

***Charakterisierung von hyperpolarisations-
aktivierten und zyklisch Nukleotid-gesteuerten
Ionenkanälen (HCN-Kanäle) in der Retina und im
Gehirn der Ratte***

Alexander Scholten

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3936

ISSN 0944-2952

Institut für Biologische Informationsverarbeitung

Institut 1: Zelluläre Signalverarbeitung Jül-3936

D 38 (Diss., Köln, Univ., 2001)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461/61-52 20 · Telefax: 02461/61-61 03 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abkürzungsverzeichnis	VI
1	Einleitung	1
1.1	Hyperpolarisationsaktivierte und zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle	1
1.2	Strukturelle Eigenschaften von HCN-Kanälen	3
1.3	Die physiologische Bedeutung von HCN-Kanälen	5
1.4	Aufbau der Retina	9
1.5	Zielsetzung	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.2	<i>E.coli</i> -Zellkultur	14
2.2.1	Verwendeter Bakterienstamm und Plasmidvektoren	14
2.2.2	Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für <i>E.coli</i>	15
2.2.3	Anzucht von <i>E.coli</i> -Bakterienkulturen	15
2.2.3.1	Anzucht von <i>E.coli</i> -Zellen zur Plasmidpräparation	15
2.2.3.2	Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation mit Plasmid-DNA	15
2.2.3.3	Anzucht von <i>E.coli</i> -Zellen zur Expression von Maltose-Bindeprotein (MBP) und MBP-Fusionsproteinen	16
2.3	Plasmid-DNA-Präparationen	16
2.3.1	Mini-Präparation durch alkalische Lyse nach Birnboim & Doly (1979)	16
2.3.2	Alkalische Maxi- und Mega-Präparationen	17
2.4	Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren	18
2.4.1	Phenol/Chloroformextraktion	18
2.4.2	Ethanol-Präzipitation	18
2.4.3	Quantifizierung von Nukleinsäuren	19
2.4.3.1	Konzentrationsbestimmung mit Hilfe von Agarose-Gelen	19
2.4.3.2	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	19
2.4.4	Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen	19
2.4.5	DNA-Größen- und Mengenstandard	20
2.4.6	Elution von DNA aus Agarose-Gelen	20

2.4.6.1	Elution von DNA aus Agarose-Gelen durch Adsorption an QIAEX (Qiagen)	20
2.4.6.2	Elution von DNA aus Agarose-Gelen nach der Zentrifugationsmethode	21
2.5	Manipulation von Nukleinsäuren	21
2.5.1	Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen	21
2.5.2	Modifizierung von DNA-Fragmenten	22
2.5.2.1	Glätten überhängender Einzelstrang-Enden	22
2.5.2.2	Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten	22
2.5.2.3	Dephosphorylierung geschnittener DNA-Vektoren	22
2.5.3	Klonierung von DNA-Fragmenten	23
2.5.3.1	Ligation	23
2.5.3.2	Transformation	23
2.6	Nachweis spezifischer Nukleinsäuren	24
2.6.1	Radioaktive Markierung spezifischer Sonden	24
2.6.2	Untersuchung der Genexpression in menschlichen Geweben	24
2.6.3	Hybridisierung von immobilisierter Poly(A) ⁺ -RNA mit DNA-Sonden und Autoradiographie	25
2.7	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	26
2.7.1	Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden	26
2.7.2	Bedingungen für die PCR-Reaktionen	27
2.7.3	Reinigung der PCR-Produkte	27
2.8	DNA-Sequenzierung mit LI-COR DNA-Sequenzierer	28
2.8.1	Sequenzierreaktion	28
2.8.2	PCR zur Sequenzierung	28
2.8.3	Acrylamid-Gelelektrophorese zur Sequenzierung	29
2.9	Heterologe Genexpression in HEK 293-Zellen	29
2.9.1	Kulturbedingungen für HEK 293-Zellen	30
2.9.2	Transiente Expression von Proteinen in HEK 293-Zellen	31
2.10	Präparation von Membranproteinen	32
2.10.1	Präparation von heterolog exprimierten Membranproteinen aus HEK 293-Zellen	32
2.10.2	Präparation von Membranproteinen aus nativen Geweben	33
2.11	Quantifizierung von Proteinen	33
2.11.1	Konzentrationsbestimmung nach Bradford (1976)	33

