 | GGCCATGAGCCACATGCTGTGCATCGGGTACGGCCGGCAGGCCCGAGAGCATGACGGA | 1372 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----t-----t----- | 1375 |
| hHCN2 | CATCTGGCTGACCATGCTCAGCATGATTGTGGGTGCCACCTGCTACGCCATGTTTCATCGG | 1432 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----a--a----- | 1435 |
| hHCN2 | CCACGCCACTGCCCTCATCCAGTCGCTGGACTCCTCGCGGCCAGTACCAGGAGAAGTA | 1492 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----a----- . . .----- | 1492 |
| hHCN2 | CAAGCAGGTGGAGCAGTACATGTCTTCCACAAGCTGCCAGCTGACTTCCGCCAGAAGAT | 1552 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----g--c----- | 1552 |
| hHCN2 | CCACGACTACTATGAGCACCGTTACCAGGGCAAGATGTTTGACGAGGACAGCATCCTGGG | 1612 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----c-----c----- | 1612 |
| hHCN2 | CGAGCTCAACGGGCCCCCTGCGGGAGGAGATCGTCAACTTCAACTGCCGGAAGCTGGTGGC | 1672 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----t-----a- | 1672 |
| hHCN2 | CTCCATGCCGCTGTTTCGCCAACGCCGACCCCAACTTCGTCACGGCCATGCTGACCAAGCT | 1732 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----t--t----- | 1732 |
| hHCN2 | CAAGTTCGAGGTCTTCCAGCCGGGTGACTACATCATCCGCGAAGGCACCATCGGGAAGAA | 1792 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----c----- . . .---- | 1789 |
| hHCN2 | GATGTACTTCATCCAGCACGGCGTGGTCAGCGTGTCTACTAAGGGCAACAAGGAGATGAA | 1852 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----t-----g----- | 1849 |
| hHCN2 | GCTGTCCGATGGCTCCTACTTCGGGGAGATCTGCCTGCTCACC CGGGGCCGCCGACGGC | 1912 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----t-----a-----a-----t--- | 1909 |
| hHCN2 | GAGCGTGGCGGGCCGACCTACTGCCGCCTCTATTTCGCTGAGCGTGGACAACCTCAACGA | 1972 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----a-----t-----ct----- | 1969 |
| hHCN2 | GGTGCTGGAGGAGTACCCCATGATGCGGCGCGCCTTCGAGACGGTGGCCATCGACCGCCT | 2032 |
| Pseudogen_hHCN2 | ----- | 2029 |
| hHCN2 | GGACCGCATCGGCAAGAAGAATTCCATCCTCTGCACAAGGTGCAGCATGACCTCAACTC | 2092 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----t----- | 2089 |
| hHCN2 | GGGCGTATTCAACAACCAGGAGAACGCCATCATCCAGGAGATCGTCAAGTACGACCGCGA | 2152 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----t-----g----- | 2149 |
| hHCN2 | GATGGTGCAGCAGGCCGAGCTGGGTGAGCGCTGGGCCTCTTCCCGCCGCCGCCGCCGCC | 2212 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----c----- . . .----- | 2206 |
| hHCN2 | GCCCGAGGTACCTCGGCCATCGCCACGCTGCAGCAGGCCGGCGGCCATGAGCTTCTGCC | 2272 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----c-t--t----- | 2266 |
| hHCN2 | GCAGGTGGCGCGGCCGCTCGTGGGGCCGCTGGCGCTCGGCTCGCCGCGCCTCGTGCGCCG | 2332 |
| Pseudogen_hHCN2 | ----- | 2326 |
| hHCN2 | CCCGCCCCGGGGCCCGCACCTGCCGCCGCTCACCCGGGCCCGCCCCCGCCAGCCC | 2392 |
| Pseudogen_hHCN2 | ----- | 2386 |
| hHCN2 | CCCGGGCGCGCCCGCCAGCCCCGGGCACCGCGGACCTCGCCCTACGGCGGCTGCCCGC | 2452 |
| Pseudogen_hHCN2 | --t-----a--t----- | 2446 |
| hHCN2 | CGCCCCCTTGCTGGGCCCGCCTGCCCGCGCGCCGCTGAGCCGCGGCTCGCGCCACT | 2512 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----a-----t-----t----- | 2506 |
| hHCN2 | GTCCGCCTCGCAGCCCTCGTGCCTCACGGCGCCCCGGCCCCGGCCTCCACACGCC | 2572 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----c-----aa-g---t---a----- | 2566 |
| hHCN2 | GGCCAGCAGTCCACACCGCGTTGAGGCCACGCCCGCTGCCCGGGCCGCCGCCCG | 2632 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----ttc--g-a----- | 2626 |
| hHCN2 | CCCGGACCGCAGGGACTCGGCCTACCCGGCGCCGCCGGCGGCTGGACCCCCAGGACTC | 2692 |
| Pseudogen_hHCN2 | -----t-----c-----a----- | 2686 |
| hHCN2 | CGCGCGCTCGCGCCTCTCGTCCAACCTG TGA | |
| Pseudogen_hHCN2 | ----- | |

Abb. 3.4-2 Sequenzvergleich der hHCN2 cDNA und des Pseudogens auf Chromosom 15

Die gestrichelten Stellen in der Sequenz des Pseudogens kennzeichnen Basen, die mit der cDNA hHCN2 identisch sind. Kleine Buchstaben kennzeichnen unterschiedliche Basen. Punkte geben Deletionen im Vergleich zum anderen Gen an.

Um die Exons des hHCN2 amplifizieren zu können, wurden neue Primerpaare gesucht, die ausschliesslich in Intronbereichen liegen, um so die Amplifizierung des Pseudogens zu vermeiden, dem die Introns fehlen und folglich der Primer nicht binden kann (Abb. 3.4-3).

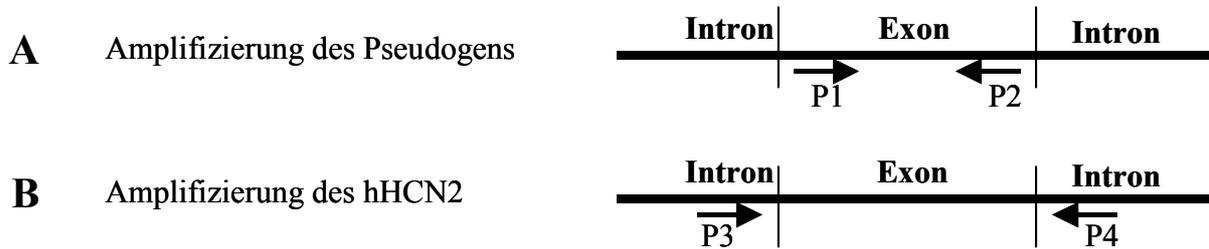


Abb. 3.4-3 Primerauswahl zur Amplifizierung der Exons des hHCN2.

A: Durch Wahl von Primerpaaren P1/P2, die in Exonbereichen liegen, wurde vorrangig das Pseudogen des hHCN2 amplifiziert. Verwendet wurden für die Exons 1-8 die Primer BM53R bis BM71R. B: Durch Wahl von Oligonukleotiden P3/P4 innerhalb der Introns kurz vor den Exon- Intron-Grenzen wurde hHCN2 amplifiziert. Die benutzten Primer und die entstandenen PCR-Fragmente waren: Exon1: BM96F/BM95R (999bp), Exon2: BM90F/BM91R (620bp), Exon3: BM94F/BM138R (418bp), Exon4: BM139F/BM110R (392bp), Exon5: BM72F/BM73R (374bp), Exon6: BM86F/BM87R (274bp), Exon7: BM78F/BM81R (383bp), Exon8: BM97F/BM98R (938bp).

Mit dieser zweiten Strategie konnten alle Exons des hHCN2 durch PCR amplifiziert werden. Aufgrund des hohen GC-Gehalts von Exon 1 und Exon 8 wurden diese in pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert und davon ausgehend sequenziert. Dabei konnten bei keinem der beiden untersuchten Patienten Anomalien in der hHCN2-Sequenz festgestellt werden.

3.4.1.3 Untersuchung der Introns von hHCN2

Auch fehlerhafte Introns können zu einer gestörten Genexpression führen. So wurden z.B. Fälle beschrieben, in denen Deletionen in diesen Bereichen zur Überexpression eines Gens und so zur Manifestation einer Krankheit geführt haben (Wilson et al. 2001). Aus diesem Grund sollte die Organisation des 13kb grossen und längsten der Introns (Intron 1-2 zwischen Exon 1 und 2) des hHCN2 durch Southern Blot Analyse näher betrachtet werden, da hier die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Anomalie am grössten ist. Hierfür wurde genomische DNA eines Cayman-Ataxie-Patienten und zum Vergleich Kontroll-DNA eines gesunden Probanden mit mehreren Enzymen verdaut. Als Gensonde wurde per PCR ein Stück aus dem Exon1 amplifiziert (Primer BM54F und BM101R), um Kreuzreaktionen mit anderen HCN Kanälen zu vermeiden, da die Homologie zwischen den verschiedenen Genen im Bereich des ersten Exons am geringsten ist. Abb.3.1.4 zeigt das erhaltene Bandenmuster.

3.4.2.2 Sequenzierung der Exons 1-8 des hHCN2

Wie in 3.4.1.2 beschrieben wurden die 8 Exons des hHCN2 zweier Patienten aus 2 Familien per PCR mit intronständigen Primern amplifiziert und sequenziert, um eine Erfassung des Pseudogens des hHCN2 auszuschliessen (3.4.1.2). Das untersuchte Mitglied der Familie 1 wies dabei keine Mutationen auf. Ein zweiter Patient aus Familie 2 besitzt eine Mutation im Exon1 (nt280), was zu einer Aminosäureverschiebung von Arginin zu Histidin führt (Abb. 3.4-5). Die genomische DNA dessen Bruders, der auch erkrankt ist, zeigte diese Verschiebung nicht (Abb. 3.4-5).

