

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



Rolle der cAMP-Modulation des HCN2-Kanals in der  
Signalverarbeitung im *Nucleus ventrobasalis* und *Corpus geniculatum laterale  
pars dorsalis* des Thalamus

Henrik Matthias Hülle

aus

Dortmund

2020

## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Christian Wahl-Schott betreut.

## Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 06.05.2020

---

Henrik Matthias Hülle

Dissertation eingereicht am 17.06.2020

1. Gutachter Prof. Dr. Christian Wahl-Schott

2. Gutachter Prof. Dr. Martin Biel

Mündliche Prüfung am 22.07.2020

*Meinem Vater*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
3.1	<b>Chemikalien, Lösungen, Puffer .....</b>	<b>21</b>
3.2	<b>Verwendete Mauslinie .....</b>	<b>21</b>
3.3	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>22</b>
3.3.1	Genotypisierung .....	22
3.3.2	Agarose-Gelelektrophorese .....	23
3.4	<b>Proteinanalytik .....</b>	<b>23</b>
3.4.1	Immunhistochemie .....	23
3.4.2	Western-Blot-Analyse .....	24
3.5	<b>Präparation von Hirnschnitten .....</b>	<b>24</b>
3.6	<b>Elektrophysiologie an Hirnschnitten .....</b>	<b>26</b>
3.6.1	Patch-Clamp-Technik .....	26
3.6.2	Elektroden und Kapillaren .....	26
3.6.3	Lösungen .....	26
3.6.4	Messprotokolle .....	26
3.7	<b>Statistische Analyse .....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
4.1	<b>Einfluss der EA-Mutation auf die Gehirnmorphologie .....</b>	<b>30</b>
4.2	<b>Expression der HCN-Isoformen im Thalamus der HCN2EA-Maus .....</b>	<b>30</b>
4.2.1	Lokalisation der HCN2- und HCN4-Isoformen im Thalamus .....	30
4.2.2	Western-Blot-Analyse .....	31
4.3	<b>Elektrophysiologische Charakterisierung des HCN2EA-Kanals im VB .....</b>	<b>32</b>

4.3.1	Einfluss der EA-Mutationen auf die grundlegenden Eigenschaften des $I_h$ in thalamokortikalen Neuronen des VB .....	32
4.3.2	Einfluss der reduzierten cAMP-Sensitivität des HCN2-Kanals auf das Ruhemembranpotential thalamokortikaler Neurone des VB .....	35
4.3.3	Veränderte Feuereigenschaften thalamokortikaler Neurone im VB der HCN2EA-Maus	36
4.3.4	Einfluss der EA-Mutation auf den <i>voltage sag</i> in thalamokortikalen Neuronen des VB	38
<b>4.4</b>	<b>Elektrophysiologische Charakterisierung des HCN2EA-Kanals im dLGN .....</b>	<b>39</b>
4.4.1	Einfluss der EA-Mutationen auf die grundlegenden Eigenschaften des $I_h$ in thalamokortikalen Neuronen des dLGN .....	39
4.4.2	Einfluss der reduzierten cAMP-Sensitivität des HCN2-Kanals auf das Ruhemembranpotential in thalamokortikalen Neuronen des dLGN .....	40
4.4.3	Veränderte Feuereigenschaften thalamokortikaler Neurone im dLGN der HCN2EA-Maus .....	41
4.4.4	Einfluss der EA-Mutation auf den <i>voltage sag</i> in thalamokortikalen Neuronen des dLGN	43
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>63</b>
<b>10</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>66</b>
<b>11</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>68</b>
<b>12</b>	<b>Puffer und Lösungen .....</b>	<b>69</b>
<b>13</b>	<b>Datentabellen.....</b>	<b>75</b>
<b>14</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>78</b>
<b>15</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>79</b>

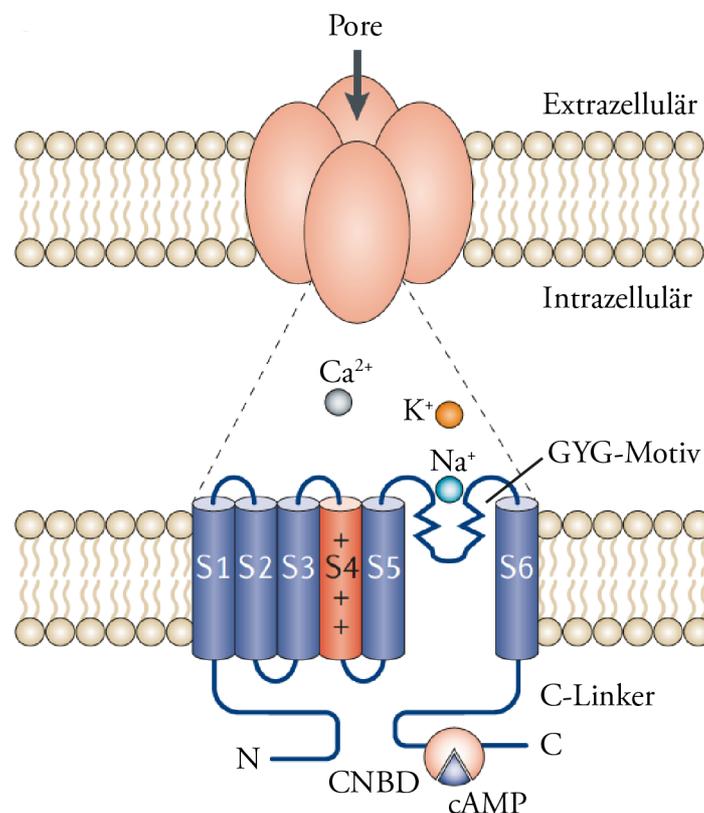


# 1 Einleitung

Das menschliche Gehirn ist eine der komplexesten existierenden Strukturen und die Basis aller kognitiven Fähigkeiten des *Homo sapiens*. Auch wenn künstliche Intelligenz mittlerweile in der Lage ist Brettspiele wie Schach oder Go zu erlernen und Menschen in diesen Spielen zu besiegen, bleiben die vielschichtigen Verhaltensmuster und die Kreativität des Menschen bisher einzigartig. Die physiologische Grundlage dieser Prozesse stellt die elektrische Signalübertragung des Gehirns dar, die auf Veränderungen des neuronalen Membranpotentials basiert. Diese Potentialänderungen werden durch die Aktivierung oder Deaktivierung von gesteuerten Ionenkanälen ermöglicht, eine Klasse integraler Membranproteine, die, abhängig von elektrischen, chemischen oder mechanischen Stimuli, die selektive Membranpermeabilität für spezifische Ionen beeinflusst. Ein Beispiel für eine solche Familie von Ionenkanälen sind die *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels* (HCN-Kanäle) (Biel et al. 2009).

HCN-Kanäle sind Vertreter der spannungsgesteuerten Porenschleifen-Kationenkanäle und kommen in Säugetieren in vier Isoformen (HCN1-HCN4) mit unterschiedlichen Eigenschaften vor. Jede Isoform besteht aus sechs transmembranären  $\alpha$ -Helices (S1-S6) und je einem intrazellulär lokalisierten N- und C-Terminus (Abbildung 1). Zwischen den Transmembransegmenten S5 und S6 befindet sich die Porenschleife, die den Selektivitätsfilter mit der Aminosäuresequenz Glycin – Tyrosin – Glycin (GYG) beinhaltet. Dieses Motiv kommt auch in selektiven Kaliumkanälen vor (Doyle et al. 1998; Zhou et al. 2001; Lee and MacKinnon 2017). Im Unterschied zu diesen leiten HCN-Kanäle einen nicht-selektiven Kationenstrom, der von Natrium- und Kaliumionen getragen wird. Diese Permeabilität lässt sich durch eine veränderte Ausrichtung der Tyrosin-Seitenkette um  $180^\circ$  erklären, die die Geometrie des Filters maßgeblich beeinflusst. In selektiven Kaliumkanälen bilden die Aminosäureketten des Selektivitätsfilters vier Bindungsstellen für Kaliumionen. In HCN-Kanälen führt die Konformationsänderung der Tyrosin-Seitenkette dazu, dass zwei dieser Bindungsstellen wegfallen, weil die Sauerstoffatome der Carbonylgruppen der Hauptkette nicht mehr in den Filter gerichtet sind. Der Filter ist somit auch für Natriumionen permeabel (Lee and MacKinnon 2017). Der Spannungssensor ist in den Transmembranhelices S1-S4 lokalisiert und durch neun positiv geladene Arginin- und Lysinreste charakterisiert, die im Abstand von je drei Aminosäuren aufeinanderfolgen (Chen et al. 2000). Im Gegensatz zu den meisten anderen spannungsgesteuerten Ionenkanälen werden HCN-Kanäle durch Membranhyperpolarisation aktiviert. Der durch sie geleitete Strom wird deshalb auch als  $I_h$  (*hyperpolarization*) bezeichnet (Robinson and Siegelbaum 2003). Der C-Terminus beinhaltet die

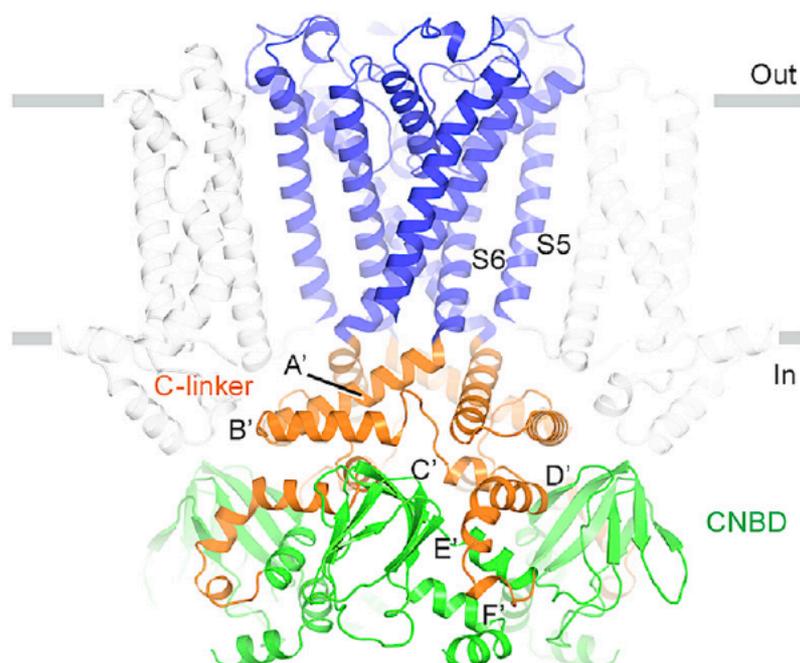
*cyclic nucleotide-binding domain* (CNBD), die über einen 80 Aminosäure langen C-Linker, der sechs  $\alpha$ -Helices (A'-F') beinhaltet, mit dem Transmembransegment S6 verbunden ist (Postea and Biel 2011; Lolicato et al. 2011; Zagotta et al. 2003). Die Struktur der CNBD besteht aus einer initialen  $\alpha$ -Helix (A), gefolgt von acht antiparallel ausgerichteten  $\beta$ -Faltblättern ( $\beta$ 1- $\beta$ 8) und zwei weiteren  $\alpha$ -Helices, einer kurzen (B) und einer langen Helix (C). Sie bildet eine Bindungstasche in der cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) oder mit niedrigerer Bindungsaffinität auch cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) mit dem HCN-Kanal interagieren können und so dessen spannungsabhängige Aktivierung zu positiveren Werten verschiebt. In HCN2-Kanälen sind sieben Aminosäuren, darunter R591 und T592, für diese Interaktion notwendig (Zhou and Siegelbaum 2007).



**Abbildung 1: Schema der transmembranen Topologie des HCN-Kanals.** Die Untereinheiten des tetrameren Kanals (obere Abbildung) bestehen aus je sechs transmembranen Helices (S1-S6). Der C-Terminus jeder Untereinheit besitzt eine *cyclic nucleotide binding domain* (CNBD), die über einen C-Linker mit der sechsten Transmembranhelix verbunden ist (modifiziert nach Postea and Biel 2011).

Um den dahinterstehenden Mechanismus zu verstehen, sind hochauflösende Strukturmodelle unabdingbar. Ein erster Schritt war die Bestimmung der Kristallstruktur eines C-Terminus

Fragments, das den C-Linker und die CNBD des HCN2-Kanals in cAMP gebundener Form beinhaltet (Zagotta et al. 2003). Detailliertere Einsichten in den Mechanismus der cAMP-Modulation ergab die vollständige Aufklärung der HCN-Struktur mit einer Auflösung von 3,5 Å (Abbildung 2) (Lee and MacKinnon 2017). Das Binden von cAMP in der Bindungstasche führt zu Konformationsänderungen in der CNBD. Dabei kommt es zu einer Annäherung der  $\alpha$ -Helices A, B und C in Richtung der  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Diese lokale Konformationsänderung führt zu einer rotationsartigen Bewegung des C-Linkers, die eine Verlagerung des porenbildenden S6-Segments bewirkt. Diese Verlagerung ist nicht ausreichend, um den Kanal zu öffnen, aber erleichtert diesen Vorgang im Fall einer Membranhyperpolarisation, da sie in Richtung der Porenöffnung stattfindet.



**Abbildung 2: Struktur des HCN1-Tetramers.** Hervorgehoben sind die die Pore bildenden Transmembranhelices S5 und S6 (blau), der C-Linker mit den in ihm vorkommenden  $\alpha$ -Helices A'-F' (orange) und die CNBD (grün). Die Auflösung beträgt 3,5 Å (Lee and MacKinnon, 2017).

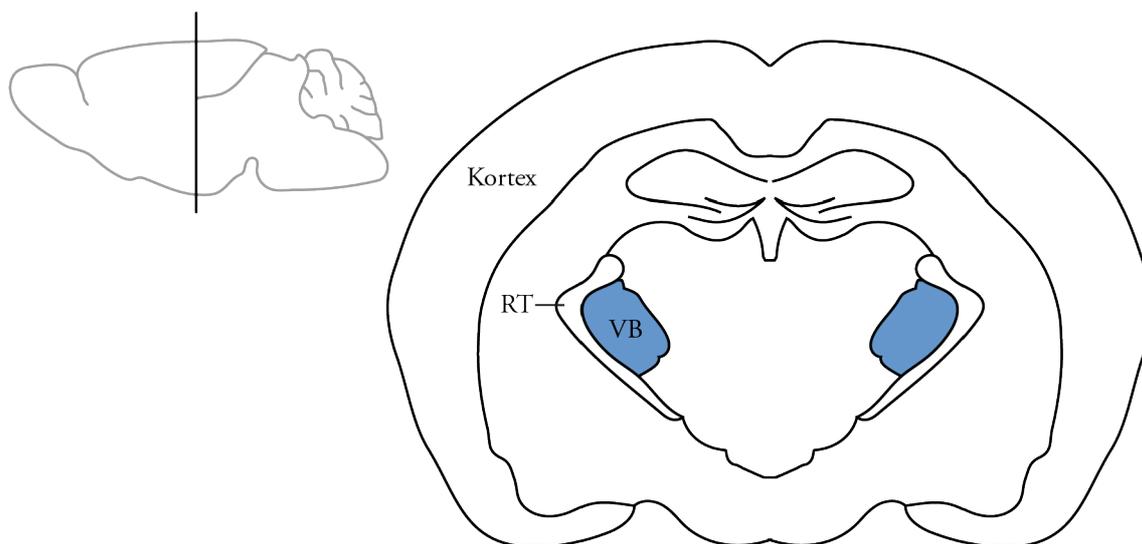
Generell wird die Steuerung des Öffnungszustandes von Ionenkanälen als *gating* bezeichnet. Da dieser Prozess bei HCN-Kanälen, wie oben erklärt, sowohl durch Hyperpolarisation als auch durch cAMP-Bindung determiniert wird, spricht man von *dual gating*. Dabei ist zu beachten, dass die Hyperpolarisation die notwendige Komponente zur Öffnung des Kanals ist. Die Bindung von

cAMP alleine ist nicht ausreichend, es erniedrigt aber die Schwelle der benötigten Membranhyperpolarisation (DiFrancesco and Tortora 1991).

Die einzelnen Isoformen der HCN-Kanäle bilden sowohl als Homo- als auch als Heterotetramer und unterscheiden sich bezüglich ihrer cAMP-Sensitivität, das heißt der Empfindlichkeit mit der sie cAMP binden (Much et al. 2003). Die cAMP-Sensitivität hängt davon ab mit welcher Affinität (Maß für die Wahrscheinlichkeit für die Bindung zwischen zwei Molekülen) der Kanal seinen Liganden bindet. Die Bindung von cAMP an der CNBD verändert (moduliert) die Leitfähigkeit der HCN-Kanäle. HCN2 und HCN4 zeigen die stärkste aus der cAMP-Bindung resultierende Modulation (Ludwig et al. 1999). Sowohl HCN1 als auch HCN3 zeigen eine ähnlich hohe cAMP-Affinität wie HCN2 und HCN4. Das der cAMP-Bindung nachgeschaltete *gating* hat aber eine im Vergleich geringere Effizienz (HCN1) oder ist nicht beeinflusst (HCN3). Weitere Unterschiede zwischen den Isoformen zeigen sich in den Aktivierungskinetiken. HCN1 ist der sich am schnellsten öffnende HCN-Kanal, gefolgt von HCN2 und HCN3. HCN4 ist die langsamste Isoform (Stieber et al. 2005). Im Vergleich zu anderen Strömen ist der  $I_h$  mit Öffnungskinetiken von mehreren hundert Millisekunden bis zu Sekunden langsam aktivierend. Die gemessenen Werte für einzelne Parameter der HCN-Kanäle schwanken teilweise stark in unterschiedlichen Publikationen. Das liegt daran, dass sich die Konditionen der Experimente, wie die verwendeten Lösungen oder Expressionssysteme, stark auf die gemessenen Eigenschaften dieser Ionenkanäle auswirken (Biel et al. 2009; Ludwig et al. 1999; Viscomi et al. 2001; Wainger et al. 2001). Alle vier Mitglieder der HCN-Familie werden im Gehirn nur mit geringer Überlappung exprimiert, was darauf hinweist, dass jeder HCN-Subtyp zu spezifischen Funktionen in einer nicht redundanten Art beiträgt (Notomi and Shigemoto 2004; Moosmang et al. 1999).

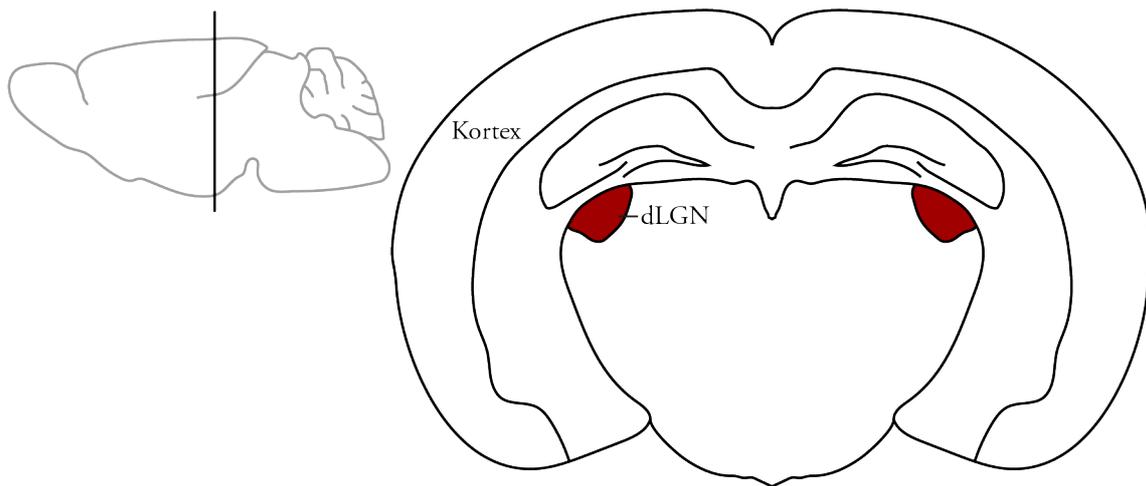
Bisher konnte eine Beteiligung des  $I_h$  an der Regulation zahlreicher Körperfunktionen nachgewiesen werden. Dazu zählen unterschiedliche Formen von Lernen und Gedächtnis (Maroso et al. 2016; Shah 2014; Nolan et al. 2003; Wang et al. 2007), Schlaf und Wachsein (McCormick and Bal 1997) oder Schmerz (Emery et al. 2011). Seine biophysikalischen Eigenschaften bestimmen die physiologischen Rollen des  $I_h$ , was zum Beispiel an der Determination des Ruhemembranpotentials (RMP) deutlich wird. HCN-Kanäle werden bei Membranpotentialen negativer als - 50 mV aktiviert. Da das RMP vieler Neurone negativere Werte erreicht, ist ein Teil der dort exprimierten HCN-Kanälen geöffnet (He et al. 2014). Aufgrund der relativen Lage des Umkehrpotential des Kanals (etwa bei - 20 mV) zum RMP, ist der  $I_h$  unter diesen Bedingungen ein einwärtsgerichteter depolarisierender Strom. Je positiver das Membranpotential dadurch wird, desto weniger HCN-Kanäle sind geöffnet, weshalb sich wieder

das ursprüngliche RMP einstellt (Nolan et al. 2007; Lupica et al. 2001). Bei starken hyperpolarisierenden Inputs führt diese Eigenschaft auch zum sogenannten *voltage sag*, der ein Charakteristikum von Neuronen ist, die HCN-Kanäle exprimieren. Die Hyperpolarisation aktiviert den  $I_h$ , der die Membran wieder depolarisiert und das Membranpotential wieder zum Ausgangspunkt führt (Pape 1996).



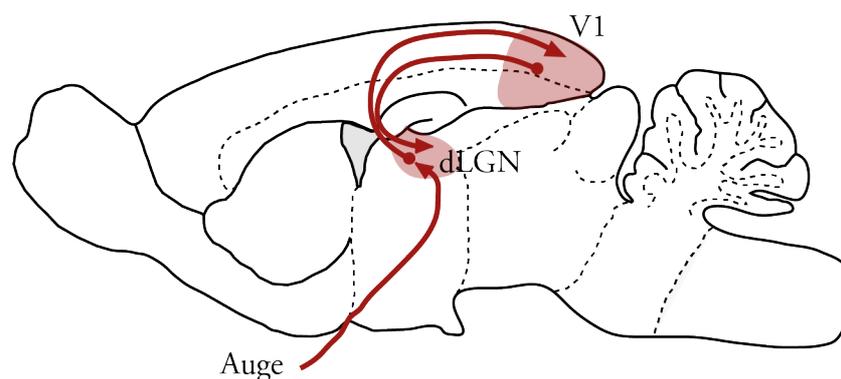
**Abbildung 3: Schematische Darstellung der anatomischen Lokalisation des ventrobasalen Komplex (VB) im Gehirn einer Maus.** Neben dem blau gefärbten VB sind der *Nucleus reticularis* (RT) und der Kortex gekennzeichnet. Die Lokalisation des coronalen Schnittes im Gehirn wird mit Hilfe der Linie durch die sagittale Darstellung des gesamten Mäusegehirns verdeutlicht (oben links).

Eine ausführlich charakterisierte Rolle des  $I_h$  ist die Beteiligung an der Entstehung thalamischer Oszillationen, die mit Schlaf und Wachzustand korrelieren. Der Thalamus kann in unterschiedliche Nuclei unterteilt werden. Diese unterscheiden sich bezüglich ihrer spezifischen Inputs und Outputs aus anderen Hirnregionen und den damit verbundenen funktionellen Eigenschaften. Der Nucleus, der hauptsächlich zur Erforschung der Rolle der TC-Neurone in Epilepsie genutzt wird, ist der ventrobasale Komplex (Abbildung 3). Der ventrobasale Komplex (VB) besteht aus dem ventralen posteromedialen Nucleus (VPM) und dem ventralen posterolateralen Nucleus (VPL) und erhält unter anderem somatosensorische Inputs über den spinothalamischen Trakt (Druck, Nozizeption und Temperatur) und das Hinterstrang-Lemniskal System (taktile Sensorik). Außerdem projizieren Neurone des Hirnstamms, genauer aus den Trigemuskerngebieten in den VB. Er ist Teil des thalamokortikalen Netzwerks und in direkter Nachbarschaft zum *Nucleus reticularis* (RT) lokalisiert, mit dem er reziprok verbunden ist. Ebenfalls reziprok projiziert er in den primären somatosensorischen Kortex (Lopez-Bendito and Molnar 2003).