2.11.2	Konzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz	34
2.12	Modifikation von Membranproteinen	34
2.12.1	Solubilisierung von Membranproteinen	34
2.12.2	Deglykosylierung von Membranproteinen	35
2.13	Trennung von Proteinen durch Gelelektrophorese	35
2.13.1	Verwendete Protein-Größenstandards	36
2.13.2	Färben von SDS-Polyacrylamid-Gelen mit der Coomassie-Blaufärbung	36
2.14	Nachweis spezifischer Proteine	37
2.14.1	Transfer und Immobilisierung von Proteinen ("Westernblot")	37
2.14.2	Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen	37
2.15	Immunzytochemie	38
2.15.1	Fixierung und immunzytochemische Färbungen von HEK 293-Zellen	38
2.15.2	Lichtmikroskopischer Nachweis von Proteinen in der Rattenretina	39
2.15.3	Lichtmikroskopischer Nachweis von HCN-Kanälen im Rattengehirn	41
2.15.4	Elektronenmikroskopischer Nachweis von HCN3 in der Rattenretina	42
2.16	Herstellung von monoklonalen Antikörpern	44
2.16.1	Kopplung von Peptiden an Trägerproteine	44
2.16.1.1	Kopplung von Peptiden an Trägerproteine über 3-Maleimidobenzoyl-N-hydroxy-succinimidester (MBS)	44
2.16.1.2	Kopplung von Peptiden an Trägerproteine über Glutaraldehyd (GA)	45
2.16.2	Expression und Reinigung von Maltose-Bindeprotein (MBP) und von MBP-Fusionsproteinen	46
2.16.2.1	Expression von MBP und von MBP-Fusionsproteinen	46
2.16.2.2	Reinigung von MBP und von MBP-Fusionsproteinen	46
2.16.3	Immunisierung von Ratten und Herstellung von Hybridomzellen	47
2.17	Herstellung und Reinigung von polyklonalen Antikörpern	47
2.17.1	Immunisierung von Kaninchen	48
2.17.2	Reinigung von polyklonalen Antikörpern durch Affinitätschromatographie	48
2.18	Immunpräzipitation	49
2.18.1	Immobilisierung von monoklonalen Antikörpern an Protein G-Sepharose	49
2.18.2	Immunpräzipitation von solubilisierten Membranproteinen an einer Antikörper/Säulenmatrix	50

3	Ergebnisse	52
3.1	Expression der HCN-Kanäle in menschlichen Geweben	53
3.1.1	Gewebespezifische Expression von hHCN1	53
3.1.2	Gewebespezifische Expression von hHCN4	55
3.2	Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern gegen HCN-Kanäle	57
3.2.1	Antigene zur Herstellung von Antikörpern gegen HCN-Kanäle	57
3.2.2	Herstellung, Test und Reinigung von polyklonalen Antikörpern	60
3.2.3	Herstellung und Test von monoklonalen Antikörpern	61
3.2.4	Charakterisierung der poly- und monoklonalen Antikörper an transfizierten HEK 293-Zellen	63
3.2.4.1	Westernblot-Analysen an transfizierten HEK 293-Zellen	64
3.2.4.2	Immunzytochemische Analysen an transfizierten HEK 293-Zellen	67
3.3	Charakterisierung der HCN-Kanäle in der Rattenretina	69
3.3.1	Westernblot-Analysen mit Membranproteinen der Rattenretina	69
3.3.2	Lokalisation der HCN-Kanäle in der Rattenretina	73
3.3.2.1	Lokalisation der HCN-Kanäle in der äußeren Rattenretina	75
3.3.2.2	Lokalisation der HCN-Kanäle in der inneren Rattenretina	77
3.3.3	Immunpräzipitationen	86
3.3.3.1	Optimierung der Immunpräzipitation	87
3.3.3.2	Immunpräzipitationen mit Membranproteinen aus transfizierten HEK 293-Zellen	91
3.3.3.3	Immunpräzipitationen mit Membranproteinen der Rattenretina	94
3.4	Charakterisierung der HCN-Kanäle im Ratten- und Mausgehirn	96
3.4.1	Westernblot-Analysen mit Membranproteinen des Ratten- und Mausgehirns	97
3.4.2	Lokalisation der HCN-Kanäle im Rattengehirn	99
4	Diskussion	105
4.1	Gewebespezifische Expression der HCN-Kanäle	105
4.2	Biochemische Charakterisierung der HCN-Kanalproteine	108
4.3	Lokalisation der HCN-Kanäle in der Rattenretina	111
4.4	Bilden HCN-Kanäle homo- oder heterooligomere Kanalkomplexe?	116
4.5	Ausblick	120