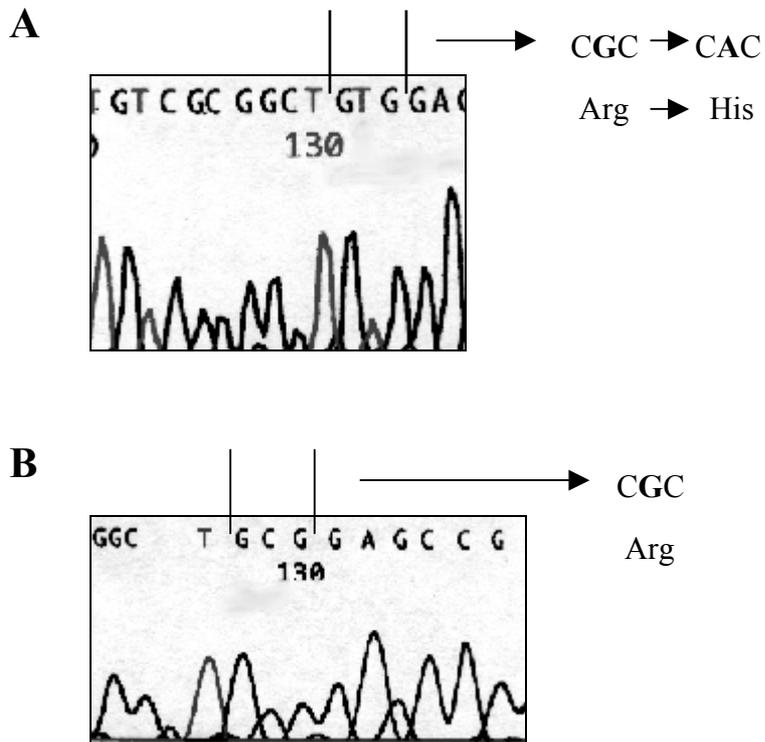


Abb. 3.4-5 Sequenzausschnitte des HCN2 zweier Sick Sinus Syndrom Patienten.

Die Positionen im Exon 1 wurden mit dem Primer BM100R (Rückwärtsprimer) sequenziert. Patient A zeigt an der Stelle nt280 einen Basenaustausch G→A, wodurch sich die Aminosäuresequenz von Arginin zu Histidin ändert. Patient B (Bruder von Patient A) zeigt diese Mutation nicht, hier ist das Triplet CGC (Arg) erhalten.

3.4.2.3 Sequenzierung der Exons 1-8 des hHCN4

Die folgenden Untersuchungen wurden von Herrn PD. Dr. Andreas Ludwig durchgeführt. Der HCN4 Kanal stellt die am höchsten exprimierte HCN Isoform im Sinusknoten dar. Aus diesem Grund sollte auch dieses Gen bei dem geschilderten Patientenkollektiv sequenziert werden. Die PCR-Amplifikation erfolgte wie bei hHCN2 mit intronspezifischen Primern. Bei Familie 2 konnten keine Unregelmässigkeiten in der hHCN4 Sequenz festgestellt werden. Ein Mitglied der Familie 1 zeigte nach Sequenzierung einen Polymorphismus G/A im Exon 1 an Position nt107, wobei G der veröffentlichten Sequenz entspricht (Abb. 3.4-6). Es kommt

dadurch beim Patienten zu einer Verschiebung der Aminosäuresequenz von Glycin zu Glutaminsäure (GGG→GAG).

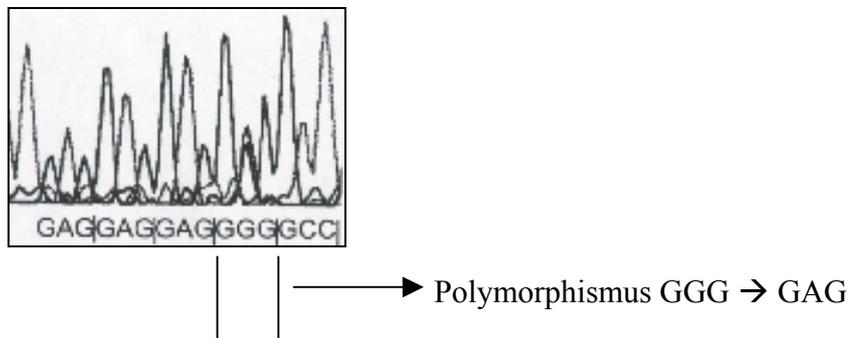


Abb. 3.4-6 Sequenzausschnitt des HCN4 eines Sick Sinus Syndrom Patienten.

Gezeigt ist ein Sequenzausschnitt aus Exon 1 des HCN4 Gens eines Mitglieds der Familie 1. Der Patient zeigt an der Stelle nt107 einen Polymorphismus G/A, wodurch in 50% der Fälle Glycin, in 50% Glutaminsäure entsteht.

4 Diskussion

4.1 Heteromerisierung von HCN Kanälen

In dieser Arbeit wurde erstmals systematisch das Heteromerisierungspotential der vier HCN Untereinheiten untersucht. Nach heterologer Expression von Zweierkombinationen der einzelnen Isoformen konnten durch konfokale Mikroskopie Rückschlüsse auf eine Heteromerisierung der HCN Kanäle gezogen werden. Sowohl in HEK Zellen als auch im Mausgehirn wurden diese Erkenntnisse durch Ko-Immunpräzipitationen und in HEK Zellen durch elektrophysiologische Messungen bestätigt.

Alle vier bekannten HCN Isoformen können funktionell als Homomere exprimiert werden (Ludwig et al. 1998, 1999). Dabei zeigen sich in Patch-Clamp-Experimenten die typischen Charakteristika, wie sie auch für den nativen I_h beobachtet werden können (Aktivierung durch Hyperpolarisation, Modulation durch zyklische Nukleotide, Leitung von Kalium- und Natriumionen, Blockade durch extrazelluläre Cäsiumionen). Die *in vivo* ermittelten Daten für I_h in verschiedenen Geweben lassen aber nicht immer die Zuordnung zu einem bestimmten HCN Kanal zu, da sich für die Spannungsabhängigkeit, die Kinetik und das Mass der Modulation durch cAMP Werte ergeben, die sich nicht durch die Kombination mehrerer homomerer Kanäle erklären lassen. Im Herz und im Gehirn überlappen die Expressionsmuster der HCN Kanäle teilweise und so scheint eine mögliche Erklärung für die Vielschichtigkeit des nativen I_h die Ausbildung von Heteromeren zwischen HCN Isoformen zu sein. Ausgehend von der strukturellen Ähnlichkeit zu spannungsabhängigen Kaliumkanälen (Yellen 2002) kann zudem davon ausgegangen werden, dass sich die HCN Kanäle in der Plasmamembran zu Tetrameren zusammenfinden. Neben der Bildung von heteromeren HCN Kanälen könnten die Eigenschaften des nativen I_h zudem durch andere modulatorische Untereinheiten wie das „min-K related protein“ (MiRP1 oder KCNE2; Yu et al. 2001) bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurde die Heteromerenbildung der HCN Kanäle durch Kotransfektion von jeweils zwei HCN Isoformen, die mit dem grün fluoreszierenden EGFP bzw. dem rot fluoreszierenden RFP fusioniert waren, durch konfokale Mikroskopie in HEK Zellen untersucht. Für alle vier HCN Kanäle konnte zunächst gezeigt werden, dass sie sich in der Plasmamembran befinden, was für die Funktion der Ionenkanäle essentiell ist. Elektrophysiologische Studien an heterolog exprimiertem mHCN3 Kanal brachten in der Vergangenheit keine befriedigenden Ergebnisse. Die gemessenen Stromdichten waren immer sehr gering und es wurde spekuliert, dass die Expressionsraten z.B. in HEK Zellen vielleicht ungenügend sind. Durch die hier erlangten Erkenntnisse kann dies aber als Ursache ausgeschlossen werden, da mHCN3 in vergleichbarem Ausmass in der Zellmembran nachzuweisen ist wie mHCN1, mHCN2 und hHCN4.

Die mikroskopischen Studien sprechen dafür, dass die HCN Kanäle als Heteromere in die Zellmembran integriert werden können. mHCN1 lokalisiert nach Ko-Expression sowohl mit mHCN2, mHCN3 als auch mit hHCN4, was durch Überlagerung der konfokalen Bilder von mHCN1-EGFP mit den von der gleichen HEK Zelle aufgenommenen Bildern von mHCN2-RFP, mHCN3-RFP und hHCN4-RFP durch die Gelbfärbung der Plasmamembran deutlich wurde. Auf die gleiche Weise wurde die Kolo-kalisation für mHCN2 und hHCN4 sowie für mHCN3 und hHCN4 gezeigt. Eine Ausnahme ergab sich jedoch bei diesen Lokalisierungsstudien. mHCN2 und mHCN3 werden zwar beide in die Plasmamembran integriert, es tritt allerdings keine Kolo-kalisation auf. Das überlagerte Bild von mHCN2-EGFP und mHCN3-RFP erscheint im Bereich der Plasmamembran diffus und es kommt allenfalls durch zufällige enge Nachbarschaft der beiden Proteine zu einer minimalen, punktuellen Gelbfärbung.

Die Bestätigung der Interaktionen zwischen den HCN Kanälen erfolgte durch Ko-Immunpräzipitationen. Im Mausgehirn lässt sich zeigen, dass mHCN1 und mHCN2 Heteromere bilden können. Die Expressionsmuster der beiden Kanäle überlappen z.B. in den CA1 und CA3 Pyramidenneuronen des Hippocampus. Diese Ergebnisse liefern die Begründung, warum z.B. nach Ko-Injektion von mHCN1 und mHCN2 cRNA in *Xenopus* Oozyten oder Expression eines mHCN1-mHCN2 Tandemdimers I_h Kanäle entstehen, deren Eigenschaften nicht durch Summierung der Eigenschaften von homomeren HCN1 und HCN2 Populationen erklärbar sind (Chen et al. 2001, Ulens et al. 2001). In diesen Arbeiten wurde auch gezeigt, dass heteromere Kanäle aus mHCN1 und mHCN2 dem nativen I_h in CA1 Neuronen wesentlich ähnlicher sind als homomere HCN1 und HCN2 Kanäle. Die Interaktionen zwischen den übrigen HCN Kanälen wurden durch Ko-Immunpräzipitationen in HEK Zellen bestätigt. Auch mit diesem Ansatz gelang es, die Interaktion von mHCN1 und mHCN2, mHCN3 und hHCN4, mHCN2 und hHCN4, wie auch von mHCN3 und hHCN4 zu zeigen. Bei der Analyse der Kombination mHCN2 und mHCN3 zeigte sich keinerlei Signal auf den nach der Präzipitation durchgeführten Western Blots, wodurch belegt wurde, dass diese Kanäle keine Bindung eingehen können.