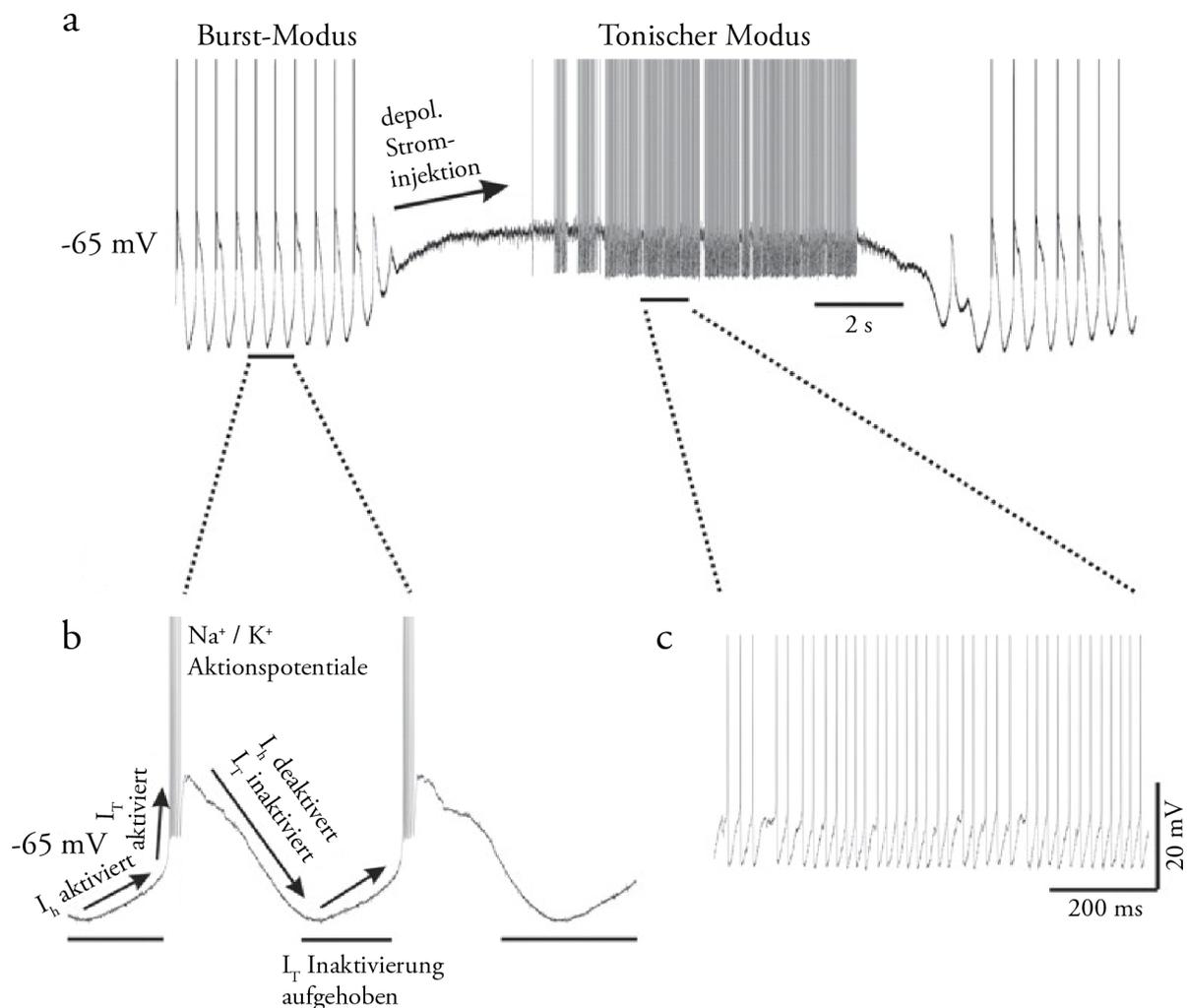
**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der anatomischen Lokalisation des dorsalen *Corpus geniculatum laterale* (dLGN) im Gehirn einer Maus. Neben dem rot gefärbten dLGN sind der *Nucleus reticularis* (RT) und der Kortex gekennzeichnet. Die Lokalisation des coronalen Schnittes im Gehirn wird mit Hilfe der Linie durch die sagittale Darstellung des gesamten Mäusegehirns verdeutlicht (oben links).

Neben somatosensorischen Signalen passieren auch auditive und visuelle Informationen den Thalamus. Der thalamische Nukleus, der mit der Verarbeitung visueller Reize in Verbindung gebracht wird, ist der dorsale *Corpus geniculatum laterale* (dLGN; Abbildung 4). Visuelle Informationen werden vom Auge über den optischen Trakt zum dLGN geleitet. Dabei oszillieren retinale Ganglienzellen bei Frequenzen von 61-114 Hz und synchronisieren ihr Feuermuster mit dem dLGN (Koepsell et al. 2009; Neuenschwander and Singer 1996). Das Netzwerk, das bei der Verarbeitung visueller Signale beteiligt ist, nennt man die visuelle Bahn (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der primären visuellen Bahn in der Maus. Visuelle Informationen werden vom Auge über den optischen Trakt zum dLGN geleitet. Dieser fungiert als Relais und ist reziprok mit dem visuellen Kortex (V1) verbunden (modifiziert nach Hammelmann et al. 2019).

Neben dem Input aus den retinalen Ganglienzellen sind die Relaisneurone des dLGN mit dem primären visuellen Kortex (V1) reziprok verbunden.

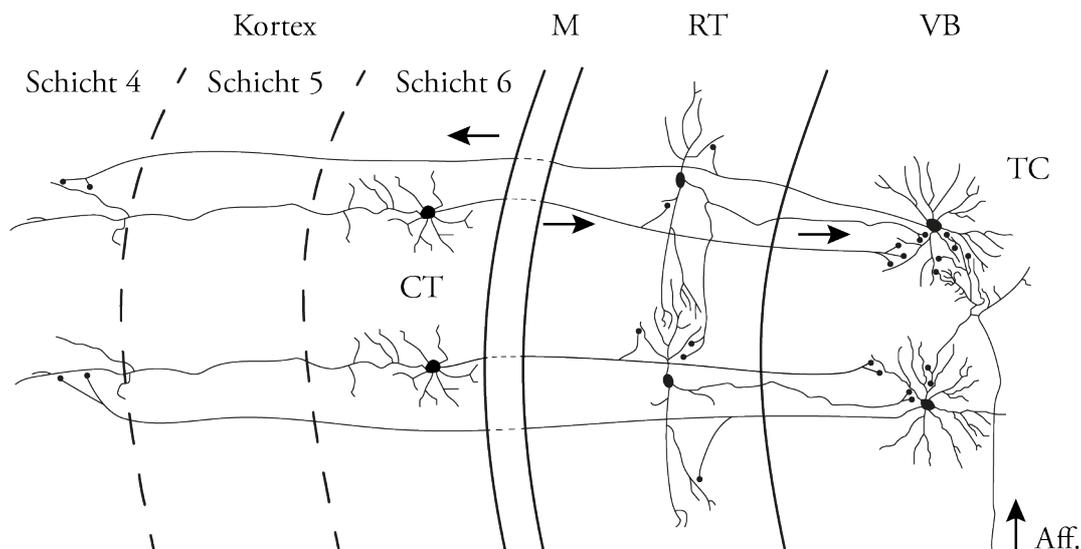


**Abbildung 6: Die zwei Feuermodi thalamokortikaler Neurone.** a) Neurone des Thalamus feuern im *Burst-Modus*. Nach Depolarisation des Membranpotentials wechselt der Feuermodus in tonisches Feuern. Ohne Depolarisation kann das Neuron in den ursprünglichen *Burst-Modus* zurückkehren. b) Vergrößerung des *Burst-Modus* mit den zugehörigen Strömen. c) Vergrößerung des tonischen Modus (modifiziert nach Biel et al. 2009).

Die zellulären Grundlagen thalamischer Oszillationen wurden ausgiebig auf *in vitro* Ebene in thalamokortikalen (TC) Neuronen untersucht (Jahnsen and Llinás 1984; Llinas and Jahnsen 1982; McCormick and Pape 1990b; Bal and McCormick 1996). TC-Neurone sind in der Lage in zwei unterschiedlichen Modi zu feuern, dem tonischen Modus und dem *Burst-Modus* (Abbildung 6 a). Feuern Neurone im tonischen Modus zeichnet sich dies durch einzelne Aktionspotentiale aus,

deren Frequenz mit steigender Depolarisation zunimmt (Abbildung 6 c). Dieser Modus wird auch Transmissionsmodus genannt und mit dem Wachzustand und REM-Schlafphasen in Verbindung gebracht, da in ihm die Weiterleitung sensorischer Informationen durch den Thalamus zum Kortex gewährleistet ist (McCormick and Bal 1997; Steriade, McCormick, and Sejnowski 1993).

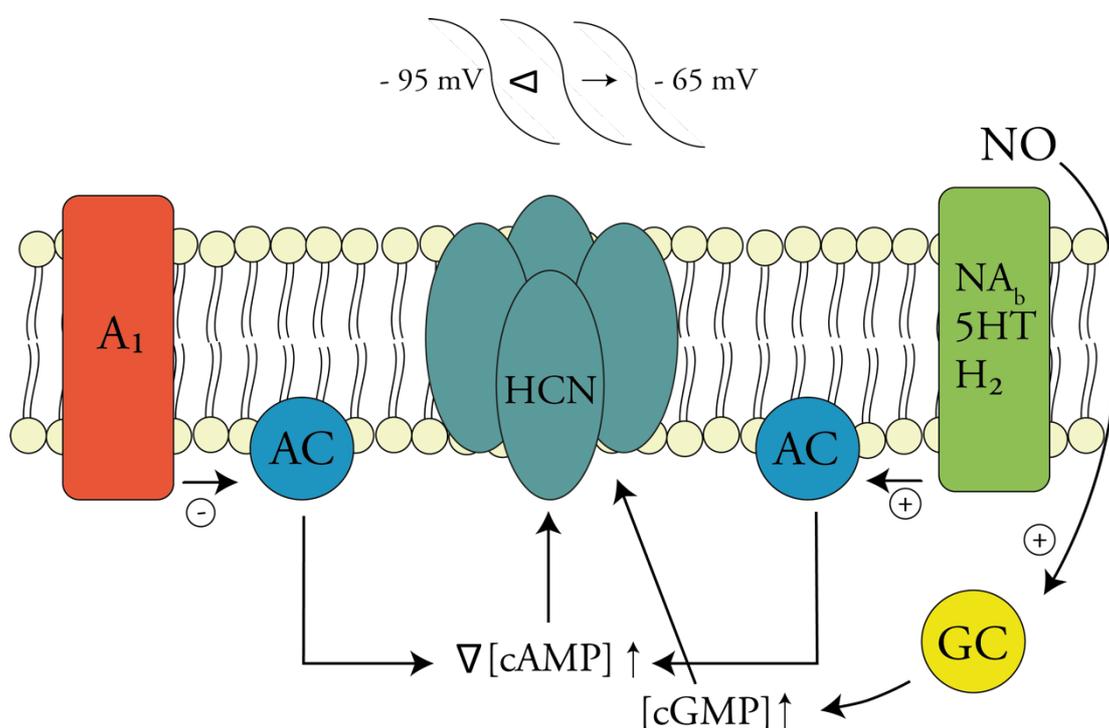
Während des Non-REM Schlafs feuern TC-Neurone im *Burst*-Modus (Pape et al. 2005). Die Entstehung eines *Bursts* hängt von der Interaktion des  $I_h$  und des Stroms des T-Typ Kalziumkanals ( $I_T$ ) ab (Abbildung 6 b). Der  $I_h$  depolarisiert das Membranpotential und aktiviert dadurch den  $I_T$ , der das Membranpotential durch einen Kalzium getriebenen *Spike*, auch LTS (*low threshold spike*) genannt, weiter depolarisiert. Dieser mehrere Millisekunden andauernde Anstieg des Membranpotentials führt zu der hochfrequenten Salvenentladung von Natrium getriebenen Aktionspotentialen ( $> 100$  MHz). Die Dauer des *Bursts* hängt von dem Zeitverlauf der Inaktivierung des T-Typ Kanals ab. Darauf folgt, begründet durch die Deaktivierung des  $I_h$  durch das stark depolarisierte Membranpotential, ein hyperpolarisierender *overshoot*. Dieser aktiviert wieder die HCN-Kanäle und der Mechanismus kann sich wiederholen (McCormick and Bal 1997). Da der  $I_h$  den Vorgang initiiert, wird er auch als Schrittmacher (*pacemaker*) bezeichnet (Budde et al. 2005; Pape 1996). Dieser Zyklus kann sich ohne afferenten Input vollziehen und bildet die Grundlage für die Einzelzellozillation der TC-Neurone. Sie treten ab einer Membranhyperpolarisation von etwa  $-80$  mV auf und sind charakterisiert durch, mit einer Frequenz von 1-2 Hz periodisch auftretende, LTSs. Die Signalweiterleitung sensorischer Informationen über den Thalamus zum Kortex ist im *Burst*-Modus unterbrochen (Steriade 2003).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des thalamokortikalen Netzwerks.** Gezeigt werden die drei Hirnregionen, die dieses Netzwerk bilden (die Schichten 4, 5 und 6 des Kortex, der *Nucleus reticularis* (RT) und der ventrobasale Komplex (VB)), sowie die der jeweiligen Region angehörigen Neurone und ihre Verschaltung (TC: Thalamokortikale Neurone; CT: Kortikothalamische Neurone). Die Pfeile deuten die Richtung des Informationsflusses zwischen den Neuronen an. Afferente Input (Aff.) aus anderen Hirnregionen beeinflusst das thalamokortikale Netzwerk zusätzlich. Zwischen Kortex und RT liegt das Marklager (M).

TC-Neurone sind Teil eines thalamokortikalen Netzwerks, das aus thalamischen Relaiskernen, bestimmten Schichten des Kortex und dem *Nucleus reticularis* (RT) besteht (Abbildung 7). Sie projizieren divergent (ein TC-Neuron bildet Synapsen mit mehreren RT-Neuronen) und konvergent (unterschiedliche TC-Neurone bilden Synapsen mit einem RT-Neurone) zu RT- und CT-Neuronen. Umgekehrt projizieren RT- und CT-Neurone ebenfalls divergent und konvergent auf TC-Neuronen. Während des Schlafes generiert der Kortex langsame (*slow*) Oszillationen mit Frequenzen zwischen 0,3–1 Hz. Dabei feuern CT-Neurone exzitatorischen Output in den RT und VB und führen aufgrund der Divergenz und Konvergenz zu einer Synchronisation der intrinsisch oszillierenden TC-Neurone. Die so entstehende globale delta Oszillation mit Frequenzen zwischen 0,5–4 Hz kann über ein EEG aufgezeichnet werden und ist ein Kennzeichen der späten Phase des *slow wave* Schlafs (Steriade, McCormick, and Sejnowski 1993). Eine weitere Oszillation, die durch das thalamokortikale Netzwerk generiert wird, ist die Schlafspindel-Oszillation (7–14 Hz, auch *spindle waves* oder sigma Oszillation genannt). Schlafspindeln dauern 1–3 s und sind jeweils durch eine Refraktärzeit von 5–20 s voneinander getrennt sind (Contreras et al. 1997; Kim, Bal, and McCormick 1995; Fogerson and Huguenard 2016). Ihr Name ist begründet durch die an- und absteigende Form der EEG-Spur, die wie eine Spindel aussieht. Sie treten vor allem in den frühen

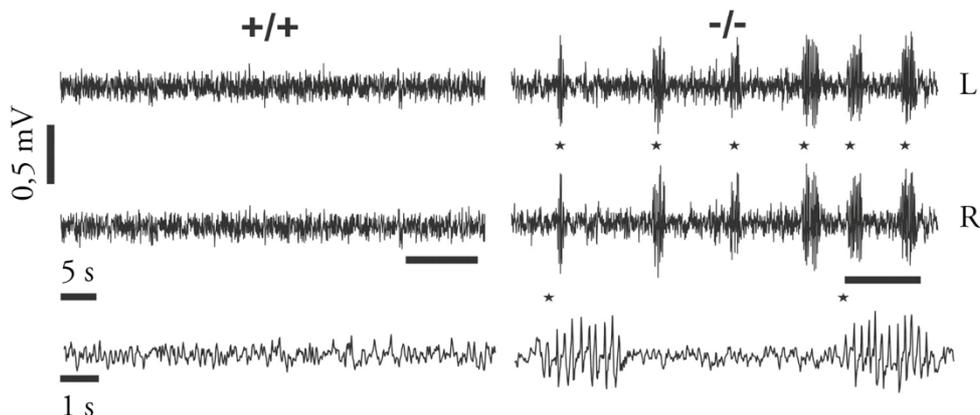
Perioden des *slow wave* Schlafs auf und beruhen auf synaptischen Interaktionen der einzelnen Bestandteile des thalamokortikalen Netzwerks. Retikuläre Neurone sind GABAerg und projizieren sowohl zu benachbarten retikulären Neuronen als auch zu TC-Neuronen. Während den Schlafspindeloszillationen kommt es durch die retikulären Neurone zu wiederkehrenden inhibitorischen postsynaptischen Potentialen (IPSP), die das Membranpotential der TC-Neurone hyperpolarisieren und zur Erholung von der Inaktivierung des  $I_T$  führen. Gleichzeitig wird der  $I_h$  aktiviert und *Bursts* in den TC-Neuronen initiiert (Pape 1996; von Krosigk, Bal, and McCormick 1993). Diese *Bursts* führen durch die reziproke Vernetzung zwischen den TC-Neuronen und retikulären Neuronen zu exzitatorischen postsynaptischen Potentialen (EPSP) an den Membranen der retikulären Neurone und unterstützt deren rhythmisches Feuern. Die TC-Neurone projizieren außerdem in die vierte Schicht des Kortex; zu den Dendriten, der in der sechsten Schicht lokalisierten kortikothalamischen (CT) Neurone. Diese innervieren sowohl die retikulären Zellen als auch die TC-Neurone (Jones 2001). Der Aufbau des thalamokortikalen Netzwerks verdeutlicht, dass Informationen den Thalamus passieren müssen, um zum Kortex zu gelangen. Er ist die erste Station an der diese Signale geblockt und damit prozessiert werden können (Steriade, McCormick, and Sejnowski 1993). Deshalb wird der Thalamus oft als „Tor zum Bewusstsein“ bezeichnet.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung unterschiedlicher Einflüsse durch Neurotransmitter auf den  $I_h$ .** Rezeptoren, die inhibierend (-, Adenosinrezeptor A1) oder stimulierend (+, Beta-Adrenorezeptor ( $NA_b$ ), Serotoninrezeptor (5HT), Histamin  $H_2$  Rezeptor) auf die Adenylatzyklase (AC) wirken, führen

durch eine veränderte intrazelluläre cAMP-Konzentration zu einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit des  $I_h$  zu negativeren beziehungsweise positiveren Werten. Stickstoffmonoxid (NO) beeinflusst die Spannungsabhängigkeit des  $I_h$  durch Stimulation der Guanylatzyklase (GC) und den damit verbundenen Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration (modifiziert nach Pape 1996).

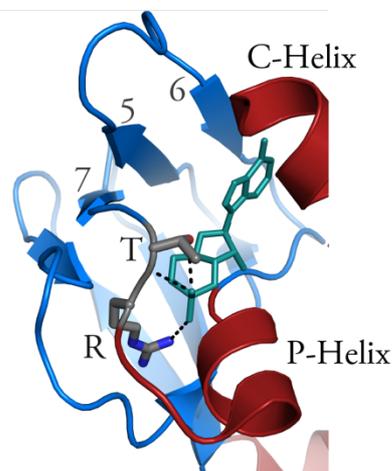
Die Möglichkeiten den Wechsel von Schlaf zu Wachzustand einzuleiten sind vielfältig. Unterschiedliche Neurotransmitter aus dem aufsteigendem Hirnstammsystem spielen dabei eine Rolle (Abbildung 8). Ein diskutierter Mechanismus ist eine durch Noradrenalin (NA) oder Serotonin (5-HT) ausgelöste Depolarisation des Membranpotentials der TC-Neurone (McCormick and Pape 1990a; Pape and McCormick 1989). NA wird im *Locus coeruleus* freigesetzt und bindet im Thalamus an  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren. 5-HT wird in den *Nuclei raphe*s ausgeschüttet und bindet an serotonerge Rezeptoren im Thalamus. In beiden Fällen folgt eine Aktivierung der Adenylatzyklase in den TC-Neuronen und ein damit verbundener Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Diese führt zu einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit des  $I_h$  zu positiveren Werten und so zu einer Depolarisation des Membranpotentials (McCormick and Bal 1997). Der damit verbundene Wechsel des Feuerverhaltens der TC-Neurone von *Bursts* zu tonischem Feuern leitet den Wechsel von Schlaf zu Wachzustand ein. Eine ähnliche Wirkungsweise wurde für Histamin (HA), über Bindung an den  $H_2$ -Rezeptor, und für Stickstoffmonoxid (NO), das seine Wirkung vermutlich über cGMP vermittelt, beschrieben (McCormick and Williamson 1991; Pape and Mager 1992). Einen gegenteiligen Effekt erzielt Adenosin, vermittelt durch die Bindung an den purinergen  $A_1$ -Rezeptor. In *in vitro* Experimenten reduziert es die  $I_h$ -Amplitude, wahrscheinlich durch die Inhibition der Adenylatzyklase und den dadurch erniedrigten intrazellulären cAMP-Level. Der *Burst*-Modus der TC-Neurone wird somit begünstigt (Pape 1992). Der Einfluss der Spannungsabhängigkeit des  $I_h$  und die damit verbundene Veränderung in den oszillatorischen Eigenschaften der TC-Neurone, wird auch durch Computermodelle bestätigt (McCormick and Huguenard 1992).



**Abbildung 9: SWDs in EEG-Messungen der HCN2KO-Maus.** Links (+/+) EEG-Messungen eines WT. Rechts (-/-) EEG Messungen einer HCN2KO-Maus mit spontanen SWDs (Asteriske). Beide Aufnahmen wurden mit zwei Kanälen aufgenommen (L: Linker Kanal; R: Rechter Kanal). Die schwarzen Balken markieren die Region der Messung, die in vergrößerter Skalierung als dritte Aufzeichnung unten gezeigt wird (modifiziert nach Biel et al. 2009).

Oszillationen dienen im Gehirn der Integration und Verarbeitung einer Vielzahl von Signalen aus unterschiedlichen Nuklei. Unter pathologischen Konditionen können neuronale Netzwerke aber auch anormale oszillatorische Aktivitäten generieren (Beenhakker and Huguenard 2009). Ein Beispiel ist die *Absence*-Epilepsie, die zu den primären generalisierten Epilepsien gehört und zumeist während der Kindheit auftritt. Ein typisches Kennzeichen ist der kurzzeitige Verlust des Bewusstseins (Lewis and Chetkovich 2011). In diesem Zusammenhang können im EEG so genannte *spike-and-wave discharges* (SWDs) detektiert werden (Abbildung 9). Hierbei handelt es sich um bilateral auftretende, stark synchronisierte Entladungen, die bei etwa 3 Hz oszillieren. Die SWDs werden mit den oben beschriebenen Schlafspindeln des Non-REM Schlafes in Verbindung gebracht und teilen sich ihren Ursprung in denselben thalamokortikalen Netzwerken. Im Gegensatz zu den Schlafspindeln werden bei SWDs die RT- und TC-Neurone durch kurzen, synchronen kortikalen Input zeitgleich stimuliert. Als Folge werden die TC-Neurone vor allem durch die CT-RT-TC-Verbindung stark hyperpolarisiert und innervieren wiederum RT- und CT-Neurone, wodurch der nächste Zyklus der Oszillation ausgelöst wird. Hinweise für die Entstehung der SWDs sind vielfältig und wurden sowohl für den Kortex, den RT als auch den Thalamus in der Literatur beschrieben (Fogerson and Huguenard 2016). Ein wichtiges Werkzeug dabei sind genetische veränderte Rattenmodelle wie die *Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg* (GAERS) und die *Wistar Albino Glaxo Rats from Rijswijk* (WAG/Rij), bei denen spontan auftretende Mutationen durch gezielte Kreuzung genetisch fixiert wurden (Danober et al. 1998; van Luijckelaar et al. 2002). In beiden Modellorganismen kann ein direkter Zusammenhang zwischen veränderten

Expressionsmustern von HCN-Kanälen und *Absence*-Epilepsie, bzw. generalisierter Epilepsie hergestellt werden. Der Anteil von HCN1 ist in den TC-Neuronen, bei gleichbleibendem Expressionsniveau der HCN2-, HCN3- und HCN4-Isoformen, deutlich erhöht, was zu einer geringeren cAMP-Sensitivität des  $I_h$  führt (Budde et al. 2005; Kuisle et al. 2006). Diese Ergebnisse wurden durch *in situ* Hybridisierungsexperimente gewonnen. Als Kontrolle zu den GAERS und WAG/Rij Rattenmodellen dienten WT-Ratten. Weitere Publikationen kamen durch Western-Blot- und immunhistochemischen Experimenten zu ähnlichen Ergebnissen (Kanyshkova et al. 2012; Notomi and Shigemoto 2004). Eine direkte Korrelation zwischen HCN-Kanälen und dem Auftreten der *Absence*-Epilepsie erbrachte die Charakterisierung des HCN2KO-Mausmodells. Diese Mäuse zeigen bei EEG-Aufnahmen SWDs. In *in vitro* Experimenten kann gezeigt werden, dass das RMP der TC-Neurone im Vergleich zum Wildtyp stark hyperpolarisiert ist. Dadurch feuern die TC-Neurone unter physiologischen Bedingung vor allem im *Burst*-Modus (Ludwig et al. 2003). Es wird vermutet, dass das Verharren im *Burst*-Modus auf zellulärer Ebenen das hochsynchrones Feuern auslöst, das in den SWDs auf Netzwerkebene abgeleitet wird. Die genannten Modellorganismen zeigen einen möglichen Mechanismus für die Entstehung von generalisierter Epilepsie, der von dem Expressionsniveau einzelner HCN-Isoformen und deren cAMP-Regulation abhängt.