Durch elektrophysiologische Untersuchungen sollte die fehlende Interaktion zwischen mHCN2 und mHCN3 bestätigt werden. Die Koexpression von mHCN2-EGFP und mHCN3-RFP führte zu einer Reduktion der Stromdichte um 43% im Vergleich zu mHCN2-EGFP. Sowohl in Bezug auf $V_{0,5}$ als auch auf die Zeitkonstante τ_{akt} liess sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellen. Der für $V_{0,5}$ ermittelte Wert entsprach sowohl für mHCN2-EGFP als auch für die Kombination mHCN2-EGFP mit mHCN3-RFP dem für mHCN2, wodurch ein Einfluss von mHCN3 auf die Eigenschaften des mHCN2 in der Plasmamembran ausgeschlossen werden konnte. Die Kinetik der charakterisierten Konstrukte war deutlich langsamer als die von nicht-fusioniertem mHCN2. Da sich die Werte in den beiden Messgruppen aber nicht signifikant unterschieden, ist nicht eine Interaktion von mHCN2 und mHCN3 dafür verantwortlich, sondern die Fusion mit dem sehr grossen EGFP. Die beobachtete Reduktion der Stromdichte durch die Koexpression muss

demnach von einer Inhibition von mHCN2 durch mHCN3 auf einer anderen Ebene als der Zellmembran herrühren. Denkbar ist eine Kompetition bei der Proteinsynthese oder eine Verminderung des Membrantransports von mHCN2. Da mHCN3-RFP zu den gemessenen Strömen offenbar nicht beitrug, ist anzunehmen, dass es weiterer, in dem verwendeten Messsystem nicht anwesender, Faktoren bedarf, um einen HCN3 Strom zu generieren.

Tab. 7 gibt zusammenfassend eine Übersicht, welche HCN Isoformen sich zu Heteromeren assoziieren können.

Tab. 7 Assoziation von HCN Untereinheiten zu funktionellen Kanälen

| | mHCN1 | mHCN2 | mHCN3 | hHCN4 |
|-------|-------|-------|-------|-------|
| mHCN1 | + | + | + | + |
| mHCN2 | + | + | - | + |
| mHCN3 | + | - | + | + |
| hHCN4 | + | + | + | + |

Die HCN Kombinationen, für die eine Heteromerisierung festgestellt werden konnte, sind mit + gekennzeichnet. Keine Interaktion ist bei der mit – gekennzeichneten Kombination (HCN2 mit HCN3) möglich.

Bisher ist nicht bekannt, welche Domänen für die Assoziation von HCN Kanälen verantwortlich sind. In zwei Studien wurde vorgeschlagen, dass eine konservierte Region im N-Terminus der HCN Kanäle die Interaktion vermitteln könnte (Proenza et al. 2002, Tran et al. 2002). Zur Aufklärung dieser Fragestellung könnte die Charakterisierung von Chimären aus HCN2 und HCN3 nützlich sein.

4.2 Glycosylierung von HCN Kanälen

Die meisten Plasmamembran- und Sekretproteine tragen mindestens eine Kohlenhydratkette. Die Glycosylierung, das heisst die Anheftung und anschliessende Prozessierung von Kohlenhydraten, stellt die wichtigste posttranslationale Modifikation der meisten dieser Proteine dar. Ein Teil der Glycosylierungsreaktionen findet im ER-Lumen statt, die weiteren in den Lumina der cis-, medialen und trans-Golgi-Zisternen. Die Oligosaccharidketten spielen eine wichtige Rolle beim Protein-Targeting und haben Einfluss auf die Stabilität und die Faltung von Glycoproteinen.

Für verschiedene Kaliumkanäle wurde bereits gezeigt, dass durch N-Glycosylierung die Zelloberflächenexpression und –stabilität entscheidend beeinflusst wird. So wird eine mutante Form des Shaker Kaliumkanals, die nicht glycosyliert wird, sehr schnell abgebaut und zeigt nur eine marginale Expression an der Zelloberfläche (Khanna et al. 2001). Auch die Mutation

von zwei Asparaginresten im HERG Kaliumkanal führt zu einer perinukleären Verteilung des Ionenkanals in HEK Zellen und es kann kein HERG Strom mehr gemessen werden (Petrecca et al. 1999).

Frühere Arbeiten gaben Hinweise darauf, dass auch HCN Proteine durch N-Glycosylierung modifiziert werden (Santorro et al. 1997), ohne jedoch die Bedeutung dieser Modifikation herauszustellen. Durch biochemische und funktionelle Studien sollte diese im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt werden.

Aus HEK Zellen, die mit mHCN1, mHCN2 und hHCN4 transfiziert waren, wurden die Membranen präpariert und mit N-Glycosidase F verdaut, um zu untersuchen, ob die Proteine Asparagin-gebundene N-Glycanketten tragen. Die unbehandelten Wildtypkanäle zeigten im Western Blot dabei immer zwei Banden. Eine bei der berechneten Grösse und eine zweite, die je nach Protein ca. 15-25kDa höher verlief. Diese schwereren Banden wurden bei allen drei HCN Kanälen durch die Enzyminkubation abgebaut, wodurch der Nachweis erbracht war, dass es sich dabei um durch N-Glycosylierung modifizierte Formen handelte. Im Mausgehirn liegen die HCN Kanäle fast nur in der glycosylierten Form vor und auch hier konnte bei HCN1 und HCN2 durch Verdau mit N-Glycosidase F die grössere Bande als Glycosylierungsprodukt ausgewiesen werden.

Desweiteren sollte die Frage geklärt werden, welche Sequenz im mHCN2 für eine solche Modifikation verantwortlich ist. Durch Sequenzanalyse wurde ein Asparaginrest an der Aminosäureposition 380 ermittelt, der zwischen den vier HCN Kanälen konserviert ist und als potentielle Glycosylierungsstelle in Frage kommt. Dieses Asparagin liegt im Linker zwischen S5 und der Kanalpore und somit an einer nach der postulierten Kanalstruktur extrazellulären Kanalstelle, was notwendig für eine Glycosylierung ist. Durch gerichtete Mutagenese wurde dieser zu Glutamin mutiert und das daraus in HEK Zellen entstehende Protein mit N-Glycosidase F verdaut. Der mutierte Kanal zeigte lediglich die kleinere HCN Bande, deren Grösse sich nach der Enzyminkubation nicht mehr veränderte. Dieses Ergebnis zeigt klar, dass eine Glycosylierung des mHCN2 stattfindet.

Die zelluläre Verteilung von Wildtyp mHCN2-EGFP und der unglycosylierten Mutante des mHCN2, die ebenfalls mit EGFP fusioniert wurde, konnte durch konfokale Mikroskopie aufgeklärt werden. Dabei zeigte sich, dass mHCN2 durch die Mutation des Asparagins 380 nicht mehr wie der Wildtyp zur Plasmamembran gelangen konnte. Ganzzellmessungen an transfizierten HEK Zellen ergaben darüber hinaus keinen HCN Strom mehr. Der mutante mHCN2 kann also tatsächlich keine funktionellen Kanäle mehr ausbilden. Die Glycosylierung ist somit essentiell für den Membrantransport der HCN Kanäle. Wurde der mHCN2 Kanal aber bereits zur Plasmamembran transportiert, spielen die Zuckerketten anscheinend keine Rolle mehr für die Stromeigenschaften. Das Enzym Neuraminidase spaltet extrazelluläre Oligosaccharide nach dem Targeting zur Zellmembran ab. Die Behandlung von mit Wildtyp mHCN2 transfizierten HEK Zellen mit Neuraminidase ergab keinen Unterschied in der Stromdichte und den Stromeigenschaften im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dies steht im Gegensatz zu anderen Kanälen, z.B. dem Natriumkanal rSkM1, wo durch die

Behandlung mit Neuraminidase die Spannungsabhängigkeit verändert wird (Bennett et al. 1997).

Nach Kotransfektion der unglycosylierten Mutante des mHCN2-EGFP mit hHCN4-RFP kam es zu einem „Membranrescue“. Der mutante mHCN2 konnte gemeinsam mit dem hHCN4 zur Zellmembran transportiert werden, wo die beiden Kanäle wieder kolokalisierten. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Interaktion der beiden Kanäle und es scheint in einem Heteromer auszureichen, wenn nur einer der Interaktionspartner die für den Transport nötige Glycosylierung aufweist. Im Gegensatz hierzu konnte mHCN3-RFP die Mutante nicht in die Membran leiten, da mHCN2 und mHCN3 keine Bindungen eingehen können.

Die unglycosylierte Mutante des mHCN2 lässt sich wie auch der Wildtyp mit hHCN4 koimmunpräzipitieren. Die Interaktion zwischen den beiden Kanälen steht somit nicht in Zusammenhang mit der Glycosylierung, wodurch der oben beschriebene „Membranrescue“ bestätigt wird.

Durch das Wissen um die Glycosylierung der HCN Kanäle und die hierfür nötige Aminosäure wird es vielleicht möglich, Erbkrankungen aufgrund eines HCN Defektes zu erkennen. Die Mutation des für die Glycosylierung wichtigen Asparaginrests könnte beim Menschen z.B. zu Arrhythmien oder zu Formen der Epilepsie führen. Im HERG Kanal wurde die Mutation einer extrazellulären Asparagin-Glycosylierungsstelle bereits mit der Entwicklung des Long QT Syndroms assoziiert (Satler et al. 1998).

4.3 Funktionelle Analyse

Die vier HCN Kanäle unterscheiden sich in Bezug auf ihre Spannungsabhängigkeit (ausgedrückt durch die halbmaximale Aktivierung $V_{0,5}$), die Zeitabhängigkeit ihrer Aktivierung (Aktivierungskinetik) und das Ausmass der Modulation durch cAMP. Um diesen Eigenschaften die verantwortlichen Sequenzen in den Kanälen zuzuordnen, wurden Punktmutanten des mHCN2 und Chimären aus mHCN1 und mHCN2 konstruiert und diese durch die Patch-Clamp-Methode elektrophysiologisch charakterisiert.