**Abbildung 10: Aminosäuremutationen des HCN2EA-Kanals.** Zoom in die *cyclic nucleotide binding domain* (CNBD) des humanen HCN1-Kanals in Anwesenheit von cAMP (grün). In grau hervorgehoben sind die Aminosäuren Arginin (R591) und Threonin (T592), die in dem HCN2EA-Mausmodell zu Glutaminsäure (E) bzw. Alanin (A) mutiert wurden.

Der HCN2-Kanal ist die im Thalamus am stärksten exprimierte HCN-Isoform und besitzt eine hohe cAMP-Sensitivität. Bisher sind keine pharmakologischen Substanzen erhältlich, die

spezifisch die cAMP-Modulation der HCN-Kanäle blocken können ohne gleichzeitig einen Einfluss auf weitere cAMP-*targets* zu haben, wie zum Beispiel der Proteinkinase A (PKA). Eine Ausnahme bildet ein synthetische Peptid, das auf TRIP8b (*TPR containing Rab8b interacting protein*) basiert und nur eingeschränkt applizierbar ist (Saponaro A 2018). TRIP8b, das ausschließlich im Gehirn exprimiert wird, ist eine  $\beta$ -Hilfsuntereinheit. Es interagiert über eine TPR (*tetratricopeptide repeat*)-Domäne mit einer in dem C-Terminus der HCN-Kanäle konservierten Tripeptidsequenz (SNL) und beeinflusst so den Vesikeltransport dieser Proteine. Außerdem tritt es über die TRIP8b<sub>core</sub>-Domäne mit der CNBD der HCN-Kanäle in Interaktion und fungiert dabei als Antagonist der cAMP-Modulation (Santoro et al. 2011; Santoro et al. 2009; Hu et al. 2013). Die in früheren Publikationen gewonnenen Einsichten beruhen auf indirekten Beobachtungen, zum Beispiel durch die Stimulation der Adenylatzyklase und dem damit verbundenen ansteigenden intrazellulären cAMP-Level (McCormick and Pape 1990a). Eindeutige Rückschlüsse, ob die dabei gemachten Beobachtungen allein durch die cAMP-Modulation bedingt sind, sind so nicht möglich. Auch die pharmakologische Inhibition (z. B. durch ZD7288) oder Deletion (*knockout* (KO)-Mausmodelle) der Kanäle ermöglicht keine direkte Aussage über die physiologische Rolle der Koaktivierung mit cAMP. Deshalb wurde im Labor von Professor Biel ein genetischer Ansatz entwickelt, der die cAMP-Regulation des HCN2-Kanals ausschaltet (Gruner 2011). Dazu wurde das HCN2EA-Mausmodell generiert, in dem die Aminosäuren R591 und T592 in der CNBD zu E591 und A592 global mutiert wurden (Abbildung 10). Auf diese Weise wird die Erforschung der Rolle der cAMP-Modulation für den HCN2-Kanal ermöglicht, ohne dessen grundsätzliche spannungsabhängige Aktivierung zu unterbinden.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation wurde das HCN2EA-Mausmodell dazu genutzt werden, um zu untersuchen, welchen Einfluss der Verlust der cAMP-Modulation von HCN2 auf das Feuerverhalten und die elektrischen Eigenschaften thalamischer Neurone besitzt. Die EA-Mutation ist dazu besonders geeignet, da bislang kein spezifischer Inhibitor für die cAMP-Modulation des HCN2-Kanals erhältlich ist. In Bezug auf weitere Eigenschaften der Leitfähigkeit, insbesondere der spannungsabhängigen Aktivierung, unterscheidet sich der HCN2EA-Kanal im Vergleich zu einem WT-HCN2 nicht. Es wurden zwei Hirnregionen, der dorsale *Corpus geniculatum laterale* (dLGN) und der ventrobasale Komplex (VB), untersucht. Beide Regionen sind mit konkreten Funktionen korrelierbar. Der dLGN spielt eine wichtige Rolle beim visuellen Lernen, der VB wird generell mit Vigilanz, aber auch mit dem Wechseln zwischen unterschiedlichen Vigilanzstadien in Verbindung gebracht. Um die thalamischen Neurone in diesen Regionen zu charakterisieren wurden *in vitro* elektrophysiologische Messungen mit Hilfe der Patch-Clamp-Methode an akuten Gehirnschnitten durchgeführt. Dabei wurden in der *Voltage-Clamp*-Konfiguration grundlegende Parameter wie die halbmaximale Aktivierung, die Stromdichte und die Aktivierungskinetik bestimmt. Unter *Current-Clamp*-Bedingungen wurde das Ruhemembranpotential, der *voltage sag* und die Feuereigenschaften der Neurone untersucht. Alle genannten Messungen wurden sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von cAMP durchgeführt. Die aus dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse lieferten eine Basis dafür, die Korrelation aus dem physiologischen Effekt durch den Verlust der cAMP-Modulation mit Veränderungen im thalamischen Schaltverhalten zu charakterisieren. Im Zusammenschluss mit Ergebnissen aus Proteinanalytik und Verhaltensexperimenten, dienen diese Erkenntnisse einer umfassenden und differenzierten Charakterisierung des HCN2EA-Mausmodells.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien, Lösungen, Puffer

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck, Roth und Sigma-Aldrich in den Qualitäten „*pro analysi*“ oder „für molekularbiologische Zwecke“ bezogen. Zur Herstellung sämtlicher Lösungen wurde hochreines entionisiertes Wasser (Milli-Q Gradient, Millipore) verwendet. Lösungen, die in Experimenten genutzt wurden, in denen besondere Anforderungen an die Reinheit gestellt wurden (z. B. PCR) oder Lösungen, die über einen längeren Zeitraum gelagert werden sollten, wurden autoklaviert (Sterilisator, Münchener Medizin Mechanik GmbH).

#### 3.2 Verwendete Mauslinie

Die in dieser Arbeit verwendete HCN2EA-Mauslinie wurde im Labor von Professor Biel durch Christian Gruner etabliert (Gruner 2011). Hierzu wurde ein aus einer genomischen 129/SyJ-Bibliothek isoliertes *Targeting*-Konstrukt mit einem BAC-Klon (Genome System, St. Louis, MO) amplifiziert. Mittels *site-directed* Mutagenese ((CGT)R591E(GAA)/(ACG)T592A(GCG)) wurden Punktmutationen in dem Exon 7 des murinen HCN2-Gens generiert, die die Bindungsaffinität des CNBP zu cAMP verändern. Dazu wurde das Quickchange II XL (Agilent) Kit nach Protokoll des Herstellers verwendet. Für die embryonale Stammzellenselektion wurde eine ACN-Selektionskassette 2, die von loxP Seiten flankiert war, in das Intron 5 des *Targeting*-Konstrukts inseriert. Das Konstrukt wurde in R1 embryonische Stammzellen mittels Elektroporation transferiert und G418-resistente Klone per Southern Blot gescreent. Die korrekten Klone wurden in C57BL/6N Blastozysten injiziert und die resultierenden chimären Mäusen mit C57BL/6N Mäusen zur Keimbahnübertragung verpaart. Ob die Integration der mutierten Basenpaare korrekt erfolgte, wurde durch die Amplifizierung des Exon 7 (sense: 5'-GGAAGAAGATGTACTTCATCCAG-3'; antisense: 5'-TGCCCCACTGGAATGGAGCC-3') und anschließender Sequenzierung (Eurofins, Ebersberg, Germany) verifiziert.

Die Maushaltung erfolgte gemäß den gesetzlichen Richtlinien (deutsches Tierschutzgesetz) und mit Erlaubnis der Regierung von Oberbayern. Die verwendeten Versuchstiere stammen aus homo- oder heterozygoten Zuchten. Die Tiere erhielten Futter und Wasser *ad libitum* und lebten in einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus.

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Genotypisierung

Aus den Mäusen entnommene Gewebeprouben wurden in 600 µl NaOH (50 mM) bei 95 °C für 10 Minuten inkubiert. Danach wurden die Proben mit einem Vortexer gemischt, 50 µl Tris-HCl Puffer (1 M; pH 8,0) hinzugefügt und für 6 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die auf diese Weise isolierte genomische DNA konnte bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert werden und diente als *template* für eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Mit Hilfe der in Tabelle 1 dargestellten Primer konnten homozygote und heterozygote Träger der EA-Mutationen, sowie homozygote Wildtypen (WT) identifiziert werden.

**Tabelle 1: Primer für die Genotypisierung der HCN2EA-Mauslinie. Alle Primer wurden bei Eurofins MWG hergestellt.**

Primer	Sequenz 5`-3`
HCN2Genolxpfor	AGT TGT ACT CAA CCA GTG GC
HCN2Genolxprev	TAG TCA CGG TCA CTG CCA AG

Für die PCR wurde das in Tabelle 2 dargestellte Pipettierschema und das in Tabelle 3 gezeigte Protokoll verwendet. Alle PCRs wurden in einem ProFlex PCR System (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt.

**Tabelle 2: Pipettierschema der Genotypisierungs-PCR.**

Komponente	Volumen [µl]
<i>Template</i>	4
<i>Primer forward</i>	1,25
<i>Primer reverse</i>	1,25
Taq-Puffer	2,5
dNTP's	4
Wasser	11,75
Taq-Polymerase	0,25

**Tabelle 3: Protokoll der Genotypisierungs-PCR.**

Phase	Temperatur	Zeit	
Initiale	95 °C	5 min	
Denaturierung			
Denaturierung	95 °C	30 s	35 Zyklen
Primerhybridisierung	59 °C	30 s	
Elongation	72 °C	40 s	
Finale Elongation	72 °C	3 min	

### 3.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese über ein 2 % Agarosegel. Zur Herstellung des Gels wurde die entsprechende Menge Agarose (peqGOLD Universal-Agarose, Peqlab) unter Wärmezufuhr in 1x TBE-Puffer gelöst und PeqGreen (finale Konzentration im Gel 0,025 µl/ml, peqlabs) hinzugefügt. Neben den mit 6x *loading dye* (Verhältnis 1:6) versetzten Proben wurde auch ein *ladder* (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific) auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer. Zur Visualisierung wurde ein Gel Doc 2000 (Biorad) genutzt.

## 3.4 Proteinanalytik

Die die Proteinanalytik betreffenden Experimente und Analysen wurden von Dr. Verena Hammelmann durchgeführt.

### 3.4.1 Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Experimente wurden Gehirne adulter Mäuse in Isobutan tiefgefroren. Die Immunhistochemie wurde, wie in Hammelmann et al. (2011) beschrieben, auf 12 µm dicken Kryoschnitten durchgeführt. Diese wurden zunächst in 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 5 min fixiert, dann mit Triton-X100 permeabilisiert und für eine Stunde geblockt. Die Inkubation mit Primärantikörpern erfolgte über Nacht. Dabei wurden die folgenden Primärantikörper verwendet: Kaninchen anti-HCN1 (1:300, Alomone #APC-056), Kaninchen anti-HCN2 (1:300, Alomone #APC-030), Kaninchen anti-HCN3 (1:300, Alomone #APC-057),

Kaninchen anti-HCN4 (1:300, Alomone #APC-052). Die Hirnschnitte wurden gewaschen und mit Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörpern, die von Jackson (#711-035-152) bezogen wurden, für eine weitere Stunde inkubiert. Die Signale wurden mit Tyramin amplifiziert (TSA, Perkin Elmer, NEL744001KT), die Zellkörper mit Hoechst gefärbt und die Proben in Eindeckmedium (Beckman Coulter) eingebettet. Die Abbildungen wurden mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixeln mit Hilfe eines inversen Leica TCS-SP8 Konfokalmikroskops aufgenommen.

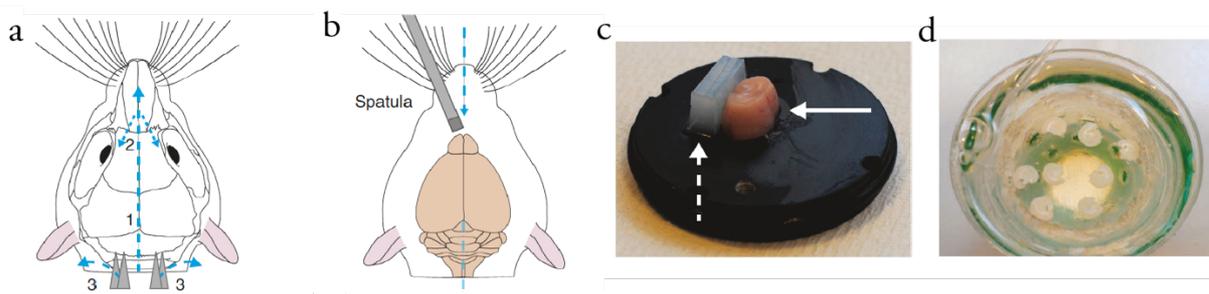
### 3.4.2 Western-Blot-Analyse

Für die Analyse der Proteinexpression im VB und dLGN wurden Gehirnproben adulter Mäuse in RIPA-Puffer homogenisiert (50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% Natriumdesoxycholsäure, 0,1 % SDS mit Protease Inhibitor Cocktail (Complete, Mini, Roche)). Die Präparation der Gehirnmembranen wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt (Much et al. 2003). Die Proben wurden denaturiert und auf ein 7 % SDS-PAGE Gel aufgetragen. Die Polyacrylamidgele wurden elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran (Whatman GmbH), die zuvor mit Methanol aktiviert wurde, transferiert. Die Membranen wurden mit 5 % Milch in TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween-20) für eine Stunde geblockt und mit folgenden Antikörpern über Nacht in 1 % Milch in TBST inkubiert: Kaninchen anti-HCN2 (1:1000, Alomone #APC-030), Kaninchen anti-HCN4 (1:1000, Alomone #APC-052), Maus anti-ATP1A1 (1:1000, a6F, DSHB, University of Iowa), Maus anti-Trip8b (1:1000, N212/7, Neuromab). Anschließend wurden die Proben dreimal für je 5 min in TBST gewaschen und für 1-2 Stunden mit Meerrettichperoxidase-konjugierte Sekundärantikörper (Kaninchen: 1:1,000, #sc-2030; Maus: 1:2000, #sc-2031; SantaCruz) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde darauf drei- viermal für je 5 min mit TBST und einmal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit den ECL Western-Blot Detektionsreagenzien (Immobilon, Millipore). Die Signale wurden akquiriert (ChemiDoc MP; BioRad) und mit Hilfe der ImageLab Software (Bio-Rad Laboratories) quantifiziert.

### 3.5 Präparation von Hirnschnitten

Mäuse im Alter von 17 bis 25 Tagen wurden anästhesiert und dekaptiert. Der Kopf wurde schnellst möglich in eiskalte ACSF (*artificial cerebrospinal fluid*) transferiert. Das Fell wurde mit Hilfe einer Schere so entfernt, dass der Schädel frei sichtbar und zugänglich war (Abbildung 11). Dieser wurde dann von Lambda ausgehend Richtung Bregma entlang der sagittalen Naht gespalten (Abbildung

11 a, 1) und mit zwei mediolateralen Schnitten weiterbearbeitet (Abbildung 11 a, 2). Die entstehenden Schädelhälften wurden mittels eines Spatels seitlich aufgeklappt (Abbildung 11 a, 3), das Gehirn vorsichtig aus dem Schädel gelöst (Abbildung 11 b) und für kurze Zeit in frische eiskalte ACSF transferiert. Das Gehirn wurde auf einem mit eiskalter ACSF benetztem Filterpapier (MN 615, Macherey-Nagel) platziert und dort Cerebellum und olfaktorischer Bulbus mit einer Rasierklinge entfernt. Um coronale oder horizontale Hirnschnitte zu erhalten, wurde das Gehirn in der jeweiligen Ausrichtung auf einen gekühlten Objektisch mit herkömmlichen Sekundenkleber fixiert und an einem 3 % Agarblock ausgerichtet (Abbildung 11 c). Der Objektisch wurde durch einen magnetischen Mechanismus in einer Pufferkammer befestigt, die mit eiskalter und mit Carbogen (5 % CO<sub>2</sub>, 95 % O<sub>2</sub>) begaster ACSF (Präparationszusammensetzung) gefüllt war. Die Pufferkammer selbst war an einem Vibrations-Mikrotom (HM 650V, Mircrome) befestigt, mit dem die Hirnschnitte mit einem Schnittwinkel von 8° präpariert wurden. Dabei wurde zunächst in mindestens 600 µm großen Schnitten vorgegangen, bis man die gewünschte Hirnregion erreicht hatte. Diese wurde dann in 300 µm dicken Schnitten präpariert. Die Schwingungsamplitude der dazu genutzten Rasierklinge betrug 1,2 mm, die Frequenz 90 Hz und die Geschwindigkeit des Vorgangs 9 mm/s.



**Abbildung 11: Präparation von Gehirnschnitten aus einem Mäusegehirn.** a) Durch einen posteroanterioren Schnitt entlang der Mittellinie (1) und zwei kleinen mediolateralen Schnitten (2) wird der Schädel seitlich aufgeklappt (3). b) Mit einem kleinen Spatel wird das Gehirn vorsichtig aus dem Schädel herausgehoben. c) Das Gehirn wird auf einen gekühlten Objektisch geklebt und an einem Agaroseblock (gestrichelter Pfeil) ausgerichtet. Der Objektisch wird so in der Pufferkammer des Vibratoms ausgerichtet, dass das Gehirn in Richtung der Rasierklinge zeigt (Pfeil). d) Die Hirnschnitte werden in einer begasteten ACSF-Lösung aufbewahrt (modifiziert nach Mishra et al. 2014).

Alle beschriebenen Schritte wurden unter gekühlten Bedingungen vollzogen. Alle verwendeten Werkzeuge wurden vor der Benutzung auf Eis oder im Kühlschrank gekühlt.

Die Hirnschnitte wurden zunächst in 35 °C temperierte ACSF (Regenerationszusammensetzung) transferiert und dort für etwa eine Stunde regeneriert (Abbildung 11 d). Danach wurden die Schnitte bei Raumtemperatur gelagert bis sie für elektrophysiologische Untersuchung verwendet wurden.

## 3.6 Elektrophysiologie an Hirnschnitten

### 3.6.1 Patch-Clamp-Technik

Die Daten der elektrophysiologischen Untersuchungen wurden mit einem EPC 10 Double Patch Clamp Verstärker und dem Programm Patchmaster v2x73.2 (HEKA Elektronik) erhoben. Dabei wurden thalamokortikale (TC) Neurone des VB und des dLGN in der *whole cell* Konfiguration gemessen. Die Neurone wurden mit einem aufrechten Lichtmikroskop (Axioskop 2 FS plus, Zeiss) und einer Infrarot CCD-Kamera (VX55, Till Photonics) visuell identifiziert. Die Analyse der Daten wurde mit Origin Pro 8.0 (OriginLab) und Fitmaster v2x73.5 (HEKA Elektronik) durchgeführt. Die Temperatur der Messungen wurden durch ein Temperaturkontrollelement (TC344B, Warner Instruments) reguliert und betrug, sofern nicht anders angegeben, 31-33°C.

### 3.6.2 Elektroden und Kapillaren

Bei den verwendeten Elektroden handelte es sich um Silberelektroden, die mit einer 3 M KCl-Lösung chloriert wurden. Alle Patchpipetten wurden mit einem horizontalen Pipettenziehgerät (DMZ-Universal-Electrode-Puller, Zeitz-Instruments) aus Borosilikat-Glaskapillaren mit Filament, die einen äußeren Durchmesser von 1,5 mm, einen inneren Durchmesser von 1,17 mm und eine Länge von 100 mm besaßen, (GC150TF-10, Havard Apparatus) hergestellt. Der Widerstand der Pipetten, die für *Voltage-Clamp*-Messungen verwendet wurden, betrug 2,5-3,5 MΩ. Für *Current-Clamp*-Messungen betrug der Pipettenwiderstand 3,5-4,5 MΩ.

### 3.6.3 Lösungen

Die Zusammenstellung aller in den Experimenten verwendeten Lösungen kann im Anhang unter Puffer und Lösungen nachgelesen werden.

### 3.6.4 Messprotokolle

Bei den elektrophysiologischen Messungen kann zwischen *Voltage-Clamp*- und *Current-Clamp*-Messungen unterschieden werden. Im *Voltage-Clamp*-Modus wird ein Neuron bei einer bestimmten

Spannung geklemmt und die Stromantwort aufgezeichnet. Bei *Current-Clamp*-Messungen erhält man hingegen eine Spannungsantwort, nachdem das Neuron bei einem bestimmten Strom geklemmt wurde.

#### 3.6.4.1 Halbmaximale Aktivierung

Um die spannungsabhängige Aktivierung der TC-Neurone zu untersuchen wurde das in Abbildung 12 dargestellte Protokoll verwendet und im *Voltage-Clamp*-Modus aufgezeichnet. Ausgehend von einem Haltepotential von  $-45\text{ mV}$  wurden Neurone für  $2,5\text{ s}$  auf hyperpolarisierende Membranpotentiale in  $10\text{ mV}$  Schritten zwischen  $-140\text{ mV}$  und  $-30\text{ mV}$  geklemmt. Drauf folgte ein  $250\text{ ms}$  langer Testpuls zu  $-140\text{ mV}$  und die Rückkehr zum Haltepotential.

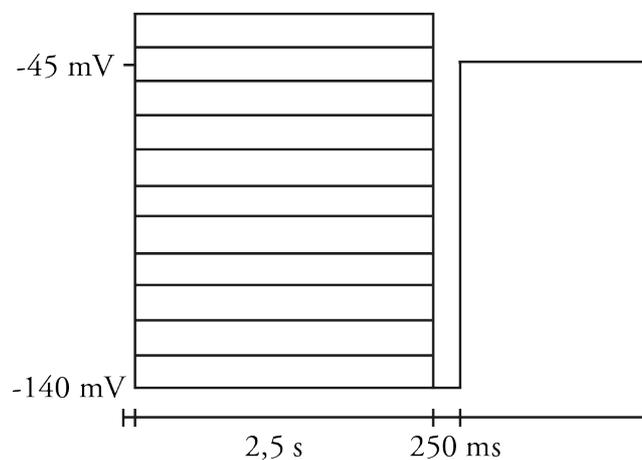


Abbildung 12: Protokoll zur Bestimmung der halbmaximalen Aktivierung.

#### 3.6.4.2 Stromdichte und Aktivierungskinetik des $I_h$

Für die Bestimmung der Stromdichte und der Aktivierungskinetik des  $I_h$  wurde ausgehend von einem Haltepotential von  $-45\text{ mV}$  für  $2,75\text{ s}$  ein Spannungspuls zu  $-140\text{ mV}$  gegeben. Die Messung erfolgte im *Voltage-Clamp*-Modus. Für die Berechnung der Stromdichte wurde die maximale Stromantwort, die durch den Spannungspuls erzeugt wurde, durch die Kapazität des gemessenen Neurons dividiert. Die Aktivierungskinetik wurde in Form der Zeitkonstante ( $\tau$ ) mit Hilfe einer einfachen Exponentialfunktion bestimmt.

#### 3.6.4.3 Ruhemembranpotential

Um das Ruhemembranpotential der TC-Neurone zu bestimmen, wurden die Neurone sofort nach Erreichen der *whole cell* Konfiguration im *Current-Clamp*-Modus ohne Strominjektion ( $0\text{ pA}$ )

geklemmt. Auf diese Weise stellte sich das natürliche Ruhemembranpotential der Zelle ein und konnte aufgezeichnet werden.