4.3.1 Modulation von mHCN2 durch cAMP

Sowohl für native wie auch für klonierte HCN Kanäle wurde gezeigt, dass cAMP die Aktivität auf direktem Weg, das heisst unabhängig von einer Phosphorylierung moduliert (DiFrancesco und Tortora 1991, Ludwig et al. 1998). Bei den Säugetier-HCN Kanälen verschiebt cAMP die Aktivierungskurve zu depolarisierten Potentialen, wodurch die halbmaximale Aktivierung $V_{0,5}$ positivere Werte annimmt. Die HCN Kanäle können deshalb schon bei weniger hyperpolarisiertem Potential aktiviert werden. cAMP vergrössert den I_h Strom und beschleunigt die Aktivierungskinetik des Kanals. Die Verschiebung durch cAMP ist am geringsten bei HCN1 (2-5,8mV), HCN2 (12-14mV) und HCN4 (11-23mV) reagieren mit einer grösseren Verschiebung. Vermittelt wird dieser Effekt durch die direkte Interaktion von cAMP mit der CNBD der HCN Kanäle, die homolog zu denen in anderen zyklonukleotidbindenden Proteinen wie CAP, PKA und CNG Kanälen ist.

Durch Mutation eines unter diesen Proteinen konservierten Arginins im β_7 -Faltblatt der CNBD des mHCN2 (Position 591), der z.B. in CNG Kanälen für die cAMP-Bindung verantwortlich ist, sollte dessen Bedeutung für die Modulation der HCN Kanäle herausgestellt werden. Als Ersatz für das basische Arginin wurden saure Aminosäuren gewählt (Mutante 1: Glutaminsäure, Mutante 2: Asparaginsäure), um einen grösstmöglichen Unterschied der Aktivierungskurven zu erzielen. Bei beiden Mutanten induzierte die Anwesenheit von cAMP keine Verschiebung der Aktivierungskurve mehr in Richtung positiverer Potentiale. Abgesehen davon waren die grundlegenden Stromeigenschaften nicht verändert. Es wurde durch die Mutationen offensichtlich die Bindung von cAMP unterbunden und die Mutanten 1 und 2 verhielten sich in Gegenwart von cAMP wie Wildtyp mHCN2 ohne cAMP-Zusatz. In Mutante 3 wurde zusätzlich zur Mutation Arginin \rightarrow Glutaminsäure der benachbarte Threoninrest (Position 592) zu Alanin mutiert. Auch die Aktivierungskurve bzw. die halbmaximale Aktivierung dieser Mutante in Gegenwart von cAMP war nicht von Wildtyp mHCN2 ohne cAMP zu unterscheiden. Hier fehlte ebenfalls die durch cAMP Einfluss für den Wildtyp mHCN2 charakteristische Änderung von $V_{0,5}$ um bis zu 18mV. Mutante 3 unterschied sich dabei nicht signifikant von Mutante 1 und Mutante 2.

Diese Ergebnisse vertiefen die Beobachtungen von Wainger et al. (2001), die die Bedeutung des gesamten C-Terminus inklusive der CNBD des mHCN2 in Bezug auf die cAMP Abhängigkeit untersucht haben. Dort wurde nach Untersuchung von C-terminal verkürzten mHCN2 Kanälen postuliert, dass die CNBD als Inhibitor der Kanalöffnung fungiert und dass cAMP diese aufheben kann. Die vorliegende Studie zeigt, dass das Arginin 591 von essentieller Bedeutung für die cAMP-Wirkung auf mHCN2 ist.

4.3.2 Aktivierungskinetik und Spannungsabhängigkeit

Die Stromspuren der HCN Kanäle lassen sich durch eine sigmoidale Funktion beschreiben. Bei Vernachlässigung der initialen Verzögerung kann die Aktivierung mit einer Exponentialfunktion bestehend aus einer oder zwei Komponenten angenähert werden. Die Kinetik der Kanalöffnung wird mit zunehmender Hyperpolarisation beschleunigt. Der Zeitverlauf und die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung unterscheiden sich allerdings bei den verschiedenen HCN Kanälen. mHCN1 besitzt nach den hier durchgeführten Messungen eine Zeitkonstante τ_{akt} von $36,8 \pm 4,5$ ms und aktiviert somit sehr viel schneller als mHCN2 mit τ_{akt} von 269 ± 46 ms. Die halbmaximale Aktivierung liegt für mHCN1 bei $-81,2$ mV und für mHCN2 bei $-90,9$ mV. Um diese Unterschiede bestimmten Bereichen innerhalb der beiden Kanäle zuzuordnen, wurden die mit Mutante 5-7 bezeichneten verkürzten HCN Kanäle und die mit Mutante 8-12 bezeichneten Chimären aus mHCN1 und mHCN2 konstruiert.

Für die Mutanten 5 und 6 konnten nach Expression in HEK Zellen keine Ströme gemessen werden. Bei beiden Konstrukten wurde der C-Terminus des mHCN2 extrem verkürzt und die Mutanten konnten so keine funktionellen Kanäle mehr kodieren. Dies war ein erster Hinweis darauf, dass der C-Terminus essentiell für die Aktivierung oder auch für die Expression der HCN Kanäle ist.

Durch Vergleich der Werte für die Aktivierungskinetik (Zeitkonstante τ_{akt}) mit der Struktur der Mutanten 7-12 wurde der für die Geschwindigkeit der Aktivierung verantwortliche Bereich auf die Kernregion zwischen S1 und S6 der Kanäle unter Einschluss eines kleinen Teils in Richtung des C-Terminus eingengt. Die Mutanten 8 und 12 verhalten sich in Bezug auf die Geschwindigkeit der Kanalöffnung fast wie Wildtyp mHCN2, wodurch ein Einfluss von N- und C-Terminus ausgeschlossen werden konnte, da beide den N-Terminus des mHCN1 tragen und Mutante 12 zudem den C-Terminus des mHCN1 enthält. Auch Mutante 7 wurde durch die Entfernung des N-Terminus nicht schneller aktiviert. Bei den Mutanten 10 und 11 besteht die Kernregion aus mHCN1-Sequenzen und sie aktivieren beide sehr schnell. Mutante 10, bei der auch der C-Terminus von mHCN1 stammt, aktiviert dabei noch schneller, was einen Einfluss eines kleinen Teils in Richtung des C-Terminus vermuten lässt. Bestätigt wird dies durch Mutante 9, die mit einer Zeitkonstante aktiviert, die intermediär zwischen HCN1 und HCN2 liegt. Sie trägt die Kernregion von mHCN2 und sollte somit entsprechend langsam aktivieren. Durch den mHCN1-C-Terminus kommt es allerdings zu einer Zeitkonstante, die näher zu der des Wildtyp mHCN1 Kanals hin verschoben ist.

Für die Spannungsabhängigkeit der Kanäle ist dagegen der C-Terminus der HCN Kanäle verantwortlich. Die Mutanten 7 und 8, die hier aus mHCN2 Sequenzen bestehen, aktivieren bei etwas negativeren Potentialen als mHCN2. Die Mutanten 9, 10 und 12, deren C-Terminus dem HCN1 entspricht, aktivieren sogar bei negativeren Potentialen als mHCN1. Mutante 11 mit ihrem mHCN2 C-Terminus sollte nach dieser Theorie wie mHCN2 aktivieren. Ihr Wert für $V_{0,5}$ liegt näher an mHCN1 als an mHCN2, allerdings intermediär zwischen den anderen beschriebenen Mutanten. Da Mutante 10 bei den mit Abstand positivsten Potentialen aktiviert und hier zusätzlich zum C-Terminus auch noch die Kernregion aus mHCN1 Sequenzen besteht, ist davon auszugehen, dass zusätzlich zum C-Terminus noch ein Teil der Kernregion zu den gemessenen Effekten beiträgt.

Diese Ergebnisse werden bestätigt durch Untersuchungen an Chimären aus mHCN1 und rbHCN4, nach denen S1, der Linker zwischen S1 und S2 (S1-S2) und S6-CNBD die Aktivierungskinetik bestimmen (Ishii et al. 2001). In einer weiteren Studie wurden Hinweise auf den Einfluss des C-Terminus der HCN Kanäle auf die Spannungsabhängigkeit gegeben. Hier konnte an Chimären aus mHCN1 und rbHCN4 gezeigt werden, dass der C-Terminus des mHCN1 die Aktivierung des rbHCN4 stark beschleunigen kann (Viscomi et al. 2001). Die verwendeten Konstrukte entsprachen allerdings, was die Position der Umschaltung von HCN1 auf HCN4 betrifft, nicht den hier verwendeten Chimären. Während im Rahmen dieser Arbeit unmittelbar nach S6 von einem Gen auf das andere umgeschaltet wurde, beginnt bei Viscomi et al. der Bereich des mHCN1 erst nach 24 Aminosäuren in Richtung C-Terminus (innerhalb des sogenannten C-Linkers).

4.4 Genomische Analyse des hHCN2 und des hHCN4

Bei Betrachtung der essentiellen Funktion der HCN Kanäle im Rahmen der Entstehung rhythmischer Erregungen in Herz und Gehirn liegt es nahe zu vermuten, dass erworbene oder auch vererbte Defekte in diesen Ionenkanälen zu kardialen Arrhythmien, Epilepsie oder anderen neurologischen Dysfunktionen führen können.