#### 3.6.4.4 Voltage Sag

Zur Bestimmung des *voltage sags*, bzw. der *voltage sag ratio* wurden TC-Neurone im *Current-Clamp*-Modus in 20 pA Schritten Ströme zwischen -100-0 pA für 2,5 s injiziert und die Spannungsantworten aufgezeichnet (Abbildung 13). Die *voltage sag ratio* wurde berechnet indem die stationäre Spannungsantwort durch die maximale Auslenkung der Spannungsantwort dividiert wurde.

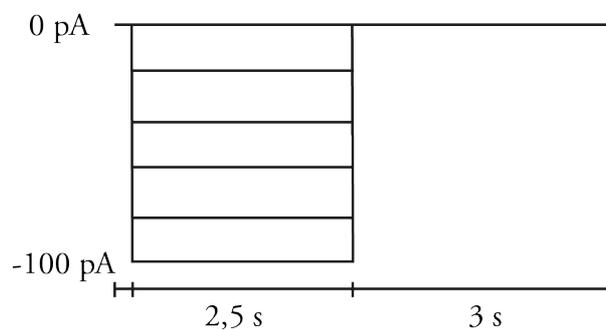


Abbildung 13: Protokoll zur Bestimmung der *voltage sag ratio*.

#### 3.6.4.5 Feuereigenschaften

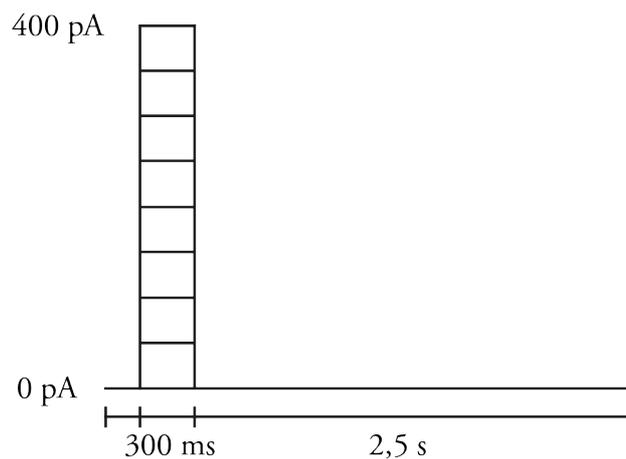


Abbildung 14: Protokoll zur Bestimmung des Feuerverhaltens thalamokortikaler Neurone.

Um zu untersuchen in welchem Modus die TC-Neurone des jeweiligen Genotyps feuern, wurden diese im *Current-Clamp*-Modus Strominjektionen von 0-400 pA für 300 ms in 50 pA Schritten

unterzogen (Abbildung 14). Um sicher zu gehen, dass die Neurone wieder ihr Ruhemembranpotential erreichten wurden sie nach jedem Strompuls für 2,5 s bei 0 pA geklemmt.

### **3.7 Statistische Analyse**

Alle Werte wurden als Durchschnitt  $\pm$  Standardfehler des Durchschnitts (SEM) angegeben. Sofern nicht anders beschrieben, wurde eine One-way ANOVA mit anschließendem Tukey's Post-hoc-Test zur statistischen Analyse verwendet. Werte von  $p < 0,05$  wurden als signifikant betrachtet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Einfluss der EA-Mutation auf die Gehirnmorphologie

In dem HCN2EA-Mausmodell wurden zwei Aminosäuren des HCN2-Kanals mutiert, die essentiell für dessen hoch-affine cAMP-Bindung sind. HCN2EA-Mäuse exprimieren die mutierten HCN2-Kanäle systemisch. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf den Auswirkungen der Mutationen auf die Funktion des Thalamus. Deshalb wurde untersucht, ob dieser Eingriff in das Genom zu einer veränderten Gehirnmorphologie führt. Horizontale Hirnschnitte von adulten HCN2EA- und Wildtyp- (WT) Mäusen zeigten makroskopisch keine Unterschiede. Größe und Gewicht der Gehirne waren vergleichbar. Die Hirnregionen des Hippocampus, des Kortex und des Cerebellums wiesen keine strukturellen Unterschiede auf (Abbildung 15). Auch die zu untersuchenden thalamischen Nuklei, der ventrobasale Komplex (VB, blau) und der dorsalen *Corpus geniculatum laterale* (dLGN, rot), waren vergleichbar. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die HCN2EA-Kanäle zu keiner eingeschränkten Entwicklung der Gehirnmorphologie führen.



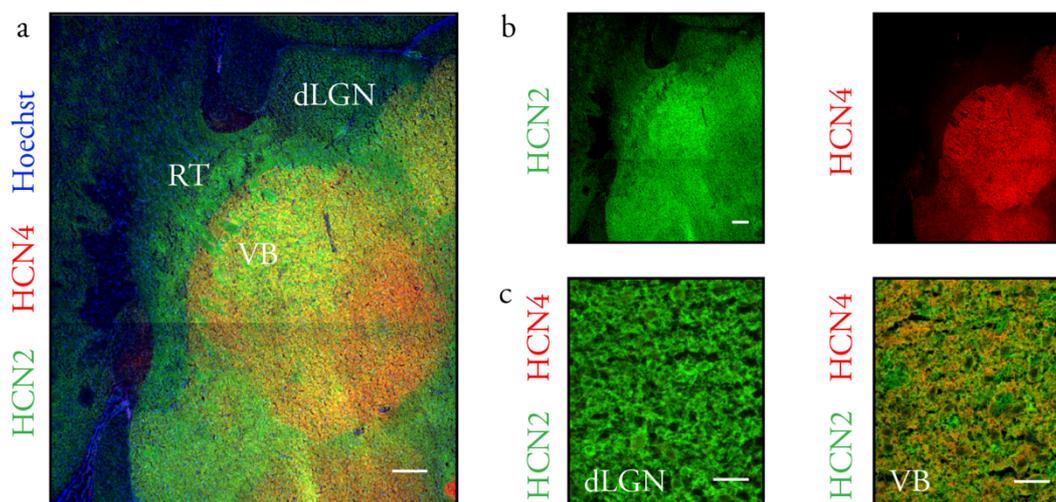
**Abbildung 15: Repräsentative horizontale Hirnschnitte einer WT- und einer HCN2EA-Maus.** Der VB (blau) und der dLGN (rot) wurden farblich hervorgehoben (modifiziert nach Hammelmann et al. 2019).

### 4.2 Expression der HCN-Isoformen im Thalamus der HCN2EA-Maus

#### 4.2.1 Lokalisation der HCN2- und HCN4-Isoformen im Thalamus

In der Literatur werden HCN2 und HCN4 als die am stärksten im Thalamus exprimierten HCN-Kanäle beschrieben (Notomi and Shigemoto 2004). Die im Zusammenhang mit dieser Dissertation durchgeführten immunohistochemischen Färbungen von WT-Hirnschnitten zeigten unterschiedliche Expressionsmuster der einzelnen Isoformen (Abbildung 16 a). Die Immunfluoreszenz der HCN2 spezifischen Antikörper (grün) deutet auf eine Expression im

gesamten Thalamus, einschließlich VB, dLGN und *Nucleus reticularis* (RT) hin. Die HCN4 spezifische Färbung (rot) war hingegen vor allem auf den VB beschränkt (Abbildung 16 b). Keine oder kaum Immunfluoreszenz zeigten HCN1 und HCN3 spezifische Antikörper (nicht gezeigte Daten). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass HCN2 im dLGN die dominante Isoform der HCN-Kanäle ist. Im VB konnte sowohl HCN2 als auch HCN4 detektiert werden (Abbildung 16 c). Damit ist HCN2 in den für diese Arbeit relevanten thalamischen Nuklei lokalisiert.



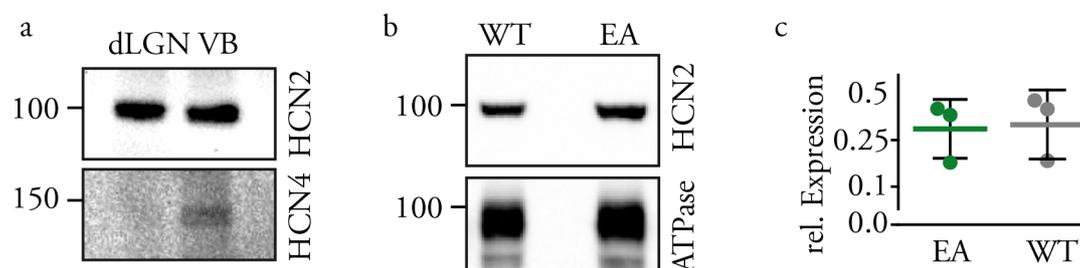
**Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung des Thalamus in horizontalen Hirnschnitten.**

**a)** Gezeigt wird die Färbung für HCN2 (grün), HCN4 (rot) und Hoechst (blau) in einem auf den VB, den dLGN und den RT fokussierten Ausschnitt. Die Skalierung beträgt 200  $\mu\text{m}$ . **b)** Der gleiche Ausschnitt je einmal nur mit HCN2- (links, grün) und HCN4- (rechts, rot) Färbung. **c)** Der dLGN (links) und der VB (rechts) in höherer Vergrößerung (Skalierung 25  $\mu\text{m}$ ) und mit den spezifischen Färbungen für HCN2 (grün) und HCN4 (rot) (modifiziert nach Hammelmann et al. 2019).

#### 4.2.2 Western-Blot-Analyse

Mutationen, wie die in der HCN2EA-Maus angewandten, können zu Proteindegradation und veränderten Expressionsleveln des mutierten Proteins führen. Diese möglichen Effekte müssen bei der Analyse der Funktion des HCN2EA-Kanals berücksichtigt werden. Um den Nachweis von HCN2 und HCN4 im VB und dLGN zusätzlich auf Proteinebene zu bestätigen, wurden diese Hirnregionen aus WT-Hirnschnitten ausgestanzt und Western-Blot-Analysen mit diesen Proben durchgeführt. Hierbei konnte HCN2 sowohl im VB als auch im dLGN detektiert werden. Ein Nachweis von HCN4 war hingegen nur im VB möglich (Abbildung 17 a). Als Membranmarker diente ein Antikörper gegen die  $\alpha 1$  Untereinheit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (Abbildung 17 b). Dabei konnten keine Unterschiede der relativen Expression der HCN2-Kanäle zwischen den Genotypen

festgestellt werden (Abbildung 17 c). Die Ergebnisse sprechen dafür, dass bei der funktionellen Analyse des HCN2EA-Kanals keine Einschränkungen durch unterschiedliche Expressionsniveaus zu erwarten sind.

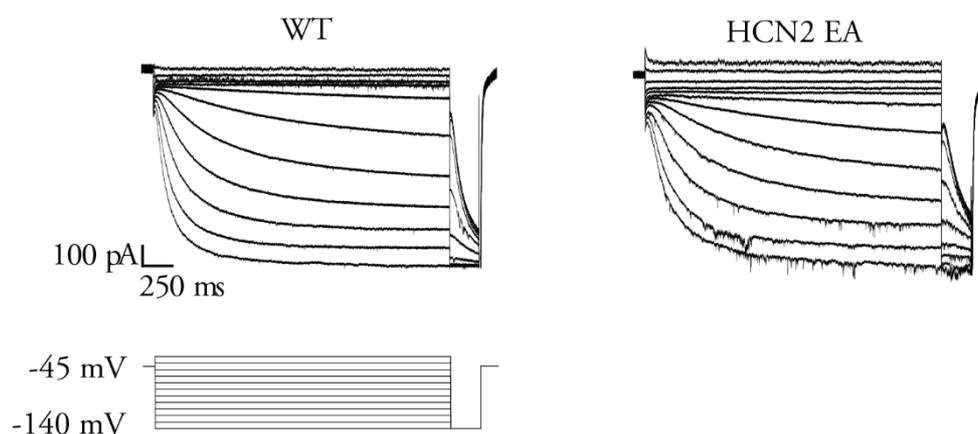


**Abbildung 17: Detektion von HCN2 und HCN4 via Western-Blot-Analyse.** a) Detektion von HCN2 und HCN4 in Gewebeprobebeispielen des dLGN und VB. b) Western-Blot-Analyse von Membranpräparationen von HCN2EA und WT-Gehirnen für HCN2 und Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (als Membranmarker). c) Quantifizierung für HCN2 in Relation zu ATPase. Jeder der Punkte repräsentiert drei Replikate einer Maus (modifiziert nach Hammelmann et al. 2019).

### 4.3 Elektrophysiologische Charakterisierung des HCN2EA-Kanals im VB

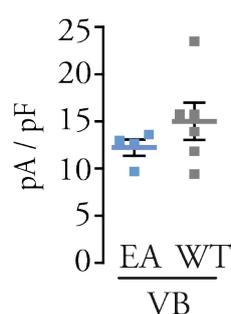
#### 4.3.1 Einfluss der EA-Mutationen auf die grundlegenden Eigenschaften des I<sub>h</sub> in thalamokortikalen Neuronen des VB

In der Literatur wurde bereits mehrfach der Einfluss des I<sub>h</sub> auf die Generierung von thalamischen Oszillationen und die damit einhergehende Rolle in der Entstehung von generalisierter Epilepsie und Änderungen in Schlaf-Wach-Übergängen beschrieben (Ludwig et al. 2003; McCormick and Bal 1997). Mit dem HCN2EA-Mausmodell kann nun darüber hinaus differenziert untersucht werden wie wichtig die cAMP-Modulation des HCN2-Kanals ist. Um die Auswirkungen der EA-Mutation auf den I<sub>h</sub> funktional zu charakterisieren, wurden deshalb *Voltage-Clamp*-Messungen an TC-Neuronen des VB *in vitro* in akuten Hirnschnitten durchgeführt. Dazu wurde ein Spannungsprotokoll genutzt, das, ausgehend von einem Haltepotential von -45 mV, die gepatchten Neurone auf unterschiedlich stark hyperpolarisierenden Membranpotentialen von bis zu -140 mV klemmte (s. 3.6.4.1). Sowohl in HCN2EA- als auch in WT-Neuronen führte die Hyperpolarisation zu einer Aktivierung der HCN-Kanäle, die sich in einem deutlichen I<sub>h</sub> zeigte (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Repräsentative Stromspuren thalamokortikaler Neurone im VB.** Neurone von WT- (links) und HCN2EA-Mäusen (rechts) wurden von einem Haltepotential bei -45 mV aus in hyperpolarisierenden Spannungsschritten von -140 bis +30 mV für 2,5 s geklemmt (unten links).

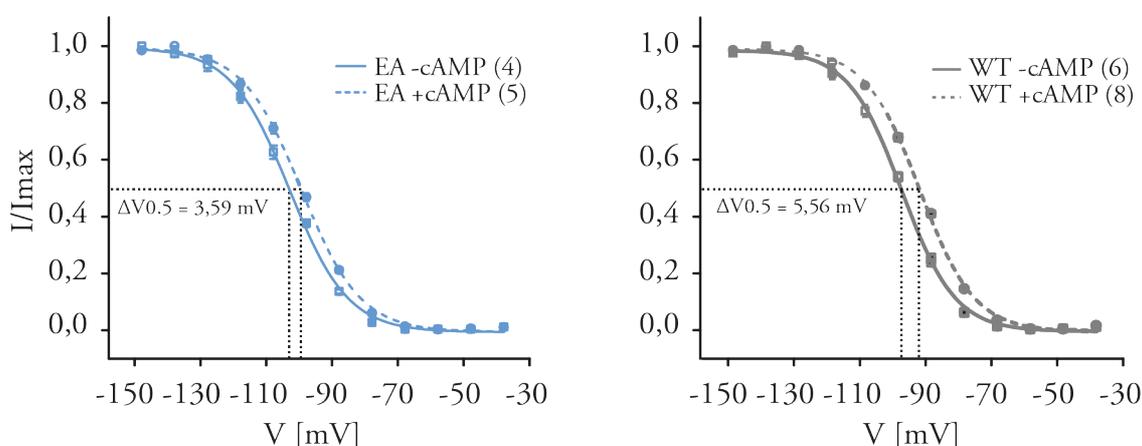
Die *Voltage-Clamp*-Messungen können auf unterschiedliche Weise analysiert werden und ermöglichen vielseitige Einblicke in die grundlegenden Kanaleigenschaften. So führte die Mutation des HCN2-Kanals in den TC-Neuronen des VB zu keiner signifikanten Veränderung der Stromdichte (WT:  $15,02 \pm 1,96$  pA / pF,  $n = 6$ ; HCN2EA:  $12,23 \pm 0,87$  pA / pF,  $n = 4$ ;  $p = 0,3524$ , Mann Whitney Test), die bei -140 mV bestimmt wurde (Abbildung 19). Da das Expressionsniveau des HCN2-Kanals und die Kapazität der TC-Neurone in den HCN2EA- und WT-Mäusen vergleichbar ist, deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass das spannungsabhängige *gating* des Kanals durch die Mutationen nicht beeinträchtigt ist.



**Abbildung 19: Stromdichte thalamokortikaler Neurone im VB.** Stromdichte thalamokortikaler Neurone in HCN2EA-Mäusen (blaue Vierecke) und in WT-Mäusen (graue Vierecke).

Die Aktivierungskinetik beschreibt die Öffnungsgeschwindigkeit eines Kanals. In den EA-Neuronen ( $225,3 \pm 2,85$  ms,  $n = 4$ ) war diese signifikant langsamer als im WT ( $129,6 \pm 7,29$  ms,  $n = 6$ ). Dies ist ein Indiz für eine eingeschränkte cAMP-Modulation des HCN2EA-Kanals. Die

grundsätzlich langsamere Aktivierungsgeschwindigkeit kann durch eine nicht vorhandene Voraktivierung des Kanals durch cAMP erklärt werden.



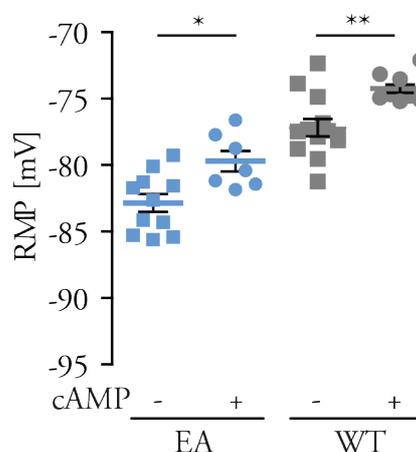
**Abbildung 20: Spannungabhängige Aktivierung des  $I_h$  in thalamokortikalen Neuronen des VB.**

Links: Spannungabhängige Aktivierung des  $I_h$  thalamokortikaler Neurone in HCN2EA-Mäusen in Abwesenheit (blaue Vierecke) und in Anwesenheit von  $1 \mu\text{M}$  cAMP (blaue Kreise). Rechts: Spannungabhängige Aktivierung des  $I_h$  thalamokortikaler Neurone in WT-Mäusen in Abwesenheit (graue Vierecke) und in Anwesenheit von  $1 \mu\text{M}$  cAMP (graue Kreise). Die schwarzen gestrichelten Linien visualisieren die  $V_{0,5}$ .

Außerdem wurde die spannungabhängige Aktivierung in Abwesenheit und nach Perfusion mit  $1 \mu\text{M}$  cAMP untersucht (Abbildung 20). Die halbmaximale Aktivierung ( $V_{0,5}$ ) wurde mit Hilfe eines Boltzmann *fits* bestimmt. Dieser Wert betrug bei HCN2EA-Neuronen in Abwesenheit von cAMP  $-104,11 \pm 0,77$  mV ( $n = 4$ ) und verschob sich in Anwesenheit von cAMP auf positivere Werte von  $-100,52 \pm 0,63$  mV ( $n = 5$ ), was einer Differenz von  $3,59$  mV entspricht (Abbildung 20, links). In TC-Neuronen des WT wurde eine  $V_{0,5}$  in Abwesenheit von cAMP von  $-97,92 \pm 0,55$  mV ( $n = 6$ ) und in Anwesenheit von cAMP von  $-92,36 \pm 0,31$  mV ( $n = 8$ ) gemessen (Abbildung 20, rechts). Die Differenz von  $5,56$  mV fiel größer aus als in den HCN2EA-Neuronen und deutet auf eine höhere Sensitivität für eine cAMP-Modulation im WT hin. Die signifikante Differenz der  $V_{0,5}$ -Werte des in den HCN2EA-Neuronen generierten  $I_h$  kann durch die ebenfalls cAMP sensitive HCN4-Isoform erklärt werden, die wie oben beschrieben ebenfalls im VB exprimiert wird. Für eine eingeschränkte cAMP-Sensitivität der HCN2-Isoform der HCN2EA-Neurone sprechen außerdem die insgesamt negativeren Werte der  $V_{0,5}$ . Selbst in Anwesenheit von cAMP reichten diese nicht an das WT-Niveau in Abwesenheit von cAMP heran.

### 4.3.2 Einfluss der reduzierten cAMP-Sensitivität des HCN2-Kanals auf das Ruhemembranpotential thalamokortikaler Neurone des VB

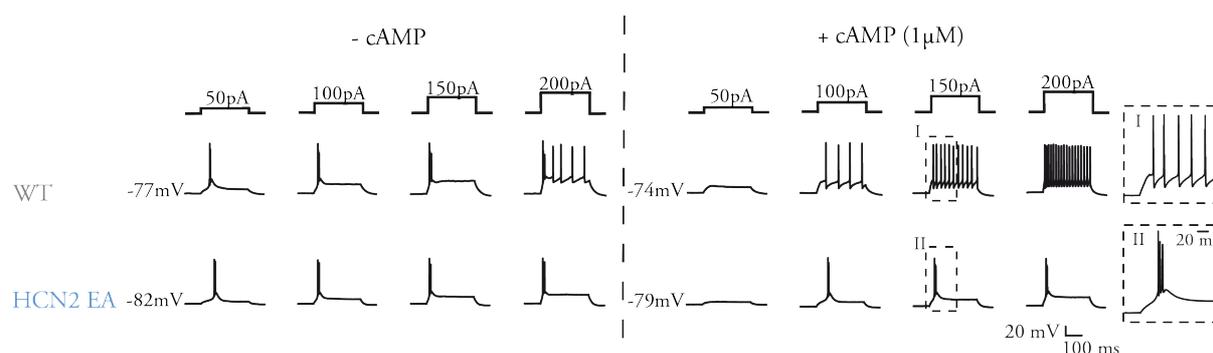
Weil HCN-Kanäle für die Determination des Ruhemembranpotential (RMP) eine wichtige Rolle spielen, wurden die Auswirkungen der EA-Mutationen des HCN2-Kanals und die damit verbundene Veränderung der spannungsabhängigen Aktivierung untersucht. Dazu wurden TC-Neurone des VB *in vitro* in akuten Hirnschnitten im *Current-Clamp*-Modus geklemmt und das RMP in Anwesenheit und Abwesenheit von cAMP gemessen (Abbildung 21). Nach Perfusion mit 1  $\mu$ M cAMP konnte eine Verschiebung des RMP in HCN2EA-Neuronen von  $-82,85 \pm 0,67$  mV (blaue Vierecke,  $n = 11$ ) auf  $-79,71 \pm 0,77$  mV (blaue Kreise,  $n = 7$ ) beobachtet werden. In WT-Neuronen war ebenfalls eine Verlagerung des RMP zu positiveren Werten in Anwesenheit von cAMP zu beobachten (WT - cAMP:  $-77,19 \pm 0,65$  mV,  $n = 13$ , graue Vierecke; WT + cAMP:  $-74,25 \pm 0,32$  mV,  $n = 10$ , graue Kreise). Das RMP der HCN2EA-Neurone ist hyperpolarisierter als das der WT-Neurone (Differenz = 5,65 mV) und erreicht in Anwesenheit von cAMP das WT-Niveau in Abwesenheit von cAMP. Die in der HCN2EA-Maus beobachtete Verlagerung des RMP in Reaktion auf eine erhöhte cAMP-Konzentration deutet auf eine Komponente der HCN4-Isoform im  $I_h$  des VB hin und deckt sich mit den Beobachtungen bezüglich der spannungsabhängigen Aktivierung.