So wurden bereits mehrere Fälle beschrieben, in denen ein erhöhter I_h oder Verschiebungen der Spannungsabhängigkeit im Herzventrikel der Ratte und des Menschen zur Manifestation verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen beigetragen haben (Cerbai et al. 1994, 1997, 2001). Die genauen Mechanismen, die zu den Erkrankungen führen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt, es wurden allerdings in Studien zur hormonellen Regulation Expressionsstörungen postuliert. Mäuse, die den β_2 -Adrenorezeptor überexprimieren und so im Alter zu Herzhypertrophien neigen, zeigen einen fünffach erhöhten ventrikulären I_h im Vergleich zu Kontrollmäusen und eine erhöhte Expression von HCN4 im Vergleich zu HCN2 (Graf et al. 2001). Die erniedrigten Expressionsraten von HCN2 und HCN4 im Herz von hypothyreotischen Ratten und Mäusen wurden mit der entstehenden Bradykardie in Verbindung gebracht, während durch Hochregulation der beiden Kanäle der positiv chronotrope Effekt des Schilddrüsenhormons zustande kommen soll (Gloss et al. 2001, Pachucki et al. 1999). Mäuse, die defizient an HCN2 sind, zeigen ausgeprägte kardiale Arrhythmien aufgrund einer gestörten Sinusknotenfunktion (Ludwig et al. 2003).

Neben erworbenen Erkrankungen wurde eine Mutation im humanen HCN4 Gen bei einem Patienten mit Sinusbradykardie und Vorhof- sowie Kammerflimmern beschrieben, die zu einer C-terminalen Verkürzung des Kanals inklusive der CNBD führt und so die Grösse des I_h reduziert (Schulze-Bahr et al. 2001).

4.4.1 Cayman Ataxie

Auch auf neurologischer Ebene wurden Änderungen des I_h mit Krankheiten assoziiert. So zeigen die oben erwähnten HCN2 defizienten Mäuse spontane Absence Epilepsie und Bewegungsstörungen (Ludwig et al. 2003). Der Phänotyp dieser Mäuse ähnelt dem von Patienten, die an der sogenannten Cayman Ataxie leiden. Diese Erkrankung ist genetisch bedingt und der Bereich im Genom, wo die Ursache anzusiedeln ist, wurde auf Chromosom 19p13.3 gefunden (Nystuen et al. 1996), wo beim Menschen auch das HCN2 Gen lokalisiert ist. Ausgehend von diesen Erkenntnissen sollte in dieser Arbeit genomische DNA von betroffenen Patienten durch PCR und nachfolgendes Sequenzieren sowie durch Southern Blot Analyse auf Mutationen und Deletionen im Bereich des HCN2 Gens untersucht werden.

Durch die Wahl von exonspezifischen Primern wurden zunächst Sequenzen amplifiziert, die wie cDNA ohne Introns aufgebaut waren. Eine BLAST Recherche mit den gefundenen intronfreien Sequenzen führte zu einem DNA Abschnitt auf Chromosom 15, der zu 91% homolog zur cDNA des humanen HCN2 war. Da die Sequenz aus genomischer DNA isoliert wurde, ihr aber die Introns fehlten, musste es sich um ein Pseudogen des HCN2 handeln, das

im Laufe der Evolution durch reverse Transkription aus HCN2 entstanden ist. Innerhalb dieses Pseudogens finden sich zahlreiche Mutationen und Deletionen, die dazu führen, dass bei einer eventuellen Transkription sehr bald STOP-Kodons den Prozess beenden würden. Abgesehen davon lässt sich dem Pseudogen kein eindeutiger Transkriptionsstart zuordnen, so dass es äusserst unwahrscheinlich ist, dass es durch das Abschreiben dieses Gens zu einer defekten Variante des HCN2 kommt. Auch in genomischer DNA von gesunden Menschen lässt sich das Pseudogen nachweisen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die HCN2 Funktion durch die Anwesenheit des Pseudogens nicht gestört wird.

Durch die Wahl von intronständigen Primern konnten die einzelnen Exons des HCN2 Gens der Cayman-Patienten spezifisch amplifiziert und in der Folge sequenziert werden. Im Vergleich mit der veröffentlichten Sequenz ergaben sich dabei keinerlei Unterschiede. Auf Ebene der Exons des HCN2 kann die Ursache für die Cayman Ataxie somit nicht angesiedelt werden.

Um zu erfahren, ob vielleicht eine Deletion im Bereich des grössten der Introns (Intron 1; Grösse ca. 13kb) die Krankheit verursacht, wurden die genomische DNA eines Cayman-Patienten und eines gesunden Probanden mit verschiedenen Enzymen verdaut und unter Verwendung einer Exon 1-spezifischen Sonde durch Southern Blot Analyse verglichen. Auch hier konnten keine Unterschiede zwischen Cayman-Patienten und einer gesunden Person festgestellt werden. Daraus und aus den Sequenzvergleichen kann deshalb geschlossen werden, dass die Ursache der Cayman Ataxie nicht im Bereich des HCN2 Gens lokalisiert sein kann. Möglich wäre allerdings eine gestörte Proteinexpression oder das Fehlen wichtiger posttranslationaler Modifikationen, wie z.B. Glycosylierungen, so dass trotz der korrekten genetischen Information kein funktionsfähiger HCN2 entstehen kann.

4.4.2 Sick Sinus Syndrom

Das Sick Sinus Syndrom stellt eine Gruppe nicht-ventrikulärer Herzrhythmusstörungen dar, die ihre Ursache in Dysfunktionen im Bereich des Sinusknotens haben. Damit ist es eine weitere Erkrankung, die durch eine gestörte Funktion von HCN Kanälen zustande kommen könnte. Da HCN2 und HCN4 im Sinusknoten die vorherrschenden HCN Isoformen darstellen (Moosmang et al. 2001), wurde genomische DNA von Personen, bei denen das Syndrom familiär bedingt gehäuft vorkommt, auf Mutationen im Bereich des HCN2 Kanals und des HCN4 Kanals untersucht.

Die Amplifizierung der Exons des HCN2 erfolgte wieder mit intronspezifischen Primern, um eine Erschliessung des Pseudogens des HCN2 auszuschliessen. Die Sequenzierung der Exons 1-8 gab keine Aufschlüsse über einer Krankheitsmanifestation durch einen HCN2 Defekt. Eine bei einem Patienten an der Position nt280 im Exon 1 gefundene Mutation, die zu einer Aminosäureverschiebung von Arginin zu Histidin führt, liess sich bei dem ebenfalls erkrankten Bruder des Patienten nicht bestätigen, so dass sie nicht die Ursache für diese familiäre Form des Sick Sinus Syndroms sein kann.

Die Untersuchung des HCN4 eines Sick Sinus Syndrom Patienten ergab dagegen einen eindeutigen Polymorphismus an Position nt107 im Exon 1. Dadurch entsteht auf Aminosäureebene an dieser Stelle in 50% der Fälle Glycin, in 50% der Fälle Glutaminsäure. Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass dieser Austausch einen Effekt auf die Eigenschaften des HCN4 dieses Patienten ausübt. Dieser Teil des HCN4 liegt im N-terminalen intrazellulären Bereich des Kanals. Die Funktionen des N-Terminus sind noch nicht vollständig aufgeklärt, es gibt aber Hinweise darauf, dass er für die Expression und die Anordnung der HCN Kanäle in der Plasmamembran von Bedeutung ist (Tran et al. 2002). Der gefundene Polymorphismus liegt allerdings nicht in der beschriebenen konservierten Region, die für diese Effekte verantwortlich gemacht wurde. HCN Kanäle, bei denen der N-Terminus bis zu dem konservierten Bereich deletiert wurde, zeigen bei elektrophysiologischer Untersuchung keine auffälligen Unterschiede im Vergleich zu Wildtyp Kanälen (siehe 3.3.2.2: Mutante 7). Eine Möglichkeit, die Relevanz des beobachteten Polymorphismus aufzuklären, wäre die gerichtete Mutation auf cDNA-Ebene und eine elektrophysiologische Charakterisierung des entstehenden mutanten Proteins.

5 Zusammenfassung

Die HCN Kanäle spielen als molekulare Basis des I_h Stroms eine bedeutende Rolle bei der Entstehung rhythmischer Erregungen. Die HCN Familie der Säugetiere besteht aus vier Mitgliedern (HCN1-HCN4), die in unterschiedlichem Ausmass in verschiedenen Regionen von Herz und Gehirn exprimiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Bildung von Heteromeren zwischen den einzelnen Isoformen, die Glycosylierung der Kanäle und deren Funktion, die Modulation durch cAMP, die Aktivierung in Bezug auf Kinetik und Spannungsabhängigkeit, sowie die Rolle von HCN Kanal-Genen im Rahmen von genetischen Erkrankungen untersucht.

Sowohl im Mausgehirn wie auch in HEK Zellen können die HCN Kanal-Untereinheiten miteinander interagieren. Im Mausgehirn wurde die Heteromerisierung von HCN1 und HCN2 durch Ko-Immünpräzipitation nachgewiesen. Durch konfokalmikroskopische Studien an EGFP- bzw. RFP-markierten HCN Isoformen in HEK Zellen konnte für alle HCN-Zweierkombinationen ausser mHCN2 mit mHCN3 eine Kolokalisation im Bereich der Plasmamembran beobachtet werden. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch Ko-Immünpräzipitation. Mit Hilfe von elektrophysiologischen Untersuchungen konnte verifiziert werden, dass mHCN2 und mHCN3 nicht interagieren.

Die HCN Kanäle werden *in vivo* (Mausgehirn) und *in vitro* (HEK Zellen) N-glycosyliert. Am Beispiel des mHCN2 wurde die physiologische Relevanz dieser posttranslationalen Modifikation untersucht. Ein mutanter, unglycosylierter mHCN2 Kanal wird nicht mehr zur Plasmamembran transportiert und generiert keinen charakteristischen Einwärtsstrom mehr. Nach Koexpression mit hHCN4 ist die Membranständigkeit dieser Mutante wieder gegeben, sowie auch die Kolokalisation der beiden Kanäle. Im Gegensatz hierzu konnte mHCN3 den unglycosylierten mHCN2 nicht zur Zellmembran transportieren, da zwischen den beiden Kanälen ganz offensichtlich keine Bindung bestehen kann.

Die für die Bindung von cAMP an den mHCN2 Kanal essentielle Aminosäure Arginin 591 wurde durch gerichtete Mutagenese und Patch-Clamp-Untersuchungen identifiziert. Der Ersatz des Arginin 591 führt zu mHCN2 Kanälen, die bei Anwesenheit von cAMP nicht mehr wie der Wildtyp Kanal eine Verschiebung der halbmaximalen Aktivierung zu positiveren Potentialen zeigen. Durch elektrophysiologische Charakterisierung von verkürzten mHCN2 Kanälen und Chimären aus mHCN1 und mHCN2 konnten den Unterschieden in Aktivierungskinetik und Spannungsabhängigkeit der HCN Isoformen konkrete Kanalteile zugeordnet werden. Für die Geschwindigkeit der Aktivierung sind die Kernregion und ein Stück des C-Terminus verantwortlich, während der C-Terminus die Spannungsabhängigkeit bestimmt.