**Abbildung 21: Das Ruhemembranpotential thalamokortikaler Neurone im VB.** Gezeigt wird das Ruhemembranpotential gemessen in thalamokortikalen Neuronen in HCN2EA-Mäusen in Abwesenheit (blaue Vierecke) und Anwesenheit (blaue Kreise) von 1  $\mu$ M cAMP, sowie in WT-Mäusen in Abwesenheit (graue Vierecke) und Anwesenheit (graue Kreise) von 1  $\mu$ M cAMP. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

### 4.3.3 Veränderte Feuereigenschaften thalamokortikaler Neurone im VB der HCN2EA-Maus

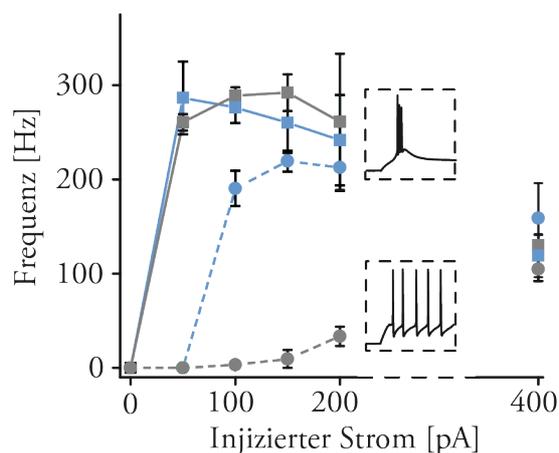
Veränderungen des Membranpotentials können das *gating* von Ionenkanälen direkt beeinflussen. TC-Neurone feuern in zwei unterschiedlichen Modi, dem hochfrequenten *Burst*-Modus und dem niedrigfrequenten tonischen Modus (Sherman 2001). Um die Auswirkungen der EA-Mutation auf die Feuereigenschaften der TC-Neurone zu bestimmen, wurden diese in der HCN2EA-Maus untersucht, indem die TC-Neurone an ihrem RMP im *Current-Clamp*-Modus geklemmt und Ströme von 50-200 pA injiziert wurden (Abbildung 22). Die aufgezeichneten Spannungsantworten des WT in Abwesenheit von cAMP zeigten den *Burst*-Modus (Abbildung 22, oben links). Erst bei Strominjektionen ab 200 pA konnten auch tonische Merkmale beobachtet werden. In Anwesenheit von 1  $\mu$ M cAMP wechselte der Feuermodus durchgehend in den tonischen Modus (Abbildung 22, oben rechts). Diese Feuermuster entsprechen vorherigen Publikationen (Budde et al. 2005). Die HCN2EA-Neurone feuerten in Abwesenheit von cAMP bei Strominjektionen bis 200 pA durchgehend im *Burst*-Modus (Abbildung 22, unten links). Im Gegensatz zum WT blieb das Feuerverhalten der HCN2EA-Neurone nach Perfusion mit cAMP aber gleich. Ein Wechsel in den tonischen Modus konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 22, unten rechts). Die Ergebnisse zeigen also ein unterschiedliches Feuerverhalten der Genotypen in Anwesenheit von cAMP (Abbildung 22, Zoom bei einer Strominjektion von 150 pA, gekennzeichnet durch rechteckförmige gestrichelte Linie. I: tonischer Modus. II: *Burst*-Modus.).



**Abbildung 22: Feuermodi thalamokortikaler Neurone in Abhängigkeit von cAMP im VB.**

Spannungsantworten thalamokortikaler Neurone aus WT- (grau) und HCN2EA- (blau) Mäusen auf unterschiedliche Strominjektionen in Abwesenheit (links) und Anwesenheit (rechts) von 1  $\mu$ M cAMP. Die Strominjektionen erfolgten von den vor den Spuren indizierten Ruhemembranpotentialen. Zoom I und II zeigen die unterschiedlichen Feuermodi in Anwesenheit von cAMP bei einer Strominjektion von 150 pA (I: tonischer Modus; II: *Burst*-Modus).

Um die Ergebnisse zu quantifizieren, wurden die Aktionspotentialfrequenzen, in denen die Neurone feuerten, bestimmt (Abbildung 23). TC-Neurone der HCN2EA-Maus (blaue Vierecke, durchgezogene Linie,  $n = 6$ ) und des WT (graue Vierecke, durchgezogene Linie,  $n = 4$ ) in Abwesenheit von cAMP zeigten bei Strominjektionen bis 200 pA Frequenzen zwischen 240 und 300 Hz was dem hochfrequenten *Burst*-Modus entspricht (oberes Insert). HCN2EA-TC-Neurone in Anwesenheit von cAMP (blaue Kreise, gestrichelte Linie,  $n = 6$ ) feuerte bei Strominjektionen bis 200 pA bis zu 220 Hz schnell und ebenfalls im *Burst*-Modus. WT-TC-Neurone in Anwesenheit von cAMP (graue Kreise, gestrichelte Linie,  $n = 5$ ) blieben durchgehend im niedrigfrequenten Bereich bis etwa 40 Hz, was tonischen Spannungsantworten entspricht (unteres Insert). Betrachtet man das Feuerverhalten bei hoher Strominjektion (400 pA) kann man bei allen untersuchten Genotypen tonische Antworten zwischen 100 und 160 Hz beobachten. Dieses Ergebnis zeigt, dass HCN2EA-Neurone auch in der Lage sind tonische Spannungsantworten zu zeigen.

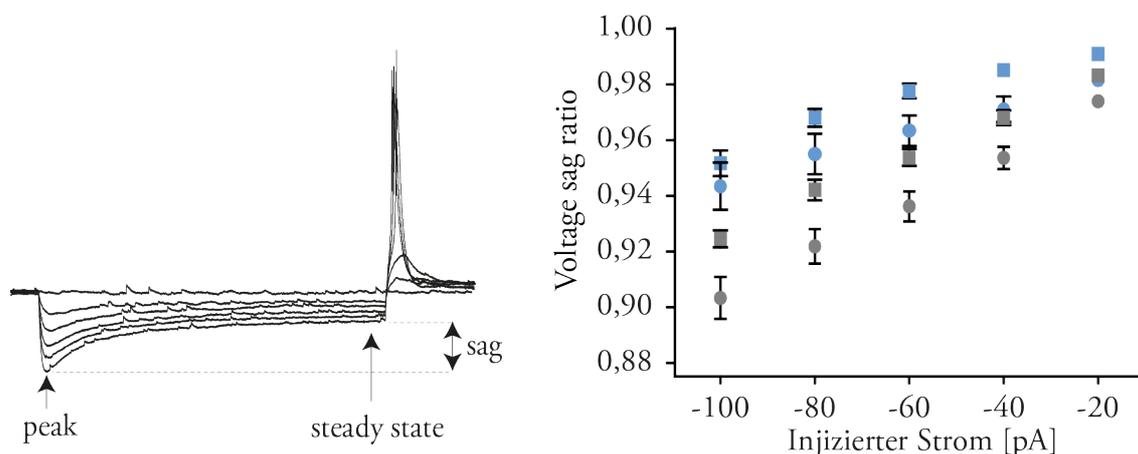


**Abbildung 23: Frequenz der Aktionspotentiale thalamokortikaler Neurone im VB.** Gezeigt wird die Frequenz gemessen in thalamokortikalen Neuronen in HCN2EA-Mäusen in Abwesenheit (blaue Vierecke) und Anwesenheit (blaue Kreise) von  $1 \mu\text{M}$  cAMP, sowie in WT-Mäusen in Abwesenheit (graue Vierecke) und Anwesenheit (graue Kreise) von  $1 \mu\text{M}$  cAMP in Reaktion auf unterschiedliche Strominjektionen. In gestrichelten Kästchen hervorgehoben sind die für die jeweiligen Frequenzen repräsentativen Feuermodi.

Die Feuermuster der TC-Neurone sind im Zusammenspiel mit kortikothalamischen und retikulären Neuronen Ursprung verschiedener thalamischer Oszillationen. Die gezeigten Veränderungen in den Feuermustern der TC-Neurone ist daher ein starkes Indiz für einen wichtigen Einfluss der cAMP-Modulation des  $I_h$  auf die thalamischen Oszillationen auf *in vitro* Ebene.

#### 4.3.4 Einfluss der EA-Mutation auf den *voltage sag* in thalamokortikalen Neuronen des VB

Ein zusätzliches Kennzeichen von Neuronen, die HCN-Kanäle exprimieren, ist der *voltage sag*. Die Hyperpolarisation eines TC-Neurons führt durch die Aktivierung des  $I_h$  zu einer Depolarisation der Membranspannung. Die Differenz der dabei auftretenden maximalen Auslenkung des Membranpotentials und des stationären Membranpotentials bezeichnet man als *voltage sag* (Abbildung 24, links). Dividiert man den stationären Strom durch die maximale Auslenkung erhält man die *voltage sag ratio*, die für TC-Neurone des WT und der HCN2EA-Maus bestimmt wurde (Abbildung 24, rechts). Hohe Werte der *voltage sag ratio* weisen auf einen kleinen *voltage sag* hin. In Abwesenheit von cAMP zeigen HCN2EA-Neurone (blaue Vierecke,  $n = 11$ ) eine deutlich größere *sag ratio* als die des WT (graue Vierecke,  $n = 13$ ). In WT-TC-Neuronen verringerte sich die *sag ratio* in Anwesenheit von  $1 \mu\text{M}$  cAMP bei allen injizierten Stromschritten (graue Kreise,  $n = 10$ ), was auf eine Modulation des  $I_h$  durch cAMP hinweist. Im Gegensatz dazu zeigten HCN2EA-TC-Neurone in Anwesenheit von cAMP (blaue Kreise,  $n = 7$ ) einen solchen Effekt nur in niedrigen Strominjektionen ( $-20 - (-60 \text{ pA})$ ) was auf eine eingeschränkte Modulation hindeutet. Unter diesen Bedingungen erreichte die *sag ratio* auch das Niveau der WT-Werte in Anwesenheit von cAMP. Für alle gemessenen Konditionen gilt, dass eine stärkere Hyperpolarisation zu niedrigeren *sag ratios* führt.



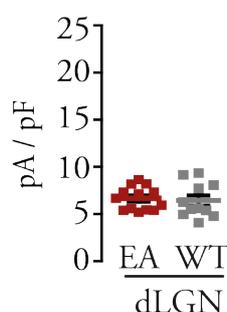
**Abbildung 24: *Voltage sag ratio* thalamokortikaler Neurone im VB.** Links: Beispielmessung des *voltage sag*. Der *sag* ist definiert als die Differenz aus dem *peak* (die maximale Spannungsauslenkung nach einer hyperpolarisierenden Strominjektion) und dem *steady state* (dem stationären Membranpotential). Die *ratio* wird, wie in Material und Methoden beschrieben, berechnet. Rechts: *Voltage sag ratio* thalamokortikaler Neurone in HCN2EA-Mäuse in Abwesenheit (blaue Vierecke) und Anwesenheit (blaue Kreise) von  $1 \mu\text{M}$

cAMP und in WT-Neuronen in Abwesenheit (graue Vierecke) und Anwesenheit (graue Kreise) von 1  $\mu$ M cAMP.

#### 4.4 Elektrophysiologische Charakterisierung des HCN2EA-Kanals im dLGN

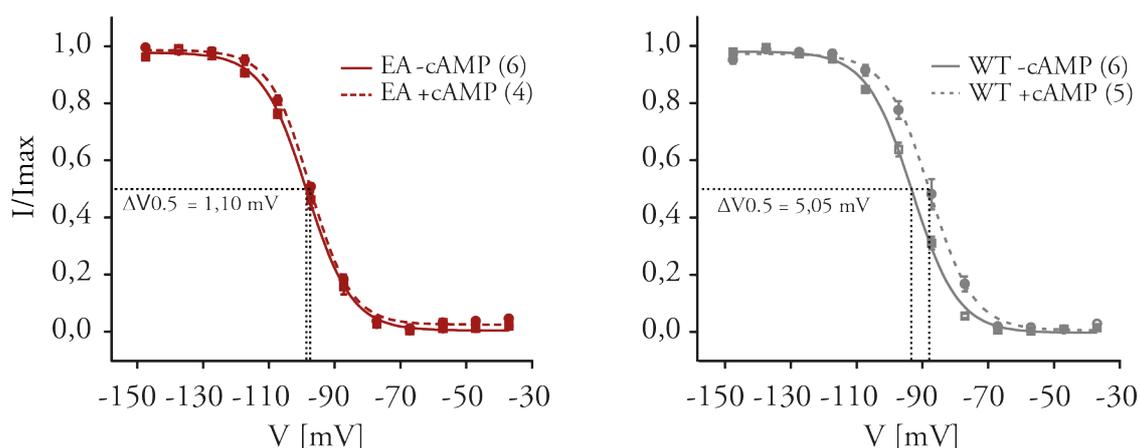
##### 4.4.1 Einfluss der EA-Mutationen auf die grundlegenden Eigenschaften des $I_h$ in thalamokortikalen Neuronen des dLGN

Auch im dLGN konnte auf Proteinebene HCN2 nachgewiesen werden. Das im Vergleich zum VB unterschiedliche Expressionsmuster der HCN-Kanäle im dLGN lässt die Frage aufkommen, wie sich die EA-Mutationen hier auswirken. Hierzu wurden zuerst *Voltage-Clamp*-Messungen an TC-Neuronen durchgeführt.



**Abbildung 25: Stromdichte thalamokortikaler Neurone im dLGN.** Stromdichte der TC-Neurone in HCN2EA-Mäusen (rote Vierecke) und in WT-Mäusen (graue Vierecke). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. \*\*p < 0,01

Die Stromdichte war dabei in den HCN2EA-TC-Neuronen (rote Vierecke, n = 13) im Vergleich zu den WT-TC-Neuronen (graue Vierecke, n = 11) mit Werten von  $6,65 \pm 0,34$  pA / pF bzw.  $6,45 \pm 0,55$  pA / pF auf einem ähnlichen Niveau (Abbildung 25). Wie im VB, in dem ebenfalls kein Unterschied der Stromdichte zwischen den Genotypen festgestellt werden konnte, ist das Ergebnis ein Indiz dafür, dass das spannungsabhängige *gating* des HCN2EA-Kanals nicht beeinträchtigt ist. Im Gegensatz zur Stromdichte betrug die gemessene Aktivierungskinetik für die HCN2EA-TC-Neurone  $251,66 \pm 9,09$  ms (n = 8) und war im Vergleich zu WT-TC-Neuronen mit  $166,46 \pm 11,29$  ms (n = 7) signifikant verlangsamt (Datentabellen). Diese Beobachtungen lassen Rückschlüsse auf eine ebenfalls im dLGN eingeschränkte cAMP-Modulation des HCN2EA-Kanals zu.



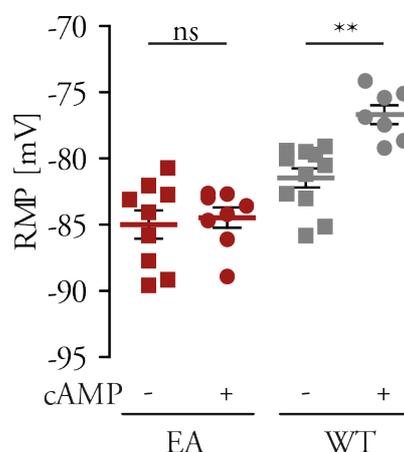
**Abbildung 26: Spannungsabhängige Aktivierung thalamokortikaler Neurone im dLGN.** Links: Spannungsabhängige Aktivierung der TC-Neurone in HCN2EA-Mäusen in Abwesenheit (rote Vierecke) und in Anwesenheit von  $1 \mu\text{M}$  cAMP (rote Kreise). Rechts: Spannungsabhängige Aktivierung der TC-Neurone in WT-Mäusen in Abwesenheit (graue Vierecke) und in Anwesenheit von  $1 \mu\text{M}$  cAMP (graue Kreise).

Dieses Ergebnis wurde durch die Untersuchung der halbmaximalen  $V_{0,5}$  bekräftigt. In HCN2EA-TC-Neuronen betrug die  $V_{0,5}$  in Abwesenheit von cAMP  $-99,07 \pm 0,80 \text{ mV}$  ( $n = 6$ ) und verschob sich in Anwesenheit von  $1 \mu\text{M}$  cAMP nicht wesentlich auf einen Wert von  $-98,87 \pm 0,43 \text{ mV}$  ( $n = 4$ ; Abbildung 26, links). Im Gegensatz dazu verlagerte sich die  $V_{0,5}$  in WT-TC-Neuronen von  $-94,57 \pm 0,77 \text{ mV}$  ( $n = 6$ ) in Abwesenheit von cAMP auf  $-89,51 \pm 1,31 \text{ mV}$  ( $n = 5$ ) nach Zugabe von  $1 \mu\text{M}$  cAMP signifikant um  $5,05 \text{ mV}$  (Abbildung 26, rechts). Diese Differenz ähnelt der im VB beschriebenen Verlagerung im WT und deutet auf eine uneingeschränkte cAMP-Modulation hin. Dass die  $V_{0,5}$  in den HCN2EA-Neuronen des dLGN durch cAMP nicht verändert wurde, ist ein starkes Indiz für die cAMP-Insensitivität der HCN2-Isoform in diesem Nukleus. An dieser Stelle wird die Relevanz der unterschiedlichen Expressionsmuster im VB und dLGN deutlich, da sich die unterschiedlichen Reaktionen der  $V_{0,5}$  durch die nur im VB exprimierte HCN4-Isoform erklären lassen. Zusammengefasst deuten die Ergebnisse der *Voltage-Clamp*-Messungen darauf hin, dass die EA-Mutationen sowohl im VB als auch im dLGN zu einer cAMP-insensitiven HCN2-Mutante führen.

#### 4.4.2 Einfluss der reduzierten cAMP-Sensitivität des HCN2-Kanals auf das Ruhemembranpotential in thalamokortikalen Neuronen des dLGN

Die Auswirkungen der reduzierten cAMP-Sensitivität des HCN2-Kanals in den EA-Mäusen, sollte auch im dLGN mit unterschiedlichen Messprotokollen elektrophysiologisch untersucht werden.

In Hirnschnitten wurden dazu TC-Neurone im *Current-Clamp*-Modus geklemmt, das RMP gemessen und in Anwesenheit und Abwesenheit von cAMP analysiert (Abbildung 27).



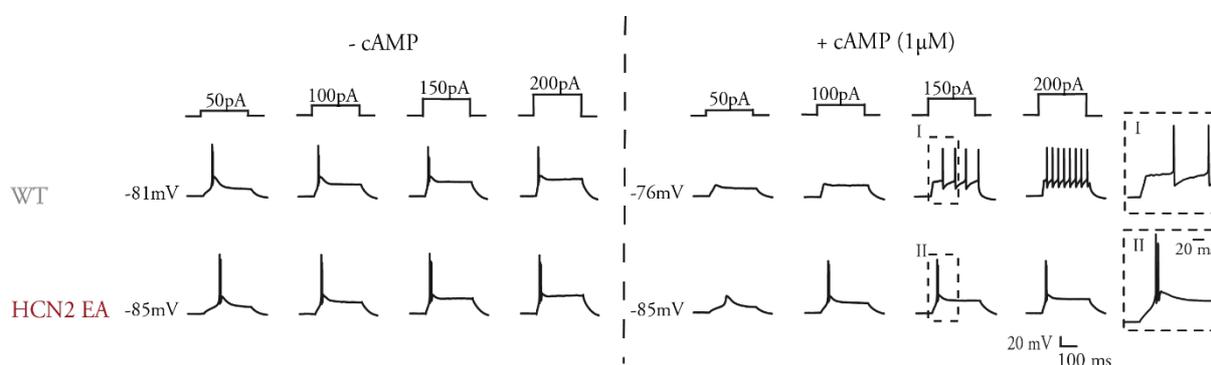
**Abbildung 27: Das Ruhemembranpotential thalamokortikaler Neurone im dLGN.** Gezeigt wird das Ruhemembranpotential (RMP) gemessen in TC-Neuronen der HCN2EA-Mäuse in Abwesenheit (rote Vierecke) und Anwesenheit (rote Kreise) von 1  $\mu$ M cAMP, sowie in WT-Mäusen in Abwesenheit (graue Vierecke) und Anwesenheit (graue Kreise) von 1  $\mu$ M cAMP. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. \*\*p < 0,01

Für HCN2EA-TC-Neurone wurden in Abwesenheit von cAMP-Werte von  $-84,99 \pm 1,08$  mV (rote Vierecke, n = 9) und in Anwesenheit von 1  $\mu$ M cAMP-Werte von  $-84,47 \pm 0,76$  mV (rote Kreise, n = 8) gemessen. Damit hatte cAMP keine Auswirkung auf das RMP der TC-Neurone in HNC2EA-Hirnschnitten und bestätigt damit sowohl die Ergebnisse der *Voltage-Clamp*-Messungen als auch die Auswirkung der unterschiedlichen Expressionsmuster der HCN-Isoformen in VB und dLGN. Bei den WT-Neuronen wurden Werte von  $-81,46 \pm 0,72$  mV in Abwesenheit (graue Vierecke, n = 11) und  $-76,69 \pm 0,71$  mV in Anwesenheit von cAMP (graue Kreise, n = 7) beobachtet. Die beobachtete Depolarisation des RMP ist eine Reaktion des WT- $I_h$  auf cAMP. Es fiel außerdem das tendenziell hyperpolarisiertere RMP der HCN2EA-TC-Neurone auf, das einen zusätzlichen Hinweis auf eine deaktivierte cAMP-Modulation in diesen Neuronen darstellt.

#### 4.4.3 Veränderte Feuereigenschaften thalamokortikaler Neurone im dLGN der HCN2EA-Maus

Da bereits im VB das durch den eingeschränkt cAMP-sensitiven  $I_h$  hyperpolarisierte RMP zu veränderten Feuermustern der dortigen TC-Neurone führte, sollte im dLGN festgestellt werden, ob sich ein ähnliches Feuerverhalten beobachten ließe. Dazu wurde zunächst das Feuerverhalten

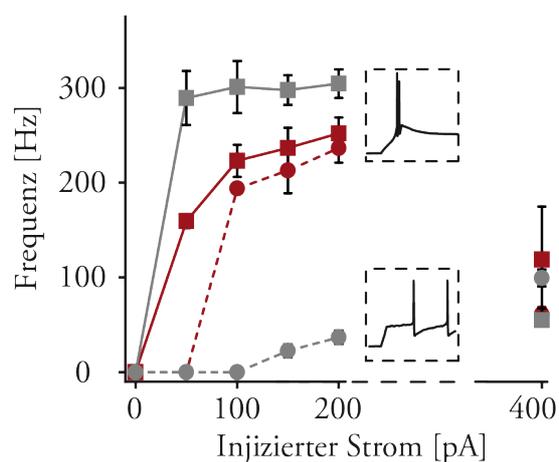
der WT-TC-Neurone im dLGN bei Strominjektionen von 50-200 pA in Abwesenheit von cAMP untersucht (Abbildung 28, oben links).



**Abbildung 28: Feuermodi thalamokortikaler Neurone in Abhängigkeit von cAMP im dLGN.**

Spannungsantworten der TC-Neurone aus WT- (grau) und HCN2EA- (rot) Mäusen auf unterschiedliche Strominjektionen in Abwesenheit (links) und Anwesenheit (rechts) von 1 μM cAMP. Die Strominjektionen erfolgten von den vor den Spuren indizierten Ruhemembranpotentialen. Zoom I und II zeigen die unterschiedlichen Feuermodi in Anwesenheit von cAMP bei einer Strominjektion von 150 pA (I: Tonischer Modus; II: *Burst*-Modus).

Unter diesen Bedingungen feuerten die Neurone im *Burst*-Modus. Bei gleichen Strominjektionen zeigte der WT in Anwesenheit von cAMP ein tonisches Feuerverhalten (Abbildung 28, oben rechts). HCN2EA-Neurone feuerten bei Strominjektionen bis 200 pA, wie der WT, im *Burst*-Modus (Abbildung 28, unten links), wechselten in Anwesenheit von cAMP jedoch nicht in tonisches Feuerverhalten, sondern blieben weiterhin im *Burst*-Modus (Abbildung 28, unten rechts). Die Modulation des  $I_h$  durch cAMP kann in WT-TC-Neuronen einen Übergang des Feuerverhaltens vom *Burst*-Modus zum tonischen Modus bewirken. Eine solche Modulation ist in den HCN2EA-Neuronen ausgeschaltet, was zu einem Verharren im *Burst*-Modus führt (Abbildung 28, Zoom bei 150 pA, gekennzeichnet durch gestrichelte Linie. I: tonischer Modus. II: *Burst*-Modus).

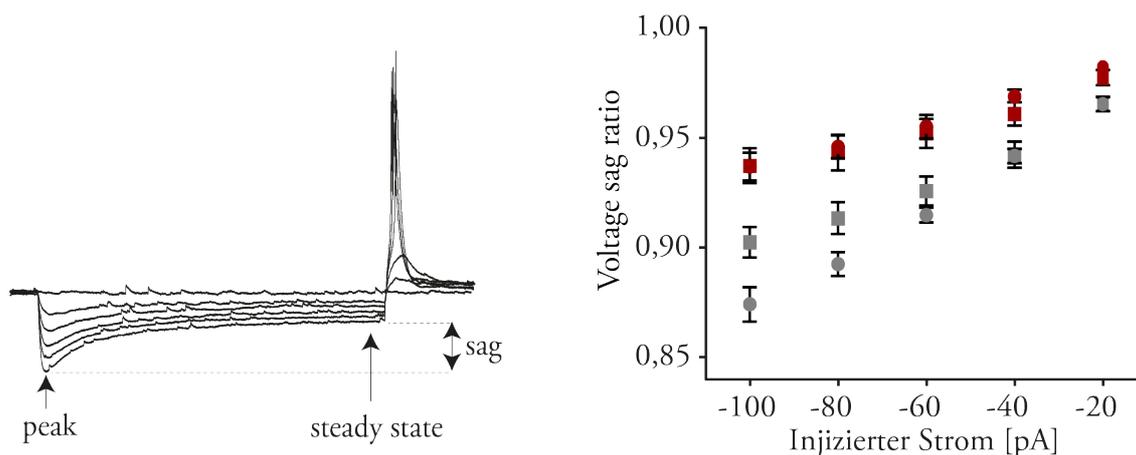


**Abbildung 29: Frequenz der Aktionspotentiale thalamokortikaler Neurone im dLGN.** Gezeigt wird die Frequenz gemessen in TC-Neuronen in HCN2EA-Mäusen in Abwesenheit (rote Vierecke) und Anwesenheit (rote Kreise) von  $1 \mu\text{M}$  cAMP, sowie in WT-Mäusen in Abwesenheit (graue Vierecke) und Anwesenheit (graue Kreise) von  $1 \mu\text{M}$  cAMP in Reaktion auf unterschiedlichen Strominjektionen. In gestrichelten Kästchen hervorgehoben sind die für die jeweiligen Frequenzen repräsentativen Feuermodi.

Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurden die Frequenzen der Aktionspotentiale bestimmt (Abbildung 29). WT-Neurone in Abwesenheit von cAMP ( $n = 4$ ; graue Vierecke, durchgezogene Linie) feuerten bei Strominjektionen von 50 bis 200 pA mit etwa 300 Hz. HCN2EA-Neurone feuerten sowohl in Abwesenheit von cAMP ( $n = 5$ ; rote Vierecke, durchgezogene Linie) als auch in Anwesenheit von  $1 \mu\text{M}$  cAMP ( $n = 3$ ; rote Kreise, gestrichelte Linie) mit Frequenzen von 160-250 Hz im *Burst*-Modus. WT-TC-Neurone in Abwesenheit von cAMP ( $n = 3$ ; graue Kreise, gestrichelte Linie) feuerten hingegen mit bis zu 50 Hz was dem niedrigfrequenten tonischen Modus entspricht. Bei einer Strominjektion von 400 pA feuerten alle Genotypen in jeder getesteten Kondition mit etwa 100 Hz im tonischen Modus. Das beweist, dass auch HCN2EA-TC-Neurone grundsätzlich in der Lage sind in beiden Feuermodi zu antworten. Allerdings ist eine Strominjektion von 400 pA nicht mehr physiologisch sinnvoll. Zusammenfassend unterstreichen diese Ergebnisse die Auswirkung der cAMP gesteuerten Modulation des  $I_h$  auf das Feuerverhalten der TC-Neurone.

#### 4.4.4 Einfluss der EA-Mutation auf den *voltage sag* in thalamokortikalen Neuronen des dLGN

Auch im dLGN wurde die *voltage sag ratio* als zusätzliches Indiz für die Funktionsfähigkeit des  $I_h$  untersucht (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Voltage sag ratio thalamokortikaler Neurone im dLGN.** Links: Beispielmessung des *voltage sag*. Der *sag* ist definiert als die Differenz aus dem *peak* (die maximale Spannungsauslenkung nach einer hyperpolarisierenden Strominjektion) und dem *steady state* (dem stationären Strom). Die *ratio* wird wie in Material und Methoden beschrieben berechnet. Rechts: *Voltage sag ratio* der TC-Neurone in HCN2EA-Mäusen in Abwesenheit (rote Vierecke) und Anwesenheit (rote Kreise) von 1  $\mu$ M cAMP und in WT-Neuronen in Abwesenheit (graue Vierecke) und Anwesenheit (graue Kreise) von 1  $\mu$ M cAMP.

HCN2EA-TC-Neurone in Abwesenheit von cAMP ( $n = 9$ ; rote Vierecke) erreichten bei allen durchgeführten hyperpolarisierenden Strominjektionen (-20 bis -100 pA) höhere Werte als der WT ohne cAMP ( $n = 11$ ; graue Vierecke). Die *voltage sag ratio* des WT reagierte sensitiv auf cAMP und fiel bei -100 und -80 pA in Anwesenheit von cAMP ( $n = 7$ ; graue Kreise) auf niedrigere Werte, was einem größeren *sag* entspricht. Dahingegen blieben die Werte der HCN2EA-TC-Neurone in Anwesenheit von cAMP ( $n = 9$ ; rote Kreise) unverändert. Die Werte der HCN2EA-TC-Neurone in An- und Abwesenheit von cAMP sind bei allen Strominjektionen höher als bei den WT-TC-Neurone. Auch diese Ergebnisse bekräftigen weiterhin Hinweise für eine deaktivierte cAMP-Modulation der HCN2EA-Kanäle und die direkte Auswirkung auf die Eigenschaften der TC-Neurone.

## 5 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden elektrophysiologische Experimente an akuten Gehirnschnitten einer cAMP-insensitiven HCN2-Mausmutante (HCN2EA) durchgeführt. Die Ergebnisse ermöglichen detaillierte Rückschlüsse über die Rolle der cAMP-Modulation des HCN2-Kanals im thalamokortikalen Netzwerk.

Mit Hilfe des HCN2EA-Mausmodells konnte erstmals die spezifische Untersuchung der neuronalen Funktion der cAMP-Modulation einer HCN-Isoform erfolgen, ohne die grundsätzliche Spannungsabhängigkeit des Kanals zu beeinträchtigen. Bisherige Untersuchungen nutzten pharmakologische Blocker des  $I_h$  oder die Beeinflussung des cAMP-Signalwegs *upstream* der HCN-Kanäle. Bei letzterem konnte durch Applikation von Serotonin, Noradrenalin, Histamin oder Stickstoffmonoxid eine Hochregulation oder mit Adenosin eine Herabregulation des intrazellulären cAMP-Spiegels über die Regulation der Adenylatzyklase erreicht werden, die sich wiederum auf die Aktivität der HCN-Kanäle auswirkt. Außerdem gibt es weitere cAMP-Rezeptoren, wie Kinasen, Phosphodiesterasen (PDE's) oder *exchange protein directly activated by cAMP* (EPAC's), die durch diesen *second messenger* moduliert werden können und so ebenfalls die Zellfunktionen beeinflussen. Deshalb erlauben diese Ansätze keine differenzierten Einblicke in die Funktion des cAMP-*gatings* der HCN-Kanäle. Eine weitere Herausforderung besteht darin, dass die Trennung der cAMP-Modulation und des spannungsabhängigen *gatings* aufgrund der strukturellen Nähe innerhalb des Moleküls nicht möglich ist. Es gibt eine Studie, die ein synthetisches Peptid, das auf TRIP8b basiert, nutzt und auf diese Weise die cAMP-Regulation von HCN-Kanälen verhindert (Saponaro A 2018). Dieser Ansatz hat jedoch den Nachteil, dass das Peptid von der cytosolischen Seite der Zelle aus appliziert werden muss. Damit sind Versuche mit Geweben, Organen oder *in vivo* in tierischen Organismen ausgeschlossen. Der gewählte genetische Ansatz ermöglicht eine isoformspezifische Ausschaltung der cAMP-Modulation und ermöglicht darüber hinaus nicht nur Experimente auf zellulärer, sondern auch auf systemischer Ebene. Eine Beeinflussung weitere cAMP-*targets* ist somit ebenfalls ausgeschlossen. Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten elektrophysiologischen Experimente konnten deshalb auf *in vitro* Ebene detaillierte Erkenntnisse der cAMP-Regulation bezogen auf die physiologische Bedeutung im Thalamus generieren.

Dabei konnte zunächst in *Voltage-Clamp*-Messungen bestätigt werden, dass die HCN2EA-Kanäle cAMP-insensitiv sind, aber ihre grundsätzliche Spannungsabhängigkeit intakt bleibt. Dies zeigte sich darin, dass sich die halbmaximale Aktivierung ( $V_{0,5}$ ) in Anwesenheit von cAMP nicht wie beim

Wildtyp (WT) zu positiveren Werten hin verschob. Diese Beobachtung deckt sich mit bereits publizierten Überexpressionsexperimenten des HCN2EA-Kanals in Reaktion auf andere zyklische Nukleotide (Zong et al. 2012). Im Gegensatz zu diesen, ermöglichte das HCN2EA-Mausmodell diese Untersuchung erstmals in akuten Hirnschnitten. Gleichzeitig war die gemessene Stromdichte des Kanals nicht verändert, ein Indiz für eine intakte spannungsabhängige Aktivierung. Außerdem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass schon die basalen cAMP-Level Einfluss auf die Kanalfunktion haben. Dies verdeutlichen die zu negativeren Werten hin verschobenen  $V_{0,5}$ -Werte in den HCN2EA-Mäusen und die langsameren Aktivierungskinetiken, die ohne zusätzliche cAMP-Zugabe gemessen wurden.

Die Ergebnisse der *Current-Clamp*-Messungen veranschaulichen direkte physiologische Auswirkungen der verminderten cAMP-Sensitivität des HCN2-Kanals und bestätigen die Rolle des  $I_h$  in der Determination des Ruhemembranpotentials (RMP) der thalamokortikalen (TC) Neurone. Das RMP der TC-Neurone der HCN2EA-Maus war im Vergleich zum WT hyperpolarisiert und wurde durch cAMP nicht depolarisiert. Die unterschiedlichen Feuermodi der TC-Neurone (*Burst*-Modus und tonischer Modus) hängen wesentlich vom RMP ab. Das im Vergleich zum WT um einige Millivolt hyperpolarisiertere Membranpotential der EA-Neurone führte in Anwesenheit von cAMP zu einem Verharren im *Burst*-Modus. Die Beobachtungen decken sich mit zuvor publizierten Ergebnissen. Auch bei der HCN2KO-Maus feuern TC-Neurone in Anwesenheit von cAMP im *Burst*-Modus (Ludwig et al. 2003). Dabei ist das RMP durch den *knockout* des HCN2-Kanals noch stärker hyperpolarisiert. Die Tatsache, dass EA-Neurone bereits bei einer, in Relation zu den HCN2KO-Neuronen, geringeren Hyperpolarisation ihres RMP im *Burst*-Modus feuern, zeigt wie präzise das Zwischenspiel der einzelnen Ionenströme, das den jeweiligen Feuereigenschaften zu Grunde liegt, aufeinander abgestimmt ist. Das Feuern im tonischen Modus war unter diesen Umständen nur mit starken Strominjektionen zu erreichen. Computermodellen suggerierten schon in den 1990er Jahren, dass bereits kleine Unterschiede in der Spannungsabhängigkeit des  $I_h$  großen Einfluss auf das rhythmische Feuerverhalten der TC-Neurone haben können (McCormick and Bal 1997). Die zu negativeren Werten hin verschobene  $V_{0,5}$  der EA-Neurone und das daraus resultierende veränderte Feuerverhalten bestätigen diese Aussagen. Darüber hinaus ist diese Veränderung alleine auf die cAMP-Modulation des HCN2-Kanals zurückzuführen. Die bisherigen Beobachtungen in den Epilepsie-Rattenmodellen GAERS und WAG/Rij diskutierten eine Rolle der cAMP-Modulation auf Grundlage einer erhöhten HCN1-Expression, die indirekt die cAMP-Sensitivität des im Thalamus vorkommenden  $I_h$  erniedrigte. Weil HCN1 eine geringere cAMP-Sensitivität besitzt als HCN2 und HCN4, wird bei

einer erhöhten Expression von HCN1 im Thalamus der Anteil der cAMP-sensitiven  $I_h$ -Komponenten erniedrigt. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen hingegen zum ersten Mal konkret die Auswirkungen auf das Feuerverhalten durch den Verlust der cAMP-Modulation des HCN2-Kanals und bestätigen Hypothesen, die auf Grundlage der Epilepsie-Rattenmodelle erstellt wurde.

Die bisher beschriebenen Erkenntnisse gelten für die untersuchte thalamische Region des dLGN und mit Einschränkung auch für den VB. Die TC-Neurone des VB zeigten, trotz klarer Reduktion der cAMP-Sensitivität, eine immer noch cAMP-modulierbare HCN4-Restkomponente. Beide Beobachtungen passen zu den Expressionsmustern im jeweiligen Nukleus. Im dLGN ist nur HCN2 exprimiert, weshalb die cAMP-Sensitivität in diesem Nukleus durch die HCN2EA-Mutation komplett ausgeschaltet ist. Im VB ist neben einer starken Expression der HCN2-Isoform auch ein nicht unwesentlicher Teil HCN4 exprimiert. Da HCN4 ebenfalls stark durch cAMP moduliert wird, kann dies die cAMP-sensitive Komponente des  $I_h$  in diesem Nukleus erklären, die trotz der HCN2EA-Mutation gemessen wurde. Diese Modulation kompensiert die durch den HCN2EA-Kanal entstehenden Einschränkungen aber nicht in vollem Umfang, da auch in Anwesenheit von cAMP im VB kein tonisches Feuerverhalten beobachtet werden kann. Damit scheint der Effekt der cAMP-Regulation der HCN4-Isoform für die Steuerung der Feuereigenschaften der TC-Neurone im VB von nicht so entscheidender Bedeutung wie der der HCN2-Isoform. Diese Beobachtung lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass HCN2- und HCN4-Kanäle in unterschiedlichen Kompartimenten der TC-Neurone exprimiert sind oder die durch cAMP hoch regulierbare HCN4-Komponente des  $I_h$  nicht ausreicht, um ein normales Feuerverhalten der Neurone aufrecht zu erhalten. Daraus ergibt sich die interessante Frage der genauen physiologischen Relevanz des HCN4-Kanals im VB, die es zukünftig zu klären gilt. Experimente bei denen der HCN4-Kanal gezielt im VB deletiert wurde sprechen gegen eine Rolle des Kanals bei der Entstehung von *Absence*-Epilepsie (Hammelman et al. 2019). Die Deletion erfolgte durch stereotaktische Injektion Adeno-assoziiierter Viren (AAV) in den VB gefloxter HCN4-Mäuse (HCN4<sup>fl/fl</sup>). Die AAVs enthielten einen Vektor zur Expression einer Cre-Rekombinase unter einem Neuronen-spezifischen, humanen Synapsin-Promotor. Durch die Coexpression von EGFP wurde sichergestellt, dass nur Zellen im VB transfiziert wurden. Zwei Wochen später durchgeführte EEG-Messungen zeigten keine SWDs. Diese Ergebnisse decken sich mit einer kürzlich veröffentlichten Studie, in der ein Mausmodell mit Gehirn-spezifischer HCN4-Deletion etabliert wurde (Zobeiri et al. 2019). Dieses wurde generiert indem man gefloxt HCN4-Mäuse (HCN4<sup>fl/fl</sup>) mit Nestin-Cre-Mäusen kreuzte. Obwohl mit Hilfe

elektrophysiologischer Methoden eine Reduktion des  $I_h$  in den TC-Neuronen dieser Mäuse nachgewiesen werden konnte, zeigten weder EEG-Messungen, noch *local field potential* Messungen SWDs. Auch wenn damit eine Rolle des HCN4-Kanals in der Entstehung von *Absence*-Epilepsie unwahrscheinlich ist, zeigten Aktivitätsmessungen mittels extrazelluläre Multiunit-Messungen nach Stimulation der *Capsula interna*, dass HCN4-Kanäle einen Beitrag zum Erhalt intrathalamischer Oszillationen leisten. Dabei gilt zu bedenken, dass das in dieser Studie verwendete Mausmodell, im Gegensatz zu dem HCN2EA-Mausmodell, den gesamten HCN4-Kanal im Gehirn deletiert. Die Generierung eines HCN4EA-Mausmodell könnte somit einen weiteren differenzierteren Beitrag zur Erforschung der Rolle des HCN4-Kanals im Thalamus leisten. Ein weiteres interessantes Ergebnis zeigten Patch-Clamp-Experimente an TC-Neuronen des VB der HCN4-deletierten Mäuse. In diesen konnte immer noch eine cAMP-sensitive  $I_h$  Komponente nachgewiesen werden, die auf den dort ebenfalls exprimierten HCN2-Kanal zurückzuführen ist. Zusammengenommen mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie unterstreicht diese Beobachtung eine bedeutende Rolle der cAMP-Modulation des HCN2-Kanals in der Entstehung von *Absence*-Epilepsie. Das Expressionsniveau des HCN2-Kanals ist weder im gesamten Gehirn noch in den für diese Studie wichtigen thalamischen Regionen verändert. Die gezeigten Ergebnisse sind daher nicht durch diesen Faktor beeinflusst.

Die Erkenntnisse, die durch die generierten elektrophysiologischen Daten gewonnen werden konnten, sind in Abbildung 31 als Modell zusammengefasst. In Abwesenheit von cAMP kann ein bestimmter Teil der HCN2-Kanäle aktiviert werden (linke *steady state* Aktivierungskurve, ausgefüllte Kreise). Darüber hinaus ist es möglich die Kanalaktivität der WT-HCN2-Kanäle, abhängig von der vorliegenden cAMP-Konzentration, um einen cAMP-sensitiven Anteil zu erhöhen (rechte *steady state* Aktivierungskurve, offene Kreise). Daraus resultiert ein dynamischer Bereich (rot gekennzeichnet) in dem die Kanalaktivität, basierend auf den zellulären Anforderungen, durch die cAMP-Konzentration variieren kann (Abbildung 31 a). In WT-Mäusen kann die Kanalaktivität in vollem Umfang moduliert werden. Die untersuchten HCN2EA-Kanäle sind hingegen cAMP-insensitiv. In dem physiologisch relevanten Bereich zwischen -90 mV und -70 mV kann der durch ein verändertes zelluläres cAMP-Niveau hervorgerufene Unterschied der Kanalaktivität eines HCN2-Kanals bis zu 300% betragen. In Abwesenheit von cAMP ist nur ein Drittel des Stroms verfügbar (Abbildung 31 b). Die unterschiedliche Reaktion auf cAMP hat Auswirkungen auf den Feuermodus der TC-Neurone. In WT-Mäusen feuern diese Neurone in Abwesenheit von cAMP im *Burst*-Modus, der in Anwesenheit von cAMP in tonisches Feuern übergeht. Dieser Wechsel ist in HCN2EA-TC-Neuronen aufgrund der fehlenden cAMP-

Sensitivität weniger wahrscheinlich (Abbildung 31 c). Ein Verbleib im stabileren *Burst*-Modus ist die Folge.

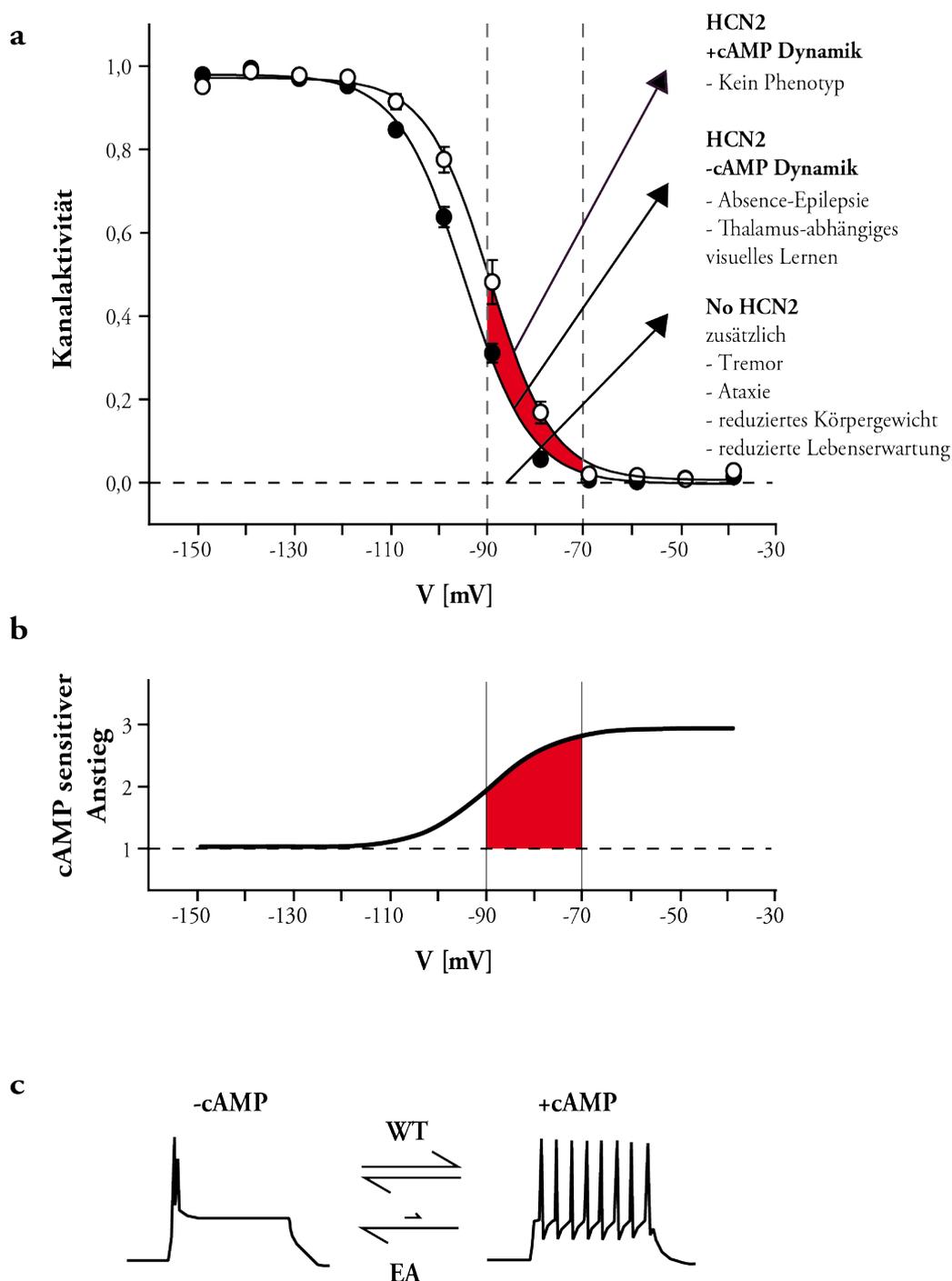


Abbildung 31: Model der physiologischen Rolle der cAMP-sensitiven Modulation des HCN2-Kanals auf Kanal-, Zell- und in vivo Ebene. a) Exemplarische *steady state* Aktivierungskurve in Abwesenheit (ausgefüllte Kreise) und in Anwesenheit (offene Kreise) von intrazellulärem cAMP in TC-

Neuronen. Der Bereich innerhalb der gestrichelten vertikalen Linien (- 90 mV bis - 70 mV) kennzeichnet den physiologischen Bereich des Membranpotentials. Der rote Bereich kennzeichnet die dynamische Spannweite der Kanalaktivität, die durch cAMP rekrutiert werden kann. HCN2EA-Kanäle können cAMP nicht binden und reagieren deshalb nicht auf Änderungen in der cAMP-Konzentration. Rechts: Phänotypen, die mit bestimmten Regionen der Kanalaktivität (mit Pfeilen gekennzeichnet) korrespondieren (HCN2-Kanäle mit dynamischer cAMP Regulation, HCN2-Kanäle ohne dynamischer cAMP-Regulation und keine HCN2-Kanäle vorhanden). **b)** Abgeleitet aus den Aktivierungskurven (gezeigt in a) wird der Anstieg der Kanalaktivität in Anwesenheit im Vergleich zu in Abwesenheit von cAMP gezeigt (Berechnung:  $(I/I_{\text{max}} + \text{cAMP}) / (I/I_{\text{max}} - \text{cAMP})$  Aktivierungskurven gefittet mit Boltzmann mit  $A1=1$ ;  $A2=0$ ;  $\text{slope}=5,5$ . Der rote Bereich zeigt die dynamische Bandbreite des cAMP-sensitiven Anstiegs der Kanalaktivität. **c)** Skizze der typischen Feuermodi von TC-Neuronen in Wildtyp-Mäusen in Abwesenheit von cAMP (*Burst*-Modus, links) und in Anwesenheit von cAMP (tonischer Modus, rechts). In diesen Neuronen kann der Feuermodus in Abhängigkeit des intrazellulären cAMP-Spiegels wechseln. In HCN2EA-TC-Neuronen ist der Wechsel von *Burst*- zu tonischem Modus in Anwesenheit von cAMP weniger wahrscheinlich und verbleibt eher stabil im *Burst*-Modus (modifiziert nach Hammelmann et al. 2019).