Die genomische Analyse des HCN2 von Cayman Ataxie-Patienten, die zerebrale Dysfunktionen ähnlich denen von HCN2-knockout Mäusen zeigen, ergab keine Unterschiede im Vergleich zu einem gesunden Probanden. Eine Mutation im HCN2 Gen als Ursache der

Cayman Ataxie kann somit ausgeschlossen werden, es besteht jedoch die Möglichkeit einer Störung der Proteinsynthese oder posttranslationaler Modifikationen. Auch bei zwei Patienten, die an familiär bedingtem Sick Sinus Syndrom leiden, konnte die Ursache der Erkrankung nach genomischer Sequenzanalyse nicht durch einen Defekt des HCN2 Gens oder des HCN4 Gens erklärt werden.

6 Anhang

6.1 Restriktionsenzyme

Tab. 8 Verwendete Restriktionsenzyme

| Enzym | Erkennungssequenz (5'-3') | NEB-Puffer | Zusatz von BSA | Inkubationstemperatur |
|---------|---------------------------|------------|----------------|-----------------------|
| AccI | GT/(AC)(TG)AC | 4 | - | 37°C |
| AgeI | A/CCGGT | 1 | - | 37°C |
| ApaI | G/TGCAC | 4 | + | 37°C |
| BamHI | G/GATCC | U | + | 37°C |
| Bsu36I | CC/TNAGG | 3 | + | 37°C |
| EcoRI | G/AATTC | U | - | 37°C |
| HindIII | A/AGCTT | 2 | - | 37°C |
| KpnI | GGTAC/C | 1 | + | 37°C |
| NheI | G/CTAGC | 2 | + | 37°C |
| PflMI | CCANNNN/NTGG | 3 | + | 37°C |
| SspI | AAT/ATT | U | - | 37°C |
| XbaI | T/CTAGA | 2 | + | 37°C |
| XhoI | C/TCGAG | 2 | + | 37°C |

N steht für beliebiges Nukleotid, Pu und Py für Purin bzw. Pyrimidin. Die Schnittstellen sind mit / gekennzeichnet. Puffer U sind für das jeweilige Enzym spezifisch. In Klammern geschriebene Basen kennzeichnen solche, die gegeneinander ausgetauscht werden können.

6.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide binden an die jeweils aufgeführten Gene bzw. Vektoren. Die kodierenden Bereiche der HCN Gene wurden folgendermassen nummeriert (ATG-STOP):

mHCN1 (AJ225123): nt225-2957

hHCN2 cDNA (AJ012582): nt54-2723

hHCN2 genomisch (AC005559): nt29748-56276

mHCN2 (AJ225122): nt36-2627

mHCN3 (AJ225124): nt99-2438

hHCN4 (AJ132429): nt567-4178

Tab. 9 Verwendete Oligonukleotide der Fa. MWG

| Name | Gen | Sequenz | Bindungsstelle |
|-------|-------|----------------------------|----------------|
| BM1R | mHCN2 | ACGCTGGCCGT(CG)TCCCGGCCCTC | nt 1797-1819 |
| BM2F | mHCN2 | AGGGGCCGGGA(CG)ACGGCCAGCGT | nt 1797-1819 |
| BM3R | mHCN2 | ACGCTGGCCGCTTCCCGGCCCTC | nt 1797-1819 |
| BM4F | mHCN2 | AGGGGCCGGGAAGCGGCCAGCGT | nt 1797-1819 |
| BM7R | mHCN2 | CATGGCCACAGCCTGCTGTA | nt 2140-2159 |
| BM34R | mHCN3 | TAACCTAGGAGTCGACATGTTGGC | nt 2427-2450 |
| BM35R | mHCN2 | GCTCAAGGGTACCAAGTTGGAAGA | nt 2613-2636 |
| BM39F | mHCN2 | AGGGCCTCTGCCTCTGCAGC | nt 2240-2260 |
| BM40F | mHCN3 | TGATTCTCCAGCCACCCTCCT | nt 2000-2020 |
| BM41F | hHCN4 | TACTCCCCGAGGAGGTCTCAG | nt 3623-3644 |
| BM42R | mHCN2 | GCTCAAGGGTCTAGAGTTGGAAGA | nt 2613-2636 |
| BM43R | mHCN3 | TAACCTAGGATCCACATGTTGGC | nt 2427-2450 |
| BM50R | hHCN4 | GGCCCAGCCTCGAGATTGGATGGC | nt 4163-4186 |
| BM51R | hHCN4 | GGCCCAGGTACCAGATTGGATGGC | nt 4163-4186 |
| BM53R | hHCN2 | TACGGGTGGATGATCCAGGCC | nt 653-673 |
| BM54F | hHCN2 | CGGGGAGAGCCCGGGCGCGA | nt 83-102 |
| BM55F | hHCN2 | CACGGCCAAGGGCAGCCCGAA | nt 329-349 |
| BM56F | hHCN2 | GGGACTTCACCATGCTGCTGT | nt 694-714 |
| BM57F | hHCN2 | CGGATGTTCCGGCAGCCAGAAG | nt 594-614 |
| BM58R | hHCN2 | TGGATGTAGCGGATCAGGCGT | nt 1076-1096 |
| BM59F | hHCN2 | CAGCGCGGTGATGAGGATCTG | nt 1136-1156 |
| BM60R | hHCN2 | ATGGACACCCAGCAGTTGCGC | nt 1238-1258 |
| BM61F | hHCN2 | CGTGGAGTGAAGTACTCCTT | nt 1279-1300 |
| BM62R | hHCN2 | TGGCGCCGCGAGGAGTCCAGC | nt 1457-1477 |
| BM63F | hHCN2 | TTCCACAAGCTGCCAGTGACT | nt 1518-1539 |
| BM64R | hHCN2 | TTGAGCTCGCCCAGGATGCTG | nt 1601-1621 |
| BM65F | hHCN2 | CGTCAACTTCAACTGCCGGAAG | nt 1643-1664 |
| BM66R | hHCN2 | GAGCCATCGGACAGTTCATC | nt 1847-1867 |
| BM67F | hHCN2 | GCCTGCTCACCCGGGGCCGC | nt 1885-1904 |
| BM68R | hHCN2 | GCCACCGTCTCGAAGGCGCG | nt 2001-2020 |
| BM69F | hHCN2 | CTCCTGCACAAGGTGCAGCAT | nt 2061-2081 |
| BM70R | hHCN2 | TTTGGTCTGGATGACGGCCCC | nt 2764-2784 |
| BM71R | hHCN2 | CGCCACCTGCGGGCAGAAGC | nt 2264-2282 |
| BM72F | hHCN2 | TCGCCTCCCCACAGTACAAGCA | nt 49975-49996 |

| | | | |
|--------|--------|---|-------------------|
| BM73R | hHCN2 | TGTGTACGCAGGTCTAGCTCGA | nt 50327-50348 |
| BM78F | hHCN2 | CAGGGAGAGCCTGGGTGGGAA | nt 53530-53551 |
| BM81R | hHCN2 | CTGTCCAAGCCACTCTCCTGAT | nt 53881-53902 |
| BM84R | mHCN2 | CTAGCCTGGCTCATGGTGGCGCG | Adapter für mHCN2 |
| BM85R | mHCN2 | AGTCGGGGATCCCGGTCAGACGAAGTTGGGGTCTGCATT | nt 1593-1613 |
| BM86F | hHCN2 | GCCTCCCCCTGCAGGAGATC | nt 53035-53055 |
| BM87R | hHCN2 | CGCCCCCTCAAGCTCACCC | nt 53289-53309 |
| BM89F | mHCN2 | CTAGCGCCGCCACCATGAGCCAGG | Adapter für mHCN2 |
| BM90F | hHCN2 | CCTCGTCCCCAAGGAAGAGT | nt 43257-43277 |
| BM91R | hHCN2 | GCCCCACCCATGCACCATTATA | nt 43855-43876 |
| BM94F | hHCN2 | CTGCAGTGAAGGCTGTAGAGGT | nt 29777-29796 |
| BM95R | hHCN2 | CACGTTCCCCTCTATTCGTCCT | nt 30687-30709 |
| BM96F | hHCN2 | CGGCGGCTCCGCTCCGCACT | nt 29710-29729 |
| BM97F | hHCN2 | GCATGCTTGCTCTACACGGCAA | nt 55478-55500 |
| BM98R | hHCN2 | TCCGTCCAACCTACGGCTACCTA | nt 56394-56415 |
| BM100R | hHCN2 | CGGCACGAGAACGACACCTT | nt 48034-48055 |
| BM101R | hHCN2 | ACGAGCTGTCGCGGCTGCGGA | nt 277-297 |
| BM114F | mHCN2 | TGGTTCGTGGTGGACTTCGTGT | nt 809-826 |
| BM115R | mHCN2 | CACGAGTGCTGCACCATGTTG | nt 1163-1183 |
| BM116F | mHCN2 | CAACATGGTGCAGCACTCGTG | nt 1163-1183 |
| BM117R | mHCN2 | AAGTTGGGGTCTGCATTGGCA | nt 1589-1609 |
| BM125R | mHCN1 | GCATGAAGCTAGCCTGCCGCC | nt 454-474 |
| BM126F | pcDNA3 | TAACTAGAGAACCCACTGCTTAC | nt 826-848 |
| BM129F | mHCN1 | TCCAGTCCCTGGACTCTTCAAGG | nt 1381-1403 |
| BM130R | mHCN1 | ACGAAATTGGGATCGGCGTTAG | nt 1621-1642 |
| BM132F | mHCN1 | GCTCCACACCGAAAAATGAA | nt 2566-2585 |
| BM135R | mHCN1 | TCATCAAGGATCCTAAATTCGAAG | nt 2944-2967 |
| BM138R | hHCN2 | AACCCTCTGTAAGCGGGATAAG | nt 45092-45113 |
| BM139F | hHCN2 | ACCTCCAGTGCTTGGCAGAGG | nt 47664-47684 |
| BM141F | mHCN1 | GGCGGCAGGCTAGCTTCATGC | nt 454-474 |
| BM144F | mHCN2 | CTCATCCAGTCTTTGGATTTCGTCA | nt 1347-1370 |
| BM204F | mHCN2 | GTTCGCGCTCTTCAAGGCCATGA | nt 1199-1221 |
| BM205F | mHCN2 | GAGCAATACATGTCTTCCACAA | nt 1404-1426 |

In Klammern () geschriebene Basen kennzeichnen degenerierte Primer, d.h. 50% der Moleküle tragen an dieser Stelle die eine Base, 50% die zweite Base.