Die bisher beschriebenen Erkenntnisse beruhen vor allem auf Experimenten, die auf *in vitro* Ebene durchgeführt wurden. Dabei ist das thalamokortikale Netzwerk nicht vollständig intakt, da die Verbindungen zum Cortex durch die verwendete Präparation nicht erhalten bleiben. Vorherige Publikationen zeigten bei einem kompletten HCN2 *knockout* auf systemischer Ebene Phänotypen wie *Absence*-Epilepsie, Tremor, Ataxie, sowie ein reduziertes Körpergewicht und eine verkürzte Lebenserwartung (Abbildung 31 a, rechts). Um zu sehen, ob sich die veränderten Feuermuster der TC-Neurone des HCN2EA-Mausmodells auch *in vivo* auf das Verhalten auswirken, wurden im Labor von Professor Biel durch Frau Dr. Saskia Spahn EEG-Messungen durchgeführt (Spahn 2015; Hammelmann et al. 2019). HCN2EA-Mäuse zeigten SWDs in EEG-Messungen und kurze Episoden von fehlendem Bewusstsein. Beide Ergebnisse stellen typische Merkmale der generalisierten Epilepsie des *Absence*-Epilepsietyps dar. Sie verdeutlichen, dass die EA-Mutation des HCN2-Kanals ausreichend ist, um das thalamokortikale Netzwerk in einen pathologischen Status zu versetzen. Phänotypen wie Ataxie, Tremor, reduziertes Körpergewicht und Lebenserwartung wurden allerdings nicht beobachtet. Die unterschiedlichen Phänotypen der HCN2KO-Maus und des HCN2EA-Mausmodells differenzieren damit die Erkenntnisse über die Bedeutung der cAMP-Modulation des HCN2-Kanals für die Entstehung von generalisierter Epilepsie. Außerdem verdeutlichen sie, dass der Verlust der dynamischen cAMP-Regulation die Funktion des HCN2-Kanals nicht komplett einschränkt. So scheint die dynamische Modulation im thalamokortikalen Netzwerk eine Rolle zu spielen, nicht jedoch in Netzwerken, die Bewegung

oder Körpergewicht steuern. Eine weitere Möglichkeit der Analyse der EEG-Messungen stellen Powerspektren dar, die Aussagen über die vorkommenden Oszillationen zulassen. Hierbei fiel auf, dass die Stärke der delta-Frequenzen bei 1-2,5 Hz in der HCN2EA-Maus erhöht war. Diese Frequenzbereiche werden auch durch die intrinsischen Oszillationen der TC-Neurone bestimmt und deuten auf eine erhöhte rhythmische Aktivität dieser Zellen, bedingt durch den favorisierten *Burst*-Modus, hin. Des Weiteren waren die Schlafspindel-Oszillationen bei 10-15 Hz erniedrigt, was für eine Rolle des HCN2-Kanals und seiner Modulation in der Generierung dieser Oszillationen spricht. Keine Veränderung zeigten die Daten jedoch beim Wechsel vom Schlaf zum Wachzustand, bei dem bisher eine mögliche Rolle der cAMP-Modulation in Betracht gezogen wurde. Diese ist allerdings nicht der einzige Faktor, der in diesem System eine Rolle spielt. Auch durch die Reduktion eines Kalium-Leakstroms ( $I_{Kl}$ ) kann eine erhöhte Depolarisation der TC-Neurone erfolgen, die so einen Wechsel einleiten kann (McCormick and Bal 1997).

Ein mögliches Modell für die Erklärung der *spike-and-wave discharges* (SWDs) in den HCN2EA-Mäusen auf Grundlage der Feuermodi der TC-Neurone ist folgendes. Im Thalamus wird der Wechsel von *Burst*-Modus in den Transmissions-Modus durch die cAMP-sensitive Hochregulation des HCN2-Kanals kontrolliert. Diese Regulation ist wichtig damit die Neurone im Wachsein im Transmissions-Modus verbleiben und so das Gehirn vor einer generalisierten Epilepsie bewahren. Die fehlende cAMP-Modulation der HCN2EA-Kanäle führt zu einer Hyperpolarisation des RMP's der TC-Neurone und erleichtert das Feuern dieser in dem *Burst*-Modus. Außerdem ist der Wechsel zum tonischen Feuern durch exzitatorischen Input und der damit verbundenen Membrandepolarisation der Neurone erschwert. Diese Umstände erklären die Tendenz der TC-Neurone in diesem semi-intakten, also grundsätzlich funktionsfähigen, aber pathologische Merkmale aufweisenden, Netzwerk niedrig frequentiertes und synchronisiertes Feuerverhalten zu zeigen. Auf Netzwerkebene führt dies zu der Förderung der Erregung retikulärer Neurone, die wiederum *in vivo* zu hypersynchronisierter Aktivität der retikulären-thalamischen und kortikal-thalamischen Netzwerken führt. Außerdem könnte die fehlende cAMP-Modulation des HCN2-Kanals zu einem Ungleichgewicht zwischen dem depolarisierenden einwärts gerichteten Strom des  $I_h$  und hyperpolarisierenden Strömen, wie z.B. Kaliumströmen, führen. Folglich wäre das Membranpotential während des tonischen Feuerns weniger stabil und somit anfälliger für störende Einflüsse. Diese Hypothese wird bestätigt durch die stabilisierende Rolle der HCN-Kanäle auf das Ruhemembranpotential in anderen Systemen. In diesem Fall würden durch IPSCs ausgelöste Fluktuationen, die auf Wildtyp-Neurone keinen Einfluss hätten, in HCN2EA-Neuronen repetitives Feuern der TC-Neurone im *Burst*-Modus auslösen, die wiederum zu Oszillationen auf

Netzwerkebene führen. Die Folge wäre eine reduzierte Stabilität des Transmissions-Modus und das spontane Umschalten der TC-Neurone in den *Burst*-Modus während des Wachseins.

Als weiteren Phänotyp konnte eine reduzierte Fähigkeit des visuellen Lernens bei den HCN2EA-Mäusen festgestellt werden. Der dLGN ist das wesentliche thalamische Relais des primären visuellen Signalwegs von der Retina zum Kortex. Deshalb wird die Verarbeitung der visuellen Reize mit den TC-Neuronen des dLGN in Verbindung gebracht. Es wurden unterschiedliche Experimente durchgeführt, um die Auswirkungen des Verlustes der cAMP-Modulation zu charakterisieren (Hammelman et al. 2019). Der *visual discrimination test*, mit dem die thalamische Informationsverarbeitung über den dLGN untersucht werden kann, zeigte eine verringerte visuelle Lernfähigkeit bei HCN2EA-Mäusen innerhalb der ersten zwei Tage der Testdurchführung. Im weiteren Verlauf waren die Ergebnisse zur Kontrollgruppe vergleichbar. Um auszuschließen, dass die Grundlage dieses Lerndefizits auf einem visuellen Defekt beruhen, wurde ein *visual cliff test* durchgeführt. Hierbei konnten keine Unterschiede zwischen HCN2EA- und WT-Mäusen festgestellt werden. Außerdem konnten durch *Morris Water Maze* Experimente Defizite im hippocampalen Lernen ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse lassen daher die Deutung zu, dass eine funktionierende cAMP-Modulation des HCN2-Kanals für den Prozess des visuellen Lernens benötigt wird. Vermutlich führt der erhöhte Anteil an im *Burst*-Modus feuernden TC-Neurone zu einer Störung der Weiterleitung visueller Informationen zum visuellen Kortex und führt somit zu den beobachteten Einschränkungen in Thalamus-abhängigen visuellen Lernverhalten.

Die in dieser Arbeit dargestellten Einschränkungen beim Wechsel der Feuermodi auf zellulärer Ebene haben also Folgen auf das thalamokortikale Netzwerk, die sich auch auf systemischen Niveau auswirken. Die cAMP-Modulation des HCN2-Kanals spielt dabei eine Schlüsselrolle. Der  $I_h$  ist in einer Vielzahl weiterer unterschiedlicher Prozesse im Organismus involviert. Wie diese Arbeit zeigen konnte, ist das HCN2EA-Mausmodell geeignet, um in Zukunft die Rolle der cAMP-Modulation der HCN2-Isoform in diesen genauestens zu untersuchen.

## 6 Zusammenfassung

Der  $I_h$  ist ein durch HCN (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated*)-Kanäle getragener nicht-selektiver Kationenstrom, der primär durch Hyperpolarisation aktiviert wird. Die *second messenger* cAMP und cGMP erleichtern die spannungsabhängige Aktivierung von  $I_h$  indem sie die Aktivierungskurve des Stroms zu positiveren Werten verschieben („*cyclic nucleotide-gated*“). Der  $I_h$  wurde in einer Reihe von Neuronentypen, einschließlich thalamokortikaler (TC) Neurone, nachgewiesen. Von den vier existierenden HCN-Kanälen HCN1-4 sind HCN2 und HCN4 die am stärksten durch cAMP modulierten Isoformen. Für sie wurden unterschiedliche physiologische Funktionen diskutiert, darunter eine Schlüsselrolle bei der Regulation thalamischer Oszillationen, die unter anderem bedeutsam bei der Steuerung der Vigilanz ist (Biel et al. 2009). Eine genaue Untersuchung des Beitrags der cAMP-Modulation für die Funktion dieser thalamischen Netzwerke ist nach wie vor aufgrund fehlender pharmakologischer Werkzeuge nicht möglich. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit mit dem HCN2EA-Mausmodell ein genetischer Ansatz genutzt, bei dem die Bindung von cAMP an den HCN2-Kanal durch die Substitution zweier Aminosäuren (R591E, T592A) vollständig ausgeschaltet wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der EA-Mutation auf die elektrischen Eigenschaften von TC-Neuronen des VB und des dLGN untersucht. Ein wichtiger Parameter dabei war das Ruhemembranpotential (RMP). Das RMP der TC-Neurone war im Vergleich zum WT hyperpolarisiert. Außerdem reagierte es im dLGN nicht und im VB nur reduziert auf cAMP. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das cAMP-gating des HCN2-Kanals essentiell für die Kontrolle der Feuereigenschaften beider Nuklei ist. Dies zeigt sich darin, dass die TC-Zellen der HCN2EA-Mäuse in An- und Abwesenheit von cAMP im *Burst*-Modus feuerten. Ein Wechsel, wie in WT-Neuronen, zum tonischen Feuern in Anwesenheit von cAMP war nur unter starken Strominjektionen zu beobachten. Auch die *voltage sag ratio*, ein Kennzeichen HCN-exprimierender Zellen, war reduziert und reagierte nicht auf cAMP. Die veränderten Eigenschaften der TC-Neurone hatten Auswirkungen auf Netzwerk- und Organismusebene. EEG-Messungen zeigten, dass die Stärke der intrinsischen delta Oszillationen der TC-Neurone erhöht und zudem die Schlafspindel-Oszillationen reduziert waren. Außerdem zeigten HCN2EA-Mäuse SWDs, ein Merkmal der *generalized seizure*. Auf Grundlage der erzeugten Ergebnisse konnte ein Modell der physiologischen Rolle der cAMP-sensitiven Modulation des HCN2-Kanals postuliert werden. Darüber hinaus gaben Verhaltensexperimente Hinweise auf ein eingeschränktes visuelles Lernen. Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit die vielfältige Relevanz der cAMP-Regulation des HCN2-Kanals in unterschiedlichen thalamokortikalen Netzwerken. Das HCN2EA-Mausmodell

stellt auch in Zukunft ein wichtiges Werkzeug zur Erforschung weiterer Fragestellungen bezüglich der physiologischen Rolle der cAMP-Modulation des  $I_h$  dar.

## 7 Summary

The  $I_h$  is a mixed cation current conducted by HCN (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated*) channels, primarily activated by hyperpolarization. In addition, the second messenger cAMP and cGMP facilitate the voltage dependent activation by shifting the activation curve to more positive values („*cyclic nucleotide-gated*“). The  $I_h$  has been measured in different types of neurons, including thalamocortical neurons (TC). There are four HCN channels isoforms (HCN1-4) with HCN2 and HCN4 showing the highest cAMP sensitivity. Many physiological functions have been discussed to be influenced by the  $I_h$  in the past, for example a key role for regulating thalamic oscillations that control vigilance (Biel et al. 2009). Because of the absence of appropriate tools, the exact contribution of cAMP for these thalamocortical networks couldn't be investigated in more detail. Thus, the HCN2EA mouse model has been used to address these questions for HCN2 channels. This genetic approach uses the exchange of two amino acids (R591E, T592A) to completely knockout cAMP sensitive in HCN2.

Within this thesis the physiological consequences of the HCN2EA mutation in TC neurons of the VB and dLGN were characterized by an electrophysiological approach. Compared to the WT the RMP of the dLGN TC neurons was hyperpolarized and did not change in the presence of cAMP. Only small differences could be observed in the VB. The cAMP gating of the HCN2 channels is essential to control the firing properties of the TC neurons. As a consequence, altered firing modes could be observed in both investigated nuclei. In presence and absence of cAMP TC neurons of the HCN2EA mice fired in burst mode. A shift to tonic mode, as observed in WT neurons in presence of cAMP, could only be observed when non-physiological high current injections were applied. In addition, the voltage sag ratio, another hallmark of HCN expressing cells, was reduced and unaltered by cAMP addition. The altered properties of the TC neurons had an impact on network and behavioral level. *In vivo* EEG measurements could show that the power of the intrinsic delta oscillations of the TC neurons was increased and the sleep spindle oscillations were reduced. Furthermore, HCN2EA mice show SWDs, a hallmark of generalized epilepsy. Based on these results a mechanism for the physiological role of the cAMP sensitive modulation of the HCN2 channel could be proposed. In addition, behavioral experiments gave hints to an impaired visual learning. In summary, this thesis shows the diverse relevance of cAMP modulation of HCN2 channels within different thalamocortical networks. The HCN2EA mouse model is a useful tool to investigate further questions regarding the physiological role of cAMP modulation of the  $I_h$ .

## 8 Literaturverzeichnis

- Bal, Thierry, and David A. McCormick. 1996. 'What Stops Synchronized Thalamocortical Oscillations?', *Neuron*, 17: 297-308.
- Beenhakker, Mark P., and John R. Huguenard. 2009. 'Neurons that Fire Together Also Conspire Together: Is Normal Sleep Circuitry Hijacked to Generate Epilepsy?', *Neuron*, 62: 612-32.
- Biel, M., C. Wahl-Schott, S. Michalakis, and X. Zong. 2009. 'Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function', *Physiol Rev*, 89: 847-85.
- Budde, Thomas, Luigi Caputi, Tatyana Kanyshkova, Rainer Staak, Christian Abrahamczik, Thomas Munsch, and Hans-Christian Pape. 2005. 'Impaired Regulation of Thalamic Pacemaker Channels through an Imbalance of Subunit Expression in Absence Epilepsy', *The Journal of Neuroscience*, 25: 9871-82.
- Chen, J., J. S. Mitcheson, M. Lin, and M. C. Sanguinetti. 2000. 'Functional roles of charged residues in the putative voltage sensor of the HCN2 pacemaker channel', *J Biol Chem*, 275: 36465-71.
- Contreras, Diego, Alain Destexhe, Terrence J. Sejnowski, and Mircea Steriade. 1997. 'Spatiotemporal Patterns of Spindle Oscillations in Cortex and Thalamus', *The Journal of Neuroscience*, 17: 1179-96.
- Danober, L., C. Deransart, A. Depaulis, M. Vergnes, and C. Marescaux. 1998. 'Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat', *Prog Neurobiol*, 55: 27-57.
- DiFrancesco, Dario, and Paolo Tortora. 1991. 'Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP', *Nature*, 351: 145-47.
- Doyle, D. A., J. Morais Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, and R. MacKinnon. 1998. 'The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity', *Science*, 280: 69-77.
- Emery, E. C., G. T. Young, E. M. Berrocoso, L. Chen, and P. A. McNaughton. 2011. 'HCN2 ion channels play a central role in inflammatory and neuropathic pain', *Science*, 333: 1462-6.
- Fogerson, P. M., and J. R. Huguenard. 2016. 'Tapping the Brakes: Cellular and Synaptic Mechanisms that Regulate Thalamic Oscillations', *Neuron*, 92: 687-704.
- Gruner, Christian. 2011. 'Herstellung eines Knockin Mausmodells mit veränderter Modulation des HCN2-Ionenkanals (Dissertation)', *Ludwig-Maximilians Universität München*.

- Hammelmann, V., M. S. Stieglitz, H. Hulle, K. Le Meur, J. Kass, M. Brummer, C. Gruner, R. D. Rotzer, S. Fenske, J. Hartmann, B. Zott, A. Luthi, S. Spahn, M. Moser, D. Isbrandt, A. Ludwig, A. Konnerth, C. Wahl-Schott, and M. Biel. 2019. 'Abolishing cAMP sensitivity in HCN2 pacemaker channels induces generalized seizures', *JCI Insight*, 4.
- Hammelmann, V., X. Zong, F. Hofmann, S. Michalakis, and M. Biel. 2011. 'The cGMP-dependent protein kinase II Is an inhibitory modulator of the hyperpolarization-activated HCN2 channel', *PLoS One*, 6: e17078.
- He, C., F. Chen, B. Li, and Z. Hu. 2014. 'Neurophysiology of HCN channels: from cellular functions to multiple regulations', *Prog Neurobiol*, 112: 1-23.
- Hu, L., B. Santoro, A. Saponaro, H. Liu, A. Moroni, and S. Siegelbaum. 2013. 'Binding of the auxiliary subunit TRIP8b to HCN channels shifts the mode of action of cAMP', *J Gen Physiol*, 142: 599-612.
- Jahnsen, H., and R. Llinás. 1984. 'Tonic basis for the electro-responsiveness and oscillatory properties of guinea-pig thalamic neurones in vitro', *The Journal of Physiology*, 349: 227-47.
- Jones, E. G. 2001. 'The thalamic matrix and thalamocortical synchrony', *Trends Neurosci*, 24: 595-601.
- Kanyshkova, T., P. Meuth, P. Bista, Z. Liu, P. Ehling, L. Caputi, M. Doengi, D. M. Chetkovich, H. C. Pape, and T. Budde. 2012. 'Differential regulation of HCN channel isoform expression in thalamic neurons of epileptic and non-epileptic rat strains', *Neurobiol Dis*, 45: 450-61.
- Kim, U., T. Bal, and D. A. McCormick. 1995. 'Spindle waves are propagating synchronized oscillations in the ferret LGNd in vitro', *Journal of Neurophysiology*, 74: 1301-23.
- Koepsell, Kilian, Xin Wang, Vishal Vaingankar, Yichun Wei, Qingbo Wang, Daniel Rathbun, Martin Usrey, Judith Hirsch, and Friedrich Sommer. 2009. 'Retinal oscillations carry visual information to cortex', *Frontiers in Systems Neuroscience*, 3.
- Kuisle, Mira, Nicolas Wanaverbecq, Amy L. Brewster, Samuel G. A. Frère, Didier Pinault, Tallie Z. Baram, and Anita Lüthi. 2006. 'Functional stabilization of weakened thalamic pacemaker channel regulation in rat absence epilepsy', *The Journal of Physiology*, 575: 83-100.
- Lee, C. H., and R. MacKinnon. 2017. 'Structures of the Human HCN1 Hyperpolarization-Activated Channel', *Cell*, 168: 111-20 e11.

- Lewis, Alan S., and Dane M. Chetkovich. 2011. 'HCN channels in behavior and neurological disease: too hyper, or not active enough?', *Molecular and cellular neurosciences*, 46: 357-67.
- Llinas, Rodolfo, and Henrik Jahnsen. 1982. 'Electrophysiology of mammalian thalamic neurones in vitro', *Nature*, 297: 406-08.
- Lolicato, M., M. Nardini, S. Gazzarrini, S. Moller, D. Bertinetti, F. W. Herberg, M. Bolognesi, H. Martin, M. Fasolini, J. A. Bertrand, C. Arrigoni, G. Thiel, and A. Moroni. 2011. 'Tetramerization dynamics of C-terminal domain underlies isoform-specific cAMP gating in hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels', *J Biol Chem*, 286: 44811-20.
- Lopez-Bendito, Guillermina, and Zoltan Molnar. 2003. 'Thalamocortical development: how are we going to get there?', *Nat Rev Neurosci*, 4: 276-89.
- Ludwig, A., T. Budde, J. Stieber, S. Moosmang, C. Wahl, K. Holthoff, A. Langebartels, C. Wotjak, T. Munsch, X. Zong, S. Feil, R. Feil, M. Lancel, K. R. Chien, A. Konnerth, H. C. Pape, M. Biel, and F. Hofmann. 2003. 'Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2', *EMBO J*, 22: 216-24.
- Ludwig, Andreas, Xiangang Zong, Juliane Stieber, Roger Hullin, Franz Hofmann, and Martin Biel. 1999. 'Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics', *The EMBO Journal*, 18: 2323-29.
- Lupica, C. R., J. A. Bell, A. F. Hoffman, and P. L. Watson. 2001. 'Contribution of the hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) to membrane potential and GABA release in hippocampal interneurons', *J Neurophysiol*, 86: 261-8.
- Maroso, Mattia, Gergely G Szabo, Hannah K Kim, Allyson Alexander, Anh D Bui, Sang-Hun Lee, Beat Lutz, and Ivan Soltesz. 2016. 'Cannabinoid Control of Learning and Memory through HCN Channels', *Neuron*, 89: 1059-73.
- McCormick, D. A., and T. Bal. 1997. 'Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms', *Annu Rev Neurosci*, 20: 185-215.
- McCormick, D. A., and J. R. Huguenard. 1992. 'A model of the electrophysiological properties of thalamocortical relay neurons', *Journal of Neurophysiology*, 68: 1384-400.
- McCormick, D. A., and H. C. Pape. 1990a. 'Noradrenergic and serotonergic modulation of a hyperpolarization-activated cation current in thalamic relay neurones', *The Journal of Physiology*, 431: 319-42.

- . 1990b. 'Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones', *J Physiol*, 431: 291-318.
- McCormick, DA, and A Williamson. 1991. 'Modulation of neuronal firing mode in cat and guinea pig LGNd by histamine: possible cellular mechanisms of histaminergic control of arousal', *The Journal of Neuroscience*, 11: 3188-99.
- Mishra, Anusha, Fergus M. O'Farrell, Clare Reynell, Nicola B. Hamilton, Catherine N. Hall, and David Attwell. 2014. 'Imaging pericytes and capillary diameter in brain slices and isolated retinae', *Nat. Protocols*, 9: 323-36.
- Moosmang, S., M. Biel, F. Hofmann, and A. Ludwig. 1999. 'Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain', *Biol Chem*, 380: 975-80.
- Much, B., C. Wahl-Schott, X. Zong, A. Schneider, L. Baumann, S. Moosmang, A. Ludwig, and M. Biel. 2003. 'Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels', *J Biol Chem*, 278: 43781-6.
- Neuenschwander, Sergio, and Wolf Singer. 1996. 'Long-range synchronization of oscillatory light responses in the cat retina and lateral geniculate nucleus', *Nature*, 379: 728-33.
- Nolan, Matthew F., Joshua T. Dudman, Paul D. Dodson, and Bina Santoro. 2007. 'HCN1 Channels Control Resting and Active Integrative Properties of Stellate Cells from Layer II of the Entorhinal Cortex', *The Journal of Neuroscience*, 27: 12440-51.
- Nolan, Matthew F., Gaël Malleret, Ka Hung Lee, Emma Gibbs, Joshua T. Dudman, Bina Santoro, Deqi Yin, Richard F. Thompson, Steven A. Siegelbaum, Eric R. Kandel, and Alexei Morozov. 2003. 'The Hyperpolarization-Activated HCN1 Channel Is Important for Motor Learning and Neuronal Integration by Cerebellar Purkinje Cells', *Cell*, 115: 551-64.
- Notomi, T., and R. Shigemoto. 2004. 'Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain', *J Comp Neurol*, 471: 241-76.
- Pape, H. C. 1992. 'Adenosine promotes burst activity in guinea-pig geniculocortical neurones through two different ionic mechanisms', *The Journal of Physiology*, 447: 729-53.
- . 1996. 'Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons', *Annu Rev Physiol*, 58: 299-327.