6.3 Abkürzungen der proteinogenen Aminosäuren

| | | | |
|-----------------------|--------|---------------------|--------|
| Alanin | Ala, A | Leucin | Leu, L |
| Arginin | Arg, R | Lysin | Lys, K |
| Asparagin | Asn, N | Methionin | Met, M |
| Asparaginsäure | Asp, D | Phenylalanin | Phe, F |
| Cystein | Cys, C | Prolin | Pro, P |
| Glutamin | Gln, Q | Serin | Ser, S |
| Glutaminsäure | Glu, E | Threonin | Thr, T |
| Glycin | Gly, G | Tryptophan | Trp, W |
| Histidin | His, H | Tyrosin | Tyr, Y |
| Isoleucin | Ile, I | Valin | Val, V |

7 Literaturverzeichnis

7.1 Zitierte Veröffentlichungen

Altenhofen W, Ludwig J, Eismann E, Kraus W, Bönigk W, Kaupp UB (1991) Control of ligand specificity in cyclic nucleotide-gated channels from rod photoreceptors and olfactory epithelium. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88: 9868-9872

Attwell D, Wilson M (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: 611-631

Baker K, Warren KS, Yellen G and Fishman MC (1997) Defektive 'pacemaker' current (I_h) in an zebrafish mutant with slow heart rate. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94: 4554-4559

Barnes S, Hille B (1989) Ionic channels of the inner segment of tiger salamander cone photoreceptor. *J.Gen.Physiol.* 94: 719-743

Beaumont V, Zucker RS (2000) Enhancement of synaptic transmission by cyclic AMP modulation of presynaptic I_h channels. *Nat.Neurosci.* 3: 133-141

Benham CD, Bolton TB, Denbigh JS, Lang RJ (1987) Inward rectification in freshly isolated single muscle cells of the rabbit jejunum. *J.Physiol.* 383: 461-476

Bennett E, Urcan MS, Tinkle SS, Koszowski AG, Levinson SR (1997) Contribution of sialic acid to the voltage dependence of sodium channel gating. *J.Gen.Physiol.* 109: 327-343

Biel M, Ludwig A, Zong X, Hofmann F (1999a) Hyperpolarization-activated cation channels: A multi-gene family. *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.:* 165-182

Biel M, Schneider A, Wahl C (2002) Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc.Med.* 12: 206-213

Biel M, Zong X, Ludwig A, Sautter A, Hofmann F (1999b) Structure and function of cyclic nucleotide gated channels. *Annu.Rev.Neurosci.* 19: 235-263

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction method for screening recombinant plasmid. *Nucl.Acids Res.* 7: 1513-1518

Birren B, Linton L, Nusbaum C, Lander E (2000) Homo sapiens chromosome 1, clone RP11-215H14. *unpublished*

- Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heynecker HL, Boyer HW, Crosa JW, Falkow S (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95-113
- Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ (1979) How does adrenalin accelerate the heart? *Nature* 280: 235-236
- Brown HF, Giels W, Noble SJ (1977) Membrane currents underlying activity in frog sinus venosus. *J.Physiol.* 271: 783-816
- Cerbai E, Barbieri M, Mugelli A (1994) Characterization of the hyperpolarization-activated current, I_f , in ventricular myocytes isolated from hypertensive rats. *J.Physiol.* 481: 585-591
- Cerbai E, Pino R, Porciatti F, Sani G, Toscano M, Maccherini M, Giunti G, Mugelli A (1997) Characterization of the hyperpolarization-activated current, I_f , in ventricular myocytes from human failing heart. *Circulation* 95: 568-571
- Cerbai E, Sartiani L, DePaoli P, Pino R, Maccherini M, et al. (2001) The properties of the pacemaker current I_f in human ventricular myocytes are modulated by cardiac disease. *J.Mol.Cell.Cardiol.* 33: 441-448
- Chaplan SR, Guo H-Q, Lee DH, Luo L, Liu C, Kuei C, Velumian AA, Butler MP, Brown SM, Dubin AE (2003) Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain. *J.Neurosci.* 23: 1169-1178
- Chen J, Mitcheson IS, Lin M, Sanguinetti MC (2000) Functional roles of charged residues in the putative voltage sensor of the HCN2 pacemaker channel. *J.Biol.Chem.* 275: 36465-36471
- 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 : 491-503
- Chenais F, Virella G, Patrick CC, Fudenberg HH (1977) Isolation of soluble immune complexes by affinity chromatography using staphylococcal protein A-Sepharose as substrate. *J.Immunol.Methods* 18: 183-192
- Clapham DE (1998) Not so funny anymore: pacing channels are cloned. *Neuron* 21: 5-7
- Demontis GC, Longoni B, Barcaro U, Cervetto L (1999) Properties and functional roles of hyperpolarization-gated currents in guinea-pig retinal rods. *J.Physiol.* 515: 813-828

- Demontis GC, Moroni A, Gravante B, Altomare C, Longoni B, Cervetto L, DiFrancesco D (2002) Functional characterization and subcellular localization 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 (1993) Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu.Rev.Physiol.* 55: 455-472
- DiFrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M, Tromba C (1986) Properties of the hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J.Physiol.* 377: 61-88
- DiFrancesco D, Tortora P (1991) Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular AMP. *Nature* 351: 145-147
- 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
- Elder JH, Alexander S (1982) Endo-β-N-acetylglucosaminidase F: Endoglycosidase from *Flavobacterium meningosepticum* that cleaves both high mannose and complex glycoproteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 79: 4540-4544
- Er F, Larbig R, Ludwig A, Biel M, Hofmann F, Beuckelmann DJ, Hoppe UC (2003) Dominant-negative suppression of HCN channels markedly reduces the native pacemaker current I_f and undermines spontaneous beating of neonatal cardiomyocytes. *Circulation* 107: 485-489
- Fain GL, Quandt BL, Gerschfeld HM (1978) Contribution of a caesium sensitive conductance increase to the rod photoresponse. *Nature* 272: 466-469
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal.Biochem.* 132: 6-13
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roma R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielson M (1987) Lipofectin: A highly efficient, lipid-mediated DNA transfection procedure. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84:7413-7417
- Gauss R, Seifert R, Kaupp UB (1998) Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 393: 583-587

Gloss B, Trost SU, Bluhm WF, Swanson EA, Clark R, et al. (2001) Cardiac ion channel expression and contractile function in mice with deletion of thyroid hormone receptor alpha or beta. *Endocrinology* 142: 544-550

Graf EM, Heubach JF, Ravens U (2001) The hyperpolarization-activated current I_f in ventricular myocytes of non-transgenic and β_2 -adrenoceptor overexpressing mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 364: 131-139

Graham FL, Smiley J. (1973) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456

Graham FL, van der Eb AJ (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52: 456

Halliwel JV, Adams PR (1982) Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res.* 250: 71-92

Hamill OP, Marty E, Neher E, Sakman 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

Herrmann S, Stieber J, Feil S, Feil R, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (2003) Pacemaker channel HCN4 is required for normal cardiac function in the mouse embryo. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmakol.* 367: R91

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

Horn R (2002) Coupled movements in voltage-gated ion channels. *J.Gen.Physiol.* 120: 449-453

Ingram SL, Williams JT (1996) Modulation of the hyperpolarization-activated current (I_h) by cyclic nucleotides in guinea-pig primary afferent neurons. *J.Physiol.* 492: 97-106

Ishii T, Takano M, Xie L, Noma A, Ohmori H (1999) Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J.Biol.Chem.* 274: 12835-12839

Ishii TM, Takano M, Ohmori H (2001) Determinants of activation kinetics in mammalian hyperpolarization-activated cation channels. *J.Physiol. (London)* 537: 93-100

Ishiura M, Hirose S, Uchida T, Hamada Y, Suzuki Y, Okada Y (1982) Phage particle-mediated gene transfer to cultured mammalian cells. *Mol.Cell.Biol.* 2: 607-616

- Janigro D, West GA, Nguyen TS, Winn HR (1994) Regulation of blood-brain barrier endothelial cells by nitric oxide. *Circ.Res.*75: 528-538
- Johnson, WG, Murphy M, Murphy WI, Bloom AD (1978) Recessive congenital cerebellar disorder in a genetic isolate: CPD Type VII?. *Neurology* 28: 351-352
- Khanna R, Myers MP, Lainé M, Papazian DM (2001) Glycosylation increases potassium channel stability and surface expression in mammalian cells. *J.Biol.Chem.* 276: 34028-34034
- Lamerdin JE, McCready PM, Dunn J, Skowronski E, et al. (1998) Sequence analysis of a 3.5 Mb contig in human 19p13.3 containing a serine protease gene cluster. *unpublished*
- Lämmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Leder P, Hansen JN, Konkel D, Leder A, Nishiola Y, Talkington (1980) Mouse globin gene system: a functional and evolutionary analysis. *Science* 209: 1336-1342
- Lu Z, Klem AM, Ramu Y (2001) Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature* 413: 809-813
- Ludwig A, Budde T, Stieber J, Moosmang S, Wahl C, Holthoff K, Langebartels A, Wotjak C, Munsch T, Zong X, Feil S, Feil R, Lancel M, Chien KR, Konnerth A, Pape HC, Biel M, Hofmann F (2003) Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *EMBO* 22 No.2: 216-224
- 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, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M (1998) A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393: 587-591
- 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 (9), 2323-2329
- Lüthi A, McCormick DA (1998) H-current: properties of a neuronal and network pacemaker. *Neuron* 21: 9-12
- Magee J (1999) Dendritic I_h normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons. *Nat.Neurosci.* 2: 508-514
- Mandel M, Higa A (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J.Mol.Biol.*53: 159-162