- Pape, H. C., and D. A. McCormick. 1989. 'Noradrenaline and serotonin selectively modulate thalamic burst firing by enhancing a hyperpolarization-activated cation current', *Nature*, 340: 715-8.
- Pape, Hans-Christian, and Ralph Mager. 1992. 'Nitric oxide controls oscillatory activity in thalamocortical neurons', *Neuron*, 9: 441-48.
- Pape, Hans-Christian, G. Meuth Sven, Thomas Seidenbecher, Thomas Munsch, and Thomas Budde. 2005. "Der Thalamus: Tor zum Bewusstsein und Rhythmusgenerator im Gehirn." In *e-Neuroforum*, 44.
- Postea, Otilia, and Martin Biel. 2011. 'Exploring HCN channels as novel drug targets', *Nat Rev Drug Discov*, 10: 903-14.
- Robinson, R. B., and S. A. Siegelbaum. 2003. 'Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function', *Annu Rev Physiol*, 65: 453-80.
- Santoro, B., L. Hu, H. Liu, A. Saponaro, P. Pian, R. A. Piskorowski, A. Moroni, and S. A. Siegelbaum. 2011. 'TRIP8b regulates HCN1 channel trafficking and gating through two distinct C-terminal interaction sites', *J Neurosci*, 31: 4074-86.
- Santoro, B., R. A. Piskorowski, P. Pian, L. Hu, H. Liu, and S. A. Siegelbaum. 2009. 'TRIP8b splice variants form a family of auxiliary subunits that regulate gating and trafficking of HCN channels in the brain', *Neuron*, 62: 802-13.
- Saponaro A, Cantini F, Porro A, Bucchi A, DiFrancesco D, Maione V, Donadoni C, Introini B, Mesirca P, Mangoni ME, et al. 2018. 'A synthetic peptide that prevents cAMP regulation in mammalian hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels.', *eLife*.
- Shah, M. M. 2014. 'Cortical HCN channels: function, trafficking and plasticity', *J Physiol*, 592: 2711-9.
- Sherman, S. M. 2001. 'Tonic and burst firing: dual modes of thalamocortical relay', *Trends Neurosci*, 24: 122-6.
- Spahn, Saskia 2015. 'Functional characterization of HCN2 channels in the septo-hippocampal system (Dissertation)', *Ludwig-Maximilians Universität München*.
- Steriade, M. 2003. 'The corticothalamic system in sleep', *Front Biosci*, 8: d878-99.

- Steriade, M., D. A. McCormick, and T. J. Sejnowski. 1993. 'Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain', *Science*, 262: 679-85.
- Stieber, Juliane, Georg Stöckl, Stefan Herrmann, Benjamin Hassfurth, and Franz Hofmann. 2005. 'Functional Expression of the Human HCN3 Channel', *Journal of Biological Chemistry*, 280: 34635-43.
- van Luijtelaar, E. L., W. H. Drinkenburg, C. M. van Rijn, and A. M. Coenen. 2002. 'Rat models of genetic absence epilepsy: what do EEG spike-wave discharges tell us about drug effects?', *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 24 Suppl D: 65-70.
- Viscomi, C., C. Altomare, A. Bucchi, E. Camatini, M. Baruscotti, A. Moroni, and D. DiFrancesco. 2001. 'C terminus-mediated control of voltage and cAMP gating of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels', *J Biol Chem*, 276: 29930-4.
- von Krosigk, M, T Bal, and DA McCormick. 1993. 'Cellular mechanisms of a synchronized oscillation in the thalamus', *Science*, 261: 361-64.
- Wainger, B. J., M. DeGennaro, B. Santoro, S. A. Siegelbaum, and G. R. Tibbs. 2001. 'Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels', *Nature*, 411: 805-10.
- Wang, M., B. P. Ramos, C. D. Paspalas, Y. Shu, A. Simen, A. Duque, S. Vijayraghavan, A. Brennan, A. Dudley, E. Nou, J. A. Mazer, D. A. McCormick, and A. F. Arnsten. 2007. 'Alpha2A-adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex', *Cell*, 129: 397-410.
- Zagotta, W. N., N. B. Olivier, K. D. Black, E. C. Young, R. Olson, and E. Gouaux. 2003. 'Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels', *Nature*, 425: 200-5.
- Zhou, Lei, and Steven A. Siegelbaum. 2007. 'Gating of HCN channels by cyclic nucleotides: Residue contacts that underlie ligand binding, selectivity and efficacy', *Structure (London, England : 1993)*, 15: 655-70.
- Zhou, Yufeng, João H. Morais-Cabral, Amelia Kaufman, and Roderick MacKinnon. 2001. 'Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel–Fab complex at 2.0 Å resolution', *Nature*, 414: 43.
- Zobeiri, Mehrnoush, Rahul Chaudhary, Anne Blaich, Matthias Rottmann, Stefan Herrmann, Patrick Meuth, Pawan Bista, Tatyana Kanyshkova, Annika Lüttjohann, Venu Narayanan, Petra Hundehage, Sven G. Meuth, Maria Novella Romanelli, Francisco J. Urbano, Hans-

- Christian Pape, Thomas Budde, and Andreas Ludwig. 2019. 'The Hyperpolarization-Activated HCN4 Channel is Important for Proper Maintenance of Oscillatory Activity in the Thalamocortical System', *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 29: 2291-304.
- Zong, Xiangang, Stefanie Krause, Cheng-Chang Chen, Jens Krüger, Christian Gruner, Xiaochun Cao-Ehlker, Stefanie Fenske, Christian Wahl-Schott, and Martin Biel. 2012. 'Regulation of Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated (HCN) Channel Activity by cCMP', *Journal of Biological Chemistry*, 287: 26506-12.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
5-HT	Serotonin
Å	Ångström
A592	Alanin an Position 592
ACSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i>
ATPase	Adenosintriphosphatasen
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BaCl <sub>2</sub>	Bariumchlorid
C-Linker	Carboxy-Linker
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCD	<i>charge-coupled device</i>
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CNBD	<i>cyclic nucleotide binding domain</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	kortikothalamisch
DANN	Desoxyribonukleinsäure
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
dLGN	<i>dorsaler Corpus geniculatum laterale</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
E591	Glutaminsäure an Position 591
EEG	Elektroenzephalografie
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
GABA	gamma-Aminobuttersäure
GAERS	<i>Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg</i>
GYG-Motiv	Glycin-Tyrosin-Glycin Aminosäuremotiv des HCN Selektionsfilters
HA	Histamin
HCl	Hydrogenchlorid
HCN	<i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated</i>
HCN2EA	Mausmodell, mit EA-Mutation des HCN2-Kanals
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hz	Hertz
I <sub>f</sub>	Strom der HCN-Kanäle, f steht für <i>funny</i>
I <sub>h</sub>	Strom der HCN-Kanäle, h steht für <i>hyperpolarization</i>
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
I <sub>q</sub>	Strom der HCN-Kanäle, q steht für <i>queer</i>
kb	Kilobasenpaar(e)
KCl	Kaliumchlorid

KMeSO <sub>4</sub>	Kaliummethylsulfat
M	Molar, mol pro Liter
MgATP	Magnesium-Adenosintriphosphat
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mV	Millivolt
MΩ	Megaohm
n	Anzahl
N-Terminus	Amino-Terminus
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogenkarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NO	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
pA	Picoampere
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pF	Picofarad
PFA	Paraformaldehyd
qs	quantum satis
R591	Arginin an Position 591
REM	<i>rapid eye movement</i>
RMP	Ruhemembranpotential
RT	Nucleus reticularis
s	Sekunde(n)
S1-S6	Transmembransegment 1-6
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Durchschnitts
T592	Threonin an Position 592
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TC	thalamokortikal
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T*TX	Tetrodotoxin
V	Volt
V <sub>0.5</sub>	halbmaximale Aktivierung
VB	ventrobasaler Komplex

VPL	ventraler posterolateraler Nukleus
VPM	ventraler posteromedialer Nukleus
WAG/Rij	<i>Wistar Albino Glaxo Rats from Rijswijk</i>
WT	Wildtyp
x	fach
z. B.	zum Beispiel
$\alpha$	alpha
$\beta$	beta
$\mu$ l	Microliter
$\mu$ m	Micrometer
$\mu$ M	Micromolar

## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der transmembranen Topologie des HCN-Kanals..	7
Abbildung 2: Struktur des HCN1-Tetramers.....	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung der anatomischen Lokalisation des ventrobasalen Komplex (VB) im Gehirn einer Maus.....	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung der anatomischen Lokalisation des dorsalen Corpus geniculatum laterale (dLGN) im Gehirn einer Maus.....	11
Abbildung 5: Schematische Darstellung des primären visuellen Pfads.....	11
Abbildung 6: Die zwei Feuermodi thalamokortikaler Neurone.....	12
Abbildung 7: Schematische Darstellung des thalamokortikalen Netzwerks.....	14
Abbildung 8: Schematische Darstellung unterschiedlicher Einflüsse durch Neurotransmitter auf den $I_h$ ..	15
Abbildung 9: SWDs in EEG-Messungen der HCN2KO-Maus.....	17
Abbildung 10: Aminosäuremutationen des HCN2EA-Kanals.....	18
Abbildung 11: Präparation von Gehirnschnitten aus einem Mäusegehirn.....	25
Abbildung 12: Protokoll zur Bestimmung der halbmaximalen Aktivierung.....	27
Abbildung 13: Protokoll zur Bestimmung der <i>voltage sag ratio</i> .....	28
Abbildung 14: Protokoll zur Bestimmung des Feuerverhaltens thalamokortikaler Neurone.....	28
Abbildung 15: Repräsentative horizontale Hirnschnitte einer WT- und einer HCN2EA-Maus.....	30
Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung des Thalamus in horizontalen Hirnschnitten.....	31
Abbildung 17: Detektion von HCN2 und HCN4 via Western-Blot-Analyse.....	32
Abbildung 18: Repräsentative Stromspuren thalamokortikaler Neurone im VB.....	33
Abbildung 19: Stromdichte thalamokortikaler Neurone im VB.....	33
Abbildung 20: Spannungsabhängige Aktivierung des $I_h$ in thalamokortikalen Neuronen des VB.....	34
Abbildung 21: Das Ruhemembranpotential thalamokortikaler Neurone im VB.....	35
Abbildung 22: Feuermodi thalamokortikaler Neurone in Abhängigkeit von cAMP im VB.....	36
Abbildung 23: Frequenz der Aktionspotentiale thalamokortikaler Neurone im VB.....	37
Abbildung 24: <i>Voltage sag ratio</i> thalamokortikaler Neurone im VB.....	38

Abbildung 25: Stromdichte thalamokortikaler Neurone im dLGN..... 39

Abbildung 26: Spannungsabhängige Aktivierung thalamokortikaler Neurone im dLGN..... 40

Abbildung 27: Das Ruhemembranpotential thalamokortikaler Neurone im dLGN..... 41

Abbildung 28: Feuermodi thalamokortikaler Neurone in Abhängigkeit von cAMP im dLGN..... 42

Abbildung 29: Frequenz der Aktionspotentiale thalamokortikaler Neurone im dLGN..... 43

Abbildung 30: *Voltage sag ratio* thalamokortikaler Neurone im dLGN..... 44

Abbildung 31: Model der physiologischen Rolle der cAMP-sensitiven Modulation des HCN2-Kanals auf Kanal-, Zell- und in vivo Ebene..... 49

## 11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primer für die Genotypisierung der HCN2EA-Mauslinie. Alle Primer wurden bei Eurofins MWG hergestellt. ....	22
Tabelle 2: Pipettierschema der Genotypisierungs-PCR.....	22
Tabelle 3: Protokoll der Genotypisierungs-PCR. ....	23

## 12 Puffer und Lösungen

### Molekularbiologische Methoden

#### Tris-HCl, pH 8

Substanz	Menge
Tris	121,14 g
Salzsäure 37 %	qs
H <sub>2</sub> O	Auf 1 l auffüllen

#### 10x TBE

Substanz	Menge
Tris	540 g
Borsäure	257 g
0,5 M EDTA, pH8,0	200 ml
H <sub>2</sub> O	Auf 5 l auffüllen

#### 1x TBE, pH 7,2-7,5

Substanz	Menge
10x TBE	1 l
H <sub>2</sub> O	9 l

## Proteinanalytik

### 10x TBS

Substanz	Menge
Tris-HCl	12,1 g
NaCl	80,2 g
H <sub>2</sub> O	Auf 1 l auffüllen

### 1x TBST

Substanz	Menge
10x TBS	100 ml
Tween20	1 ml
H <sub>2</sub> O	Auf 1 l auffüllen

## Präparation von Gehirnschnitte

### ACSF, Präparationszusammensetzung

Substanz	Endkonzentration (mM)
NaCl	65,47
KCl	2,48
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25
NaHCO <sub>3</sub>	25,98
Saccharose	105,0
Glukose	24,7
Ascorbinsäure	1,7
CaCl <sub>2</sub>	0,5
MgCl <sub>2</sub>	7,0

**ACSF, Regenerationszusammensetzung**

Substanz	Endkonzentration (mM)
NaCl	130,94
KCl	2,48
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25
NaHCO <sub>3</sub>	25,98
Glukose	18,0
CaCl <sub>2</sub>	2,0
MgCl <sub>2</sub>	1,2
Ascorbinsäure	1,7
Natriumpyruvat	2
Myo-Inositol	3

**Elektrophysiologie an HEK-Zellen****Extrazelluläre Lösung**

Substanz	Endkonzentration (mM)
NaCl	135
KCl	5
CaCl <sub>2</sub>	1,8
MgCl <sub>2</sub>	0,5
HEPES	5

**Intrazelluläre Lösung**

Substanz	Endkonzentration (mM)
NaCl	10
KCl	130
MgCl <sub>2</sub>	0,5
EGTA	1
HEPES	5

**Perfusionsexperimente an HEK-Zellen****Extrazelluläre Lösung**

Substanz	Endkonzentration (mM)
NaCl	110
KCl	5
CaCl <sub>2</sub>	1,8
MgCl <sub>2</sub>	0,5
HEPES	5

**Intrazelluläre Lösung**

Substanz	Endkonzentration (mM)
NaCl	10
KCl	70
MgCl <sub>2</sub>	0,5
KF	60
HEPES	5

## Elektrophysiologie an Hirnschnitten

### ACSF, extrazelluläre Messlösung in *Current-Clamp*-Messungen

Substanz	Endkonzentration (mM)
NaCl	130,94
KCl	2,48
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25
NaHCO <sub>3</sub>	25,98
Glukose	18,0
CaCl <sub>2</sub>	2,0
MgCl <sub>2</sub>	1,2
Ascorbinsäure	1,7

### ACSF, extrazelluläre Messlösung in *Voltage-Clamp*-Messungen

Substanz	Endkonzentration (mM)
NaCl	130,94
KCl	2,48
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25
NaHCO <sub>3</sub>	25,98
Glukose	18,0
CaCl <sub>2</sub>	2,0
MgCl <sub>2</sub>	1,2
Ascorbinsäure	1,7
TTX	0,0005
BaCl <sub>2</sub>	1

**Intrazelluläre Lösung**

Substanz	Endkonzentration (mM)
KMeSO <sub>4</sub>	140,0
HEPES	10,0
KCl	10,0
EGTA	0,1
Phosphokreatin	10,0
MgATP	4,0

**Messungen mit cAMP**

Bei Messungen mit cAMP wurde der intrazellulären Lösung 1  $\mu$ M 8-bromo-cAMP (Sigma-Aldrich) hinzugefügt.

## 13 Datentabellen

### Halbmaximale Aktivierung (VB)

Genotyp	V0.5 (mV)	n
WT -cAMP	-97,92 (+- 0,55)	6
WT +1 $\mu$ M cAMP	-92,36 (+-0,31)	8
HCN2 EA -cAMP	-104,11 (+- 0,77)	4
HCN2 EA + 1 $\mu$ M cAMP	-100,52 (+- 0,63)	5

### Stromdichte (Cd; VB)

Genotyp	Cd (pA/pF)	n
WT -cAMP	15,02 (+- 1,96)	6
HCN2 EA -cAMP	12,23 (+- 0,87)	4

### Zeitkonstanten (tau; VB)

Genotyp	tau (ms)	n
WT -cAMP	129,6 (+-7,29)	6
HCN2 EA -cAMP	225,3 (+-2,85)	4

### Ruhemembranpotential (VB)

Genotyp	RMP (mV)	n
WT -cAMP	-77,19 (+-0,65)	13
WT +1 $\mu$ M cAMP	-74,25 (+- 0,32)	10
HCN2 EA -cAMP	-82,85 (+-0,67)	11
HCN2 EA + 1 $\mu$ M cAMP	-79,71 (+-0,77)	7

### Frequenz der Aktionspotentialfeuerrate (VB)

Frequenz (Hz)	WT -cAMP (n=4)	WT +cAMP (n=5)	HCN2EA -cAMP (n=6)	HCN2EA +cAMP (n=6)
@0pA	0 (+- 0)	0 (+- 0)	0 (+- 0)	0 (+- 0)
@ 50pA	260.49 (+- 8.75)	0 (+- 0)	286.57 (+- 38.58)	0 (+- 0)
@ 100pA	288.97 (+- 8.88)	3.40 (+-3.40)	276.29 (+- 16.52)	190.46 (+- 18.64)
@ 150 pA	292.06 (+- 19.46)	9.53 (+- 9.53)	260.20 (+- 31.96)	219.37 (+-10.96)
@ 200pA	261.18 (+-72.29)	33.58 (+- 10.30)	241.69 (+-47.92)	212.64 (+- 24.72)
@ 250 pA	50.63 (+- 4.05)	54.05 (+- 11.90)	212.06 (+- 55.53)	187.49 (+-38.91)
@ 300 pA	80.23 (+- 3.29)	71.18 (+- 12.49)	159.19 (+-51.79)	156.74 (+-41.90)
@ 350 pA	105.91 (+- 7.04)	90.02 (+- 12.20)	107.99 (+- 24.95)	143.24 (+-44.02)
@ 400 pA	130.12 (+- 10.76)	104.77 (+- 12.54)	119.20 (+- 22.84)	158.92 (+- 37.13)

**Voltage sag ratio (VB)**

Sag ratio (mV)	WT -cAMP (n=13)	WT +cAMP (n=10)	HCN2EA -cAMP (n=11)	HCN2EA +cAMP (n=7)
@-100pA	0.92 (+- 0.003)	0.89 (+- 0.008)	0.95 (+-0.005)	0.94 (+- 0.009)
@-80pA	0.94 (+- 0.004)	0.91 (+- 0.007)	0.96 (+- 0.004)	0.95 (+- 0.008)
@-60pA	0.95 (+- 0.003)	0.93 (+- 0.006)	0.98 (+-0.003)	0.96 (+- 0.006)
@-40pA	0.96 (+- 0.003)	0.95 (+- 0.004)	0.98 (+- 0.002)	0.97 (+- 0.005)
@-20pA	0.98 (+- 0.002)	0.97 (+- 0.003)	0.99 (+- 0.002)	0.98 (+-0.003)

**Halbmaximale Aktivierung (dLGN)**

Genotyp	V0.5 (mV)	n
WT -cAMP	-94,57 (+-0,77)	6
WT +1 $\mu$ M cAMP	-89,51 (+- 1,31)	5
HCN2 EA -cAMP	-99,97 (+-0,80)	6
HCN2 EA + 1 $\mu$ M cAMP	-98,87 (+-0,43)	4

**Stromdichte (Cd; dLGN)**

Genotyp	Cd (pA/pF)	n
WT -cAMP	6,45 (+-0,55)	11
HCN2 EA -cAMP	6,65 (+-0,34)	13

**Zeitkonstanten (tau; dLGN)**

Genotyp	tau (ms)	n
WT -cAMP	166,46 (+-11,29)	7
HCN2 EA -cAMP	251,66 (+- 9,09)	8

**Ruhemembranpotential (dLGN)**

Genotyp	RMP (mV)	n
WT -cAMP	-81,46 (+-0,71)	11
WT +1 $\mu$ M cAMP	-76,69 (+-0,71)	7
HCN2 EA -cAMP	-84,99 (+-1,08)	9
HCN2 EA + 1 $\mu$ M cAMP	-84,47 (+-0,76)	8

**Voltage sag ratio (dLGN)**

Sag ratio (mV)	WT -cAMP (n=11)	WT +cAMP (n=7)	HCN2EA -cAMP (n=9)	HCN2EA +cAMP (n=8)
@-100pA	0,89 (+-0,008)	0,86 (+-0,009)	0,93 (+-0,009)	0,93 (+-0,007)
@-80pA	0.90 (+- 0.008)	0.88 (+- 0.006)	0.94 (+- 0.009)	0.94 (+- 0.006)
@-60pA	0.92 (+- 0.007)	0.91 (+- 0.004)	0.95 (+- 0.007)	0.95 (+-0.006)
@-40pA	0.94 (+- 0.006)	0.93 (+- 0.004)	0.96 (+- 0.006)	0.97 (+- 0.003)
@-20pA	0.96 (+- 0.004)	0.96 (+- 0.004)	0.97 (+- 0.004)	0.98 (+-0.002)

**Frequenz der Aktionspotentialfeurrate (dLGN)**

Frequenz (Hz)	WT -cAMP (n=4)	WT +cAMP (n=3)	HCN2EA -cAMP (n=5)	HCN2EA +cAMP (n=3)
@0pA	0 (+- 0)	0 (+- 0)	0 (+- 0)	0 (+- 0)
@ 50pA	289.45 (+- 28.38)	0 (+- 0)	159.49 (+- 7.28)	0 (+- 0)
@ 100pA	300.99 (+- 27.43)	0 (+- 0)	223.13 (+- 16.99)	193.81 (+- 0.01)
@ 150 pA	297.84 (+- 15.75)	22.65 (+-6.85)	236.78 (+- 21.17)	212.85 (+- 23.97)
@ 200pA	304.66 (+- 15.08)	36.85 (+-6.93)	252.17 (+- 16.75)	236.58 (+- 15.40)
@ 250 pA	256.79 (+- 79.25)	54.29 (+-11.62)	177.23 (+- 58.82)	98.24 (+- 65.27)
@ 300 pA	98.92 (+- 68.81)	70.87 (+- 13.13)	103.33 (+-57.30)	112.83 (+-67.30)
@ 350 pA	117.44 (+- 69.90)	87.21 (+- 11.26)	108.84 (+- 57.15)	123.64 (+- 66.79)
@ 400 pA	58.87 (+- 8.69)	99.47 (+- 8.78)	118.75 (+- 56.01)	61.16 (+- 7.75)

## 14 Publikationen

Hammelman, V., M. S. Stieglitz, **H. Hülle**, K. Le Meur, J. Kass, M. Brummer, C. Gruner, R. D. Rötzer, S. Fenske, J. Hartmann, B. Zott, A. Lüthi, S. Spahn, M. Moser, D. Isbrandt, A. Ludwig, A. Konnerth, C. Wahl-Schott, and M. Biel. 2019. 'Abolishing cAMP sensitivity in HCN2 pacemaker channels induces generalized seizures', *JCI Insight*, 4.

## 15 Danksagung

Herr Prof. Biel danke ich für seine wissenschaftlichen Ratschläge und die Möglichkeit diese Arbeit in seinem Arbeitskreis durchführen zu dürfen.

Herr Prof. Wahl-Schott danke ich für die wissenschaftliche Betreuung und die Möglichkeit an diesem Thema zu arbeiten.

Anita Lüthi und ihrer Arbeitsgruppe danke ich für einen interessanten und einsichtsreichen Aufenthalt in ihrem Labor in Lausanne.

Verena, Marc und Karim danke ich für die Zusammenarbeit rund um HCN2EA.

Außerdem danke ich dem gesamten Arbeitskreis, der den Laboralltag (und den ein oder anderen Weinabend) zu einer unvergesslichen Zeit meines Lebens gemacht hat. Die Persönlichkeiten, die ich während dieser Zeit kennenlernen durfte, waren so unterschiedlich wie die wissenschaftlichen Themen an denen sie gearbeitet haben. Sie boten Anreiz zur Selbstreflektion und so die Möglichkeit mich nicht nur wissenschaftlich, sondern auch persönlich in dieser Zeit weiterzuentwickeln.

Ein besonderen Dank für die Unterstützung bei dem Auf und Ab, die die Anfertigung so einer Arbeit mit sich bringt gilt Saskia, Rasmus, Eva, Mirja, Franz, Steffi und Sami. Aus unseren gemeinsamen Erlebnissen sind mitunter Freundschaften entstanden, die mein Leben über die Promotion hinaus bereichern.

Meiner Familie danke ich für die lebenslange Unterstützung. Ihr habt mich dem Selbstvertrauen und mit aller Freiheit ausgestattet, die nötig ist dem Leben und all seinen Möglichkeiten offen zu begegnen.

Jen, danke dafür, dass du mein Nord, mein Süd, mein Ost und West bist. Der Dank, den ich dir gegenüber empfinde, lässt sich nur unzureichend in Worte fassen.