- McCormick D and Pape HC (1990) Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurons. *J.Physiol.* 432: 291-318
- Monteggia LM, Eisch AJ, Tang MD, Kaczmarek LK, Nestler EJ (2000) Cloning and localization of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel family in rat brain. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 81 : 129-139
- 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: 1646-1652
- Moroni A, Gorza L, Beltrame M, et al. (2001) Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current I_f . *J.Biol.Chem.* 276: 29233-29241
- Munsch T, Pape HC (1999) Modulation of the hyperpolarization-activated cation current of rat thalamic relay neurons by intracellular pH. *J.Physiol. (London)* 519: 493-504
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1: 841-845
- Noma A (1996) Ionic mechanisms of the cardiac pacemaker potential. *Jpn.Heart J.* 37: 673-682
- Nystuen A, Benke PJ, Merren J, Stone EM, Sheffield VC (1996) A cerebellar ataxia locus identified by DNA pooling to search for linkage disequilibrium in an isolated population from the Cayman Islands. *Hum.Mol.Genet.* 5: 525-531
- 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
- Pachucki J, Burmeister LA, Larsen PR (1999) Thyroid hormone regulates hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel (HCN2) mRNA in the rat heart. *Circ.Res.* 85: 498-503
- Pape HC (1996) Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu.Rev.Physiol.* 58: 299-327

- Petrecce K, Atanasiu R, Akhavan A, Shrier A (1999) N-linked glycosylation sites determine HERG channel surface membrane expression. *J.Physiol.* 515: 41-48
- Pfeifer A, Dostmann WRG, Sausbier M, Klatt P, Ruth P, Hofmann F (1999) cGMP-dependent protein kinases: Structure and function. *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.* 135: 105-150
- Plummer TH, Elder JH, Alexander S, Phelan AW, Tarentino AL (1984) Demonstration of peptide:N-glycosidase F activity in endo- β -N-acetylglucosaminidase F preparations. *J.Biol.Chem.* 259: 10700-10704
- Proenza C, Tran N, Angoli D, Zahynacz K, Balcar P, Accili EA (2002) Different roles for the cyclic nucleotide binding domain and amino terminus in assembly and expression of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channels. *J.Biol.Chem.* 277: 29634-29642
- Robinson RB, Siegelbaum SA (2003) Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu.Rev.Physiol.* 65: 29.1-29.28
- Rothberg BS, Shin KS, Phale PS, Yellen G (2002) Voltage-controlled gating at the intracellular entrance to a hyperpolarization-activated cation channel. *J.Gen.Physiol.* 119: 83-91
- Saiki K, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA (1988) A primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold spring Harbor Laboratory, Cold spring harbor, New York
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 74:5463-5467
- Santoro B, Chen S, Luthi A, Pavlidis P, Shumyatsky GP, et al. (2000) Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J.Neurosci.* 20: 5264-5275
- 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: 14815-14820

- Santoro B, Liu DT, 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
- Satler CA, Vesely MR, Duggal P, Ginsburg GS, Beggs AH (1998) Multiple different missense mutations in the pore region of HERG in patients with long QT syndrome. *Hum.Genet.* 102: 265-272
- Schulze-Bahr E, Neu A, Friedrich P, Kaupp UB, Pongs O, Isbrandt D (2001) A mutation in the cardiac pacemaker channel gene causes sinus node dysfunction. *Circulation.* 104: II-192 (Abstr.)
- 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.USA* 96: 9391-9396
- Shabb JB, Ng L, Corbin JD (1990) One amino acid change produces a high affinity cGMP-binding site in cAMP-dependent protein kinase. *J.Biol.Chem.* 265: 16031-16034
- Shi W, Wymore R, Yu H (1999) Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ.Res.* 85: E1-E6
- Shin KS, Rothberg BS, Yellen G (2001) Blocker state dependence and trapping in hyperpolarization-activated cation channels: evidence for an intracellular activation gate. *J.Gen.Physiol.* 117: 91-101
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.*98: 503-517
- Southern PJ, Berg P (1982) Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J.Mol.Appl.Gen.*1: 327-341
- Stevens DR, Seifert R, Bufe B, Müller F, Kremmer E, Gauss R, Meyerhof W, Kaupp UB, Lindemann B (2001) Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature* 413: 631-635
- Tibbs GR, Liu DT, Leybold BG, Siegelbaum SA (1998) 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
- Tran N, Proenza C, Macri V, Petigara F, Sloan E, Samler S, Accili EA (2002) A conserved domain in the N-terminus important for assembly and functional expression of pacemaker channels. *J.Biol.Chem.* 277: 43588-43592

- Tyrell L, Renganathan M, Dib-Hajj SD, Waxman SG (2001) Glycosylation alters steady state inactivation of sodium channel Nav1.9/NaN in dorsal root ganglion neurons and is developmentally regulated. *J Neurosci* 21: 9629-9637
- Ulens C, Tygat J (2001) Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels. *J.Biol.Chem.* 276: 6069-6072
- 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
- Viscomi C, Altomare C, Bucchi A, Camatini E, Baruscotti M, Moroni A, DiFrancesco D (2001) C terminus-mediated control of voltage and cAMP gating of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J.Biol.Chem.* 276: 29930-29934
- Wainger BJ, DeGennaro M, Santoro B, Siegelbaum SA, Tibbs GR (2001) Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature* 411: 805-810
- Wang J, Chen S, Siegelbaum SA (2001) Regulation of hyperpolarization-activated HCN channel gating and cAMP modulation due to interactions of COOH terminus and core transmembrane. *J.Gen.Physiol.* 118: 237-250
- Weber IT, Steitz TA (1987) Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5Å. *J.Mol.Biol.* 198: 311-326
- Weiss B, Jaquemin-Sablon A, Live TR, Fareed GC, Richardson CC (1968) Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J.Biol.Chem.* 234: 4543-4555
- Wilson FH, Disse-Nicodéme S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, Gunel M, Milford DV, Lipkin GW, Achard JM, Feely MP, Dussol B, Berland Y, Unwin RJ, Mayan H, Simon DB, Farfel Z, Jeunemaitre X, Lifton RP (2001) Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 293: 1107-1112
- Wollmuth LP, Hille B (1992) Ionic selectivity of I_h channels of rod photoreceptors in tiger salamanders. *J.Gen.Physiol.* 100: 749-765
- Xue T, Marbán E, Li RA (2002) Dominant-negative suppression of HCN1- and HCN2-encoded pacemaker currents by an engineered HCN1 construct. *Circ.Res* 90: 1267-1273
- Yanagida H, Inoue R, Tanaka M, Ito (2000) Temperature-sensitive gating of cation current in guinea pig ileal muscle activated by hyperpolarization. *Am.J.Physiol.Cell.Physiol.* 278: C40-C48

Yanagihara K, Irisawa H (1980) Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflügers Arch.* 388: 11-19

Yellen G (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 419: 35-42

Yu H, Wu J, Potapova I, Wymore RT, Holmes B, Zuckerman J, Pan Z, Wang H, Shi W, Robinson RB, El-Maghrabi MR, Benjamin W, Dixon J, McKinnon D, Cohen IS, Wymore R (2001) MinK-Related Peptide 1. A β subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ.Res.* 88: 84e-87e

Zhou Y, Morais-Cabral JH, Kaufmann A, MacKinnon R (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K^+ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414: 43-48

Zong X, Stieber J, Ludwig A, Hofmann F, Biel M (2001) A single histidine residue determines the pH sensitivity of the pacemaker channel HCN2. *J.Biol.Chem.* 276: 6313-6319

Zong X, Zucker H, Hofmann F, Biel M (1998) Three amino acids in the C-linker are major determinants of gating in cyclic nucleotide-gated channels. *EMBO J.* 17: 353-362

7.2 Eigene Veröffentlichungen

Much B, Schneider A, Zong X, Wahl C, Ludwig A, Biel M (2003) Analysis of subunit assembly and glycosylation of HCN pacemaker channels in vivo and in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmakol. [Suppl.]* 367: R84, 321

Much B, Schneider A, Zong X, Wahl C, Baumann L, Ludwig A, Biel M (2003) Functional analysis of HCN channel heteromerization and glycosylation. *Submitted*

Stieber J, Thomer A, Much B, Schneider A, Biel M, Hofmann F (2003) Molecular basis for the different activation kinetics of the pacemaker channels HCN2 and HCN4. *Submitted*

8 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Barbara Anna Maria Much
 Geburtsdatum: 09. Januar 1975
 Geburtsort München
 Familienstand: Ledig
 Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung

1981 - 1985 St. Josef Grund- und Teilhauptschule, Straubing
 1985 - 1994 Ludwigsgymnasium, Straubing

Berufsausbildung

November 1994 - Oktober 1998 Studium der Pharmazie an der Universität Regensburg.
 Oktober 1998 Zweites Staatsexamen
 Dezember 1999 Drittes Staatsexamen
 Dezember 1999 Approbation als Apothekerin

Praktika

März 1995 vierwöchige Famulatur in der Einhorn-Apotheke, Straubing
 August 1995 vierwöchige Famulatur in der Einhorn-Apotheke, Straubing
 März 1996 vierwöchiges Praktikum in der Apotheke des St. Elisabeth-Klinikums, Straubing
 November 1998 – April 1999 Pharmaziepraktikum in der Albertus-Magnus-Apotheke, Lappersdorf
 Mai 1999 – Oktober 1999 Pharmaziepraktikum in der Apotheke des Universitätsklinikums Regensburg

Berufserfahrung

Januar 2000 – Februar 2000 Praktikum an der University of Florida und dem Shands Hospital in Gainesville/ USA mit dem Schwerpunkt Arzneimittelinformation
 März 2002 – August 2002 Dozentin für Pharmakologie an der Staatlichen Berufsfachschule für Krankenpflege des Klinikums Großhadern der Universität München
 März 2000, noch andauernd Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl Pharmakologie für Naturwissenschaften der LMU München mit dem Ziel der Promotion