5	Zusammenfassung	122
6	Abstract	123
7	Literaturverzeichnis	124
8	Anhang	132
8.1	Aminosäuresequenzvergleich der HCN-Kanäle HCN1 bis HCN4 aus der Ratte	132
8.2	Zusammenfassung der Westernblot-Analysen mit Membranproteinen der Rattenretina	134
8.3	Zusammenfassung der Westernblot-Analysen mit Membranproteinen des Rattengehirns	135
8.4	Zusammenfassung der Westernblot-Analysen mit Membranproteinen des Mausgehirns	136
8.5	Zur Transfektion verwendete cDNA-Klone von HCN-Kanälen	137
8.6	Verwendete primäre Antikörper (HCN-unspezifisch)	138
8.7	Verwendete sekundäre und tertiäre Antikörper	139
8.8	Sequenzen und Hybridisierungsbereiche aller verwendeter Primer	140

II Abkürzungsverzeichnis

5'-GMP	5'-Guanosinmonophosphat
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B(p)	Basen(paare)
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>bovine serum albumine</i>)
°C	Grad Celsius
cAMP	Adenosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
cDNA	revers transkribierte DNA (<i>complementary DNA</i>)
cGMP	Guanosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
CHAPS	3-[(N-Cholanamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
Ci	Curie
CNG-Kanal	zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal (<i>cyclic nucleotide-gated channel</i>)
cNMP-Bindestelle	zyklisch Nukleotid-Bindestelle
cpm	Zählereignisse pro Minute (<i>counts per minute</i>)
C-Terminus	Carboxy-Terminus einer Polypeptidkette
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
<i>D.melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMP	Dimethylpimelimidat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTE	Dithioerythrol
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoldiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
g	Gramm, bzw. Normal-Fallbeschleunigung (9,81 ms ⁻²)
GA	Glutaraldehyd
GCL	Ganglienzellschicht (<i>ganglion cell layer</i>)
h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin
HCN1	Säugetier-HCN-Kanal Typ 1
HCN2	Säugetier-HCN-Kanal Typ 2
HCN3	Säugetier-HCN-Kanal Typ 3
HCN4	Säugetier-HCN-Kanal Typ 4
HCN-Kanal	hyperpolarisationsaktivierter und zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal (<i>hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channel</i>)
HCN-Strom	Ionenstrom durch einen HCN-Kanal
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)

HERG	ERG-Kanal aus Mensch (<i>human eag-related gene</i>)
hHCN1	HCN-Kanal Typ 1 aus Mensch
hHCN2	HCN-Kanal Typ 2 aus Mensch
hHCN3	HCN-Kanal Typ 3 aus Mensch
hHCN4	HCN-Kanal Typ 4 aus Mensch
<i>H.virescens</i>	<i>Heliothis virescens</i>
Ig	Immunglobulin
IgG1	Immunglobulin der Subklasse G1
IgG2a	Immunglobulin der Subklasse G2a
IgG2b	Immunglobulin der Subklasse G2b
IgM	Immunglobulin der Subklasse M
I _{Kr} -Strom	K ⁺ -Strom in einigen Herzmuskelzellen
INL	innere nukleäre Schicht (<i>inner nuclear layer</i>)
IPL	innere plexiforme Schicht (<i>inner plexiform layer</i>)
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
IPTG	Isopropylthio-β-D-galactosid
IS	Innensegmente (<i>inner segments</i>)
K _{ir} -Kanal	einwärtsrektifizierender K ⁺ -Kanal vom K _{ir} -Typ
KLH	Hämocyanin der Napfschnecke (<i>keyhole limpet hemocyanin</i>)
K _x -Kanal	auswärtsrektifizierender K ⁺ -Kanal vom K _x -Typ
l	Liter
m	Meter
M	Molar
MBP	Maltose-Bindeprotein
MBS	3-Maleimidobenzoyl-N-hydroxy-succinimidester
mHCN1	HCN-Kanal Typ 1 aus Maus
mHCN2	HCN-Kanal Typ 2 aus Maus
mHCN3	HCN-Kanal Typ 3 aus Maus
mHCN4	HCN-Kanal Typ 4 aus Maus
min	Minute(n)
MinK	β-Untereinheit einiger K ⁺ -Kanäle (<i>minimal K⁺-channel</i>)
MiRP1	β-Untereinheit einiger K ⁺ -Kanäle (<i>MinK-Related Peptid 1</i>)
MiRP2	β-Untereinheit einiger K ⁺ -Kanäle (<i>MinK-Related Peptid 2</i>)
MiRP3	β-Untereinheit einiger K ⁺ -Kanäle (<i>MinK-Related Peptid 3</i>)
mol	Mol
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
NGS	normales Ziegenserum (<i>normal goat serum</i>)
NFL	Nervenfaserschicht (<i>nerve fibre layer</i>)
NMS	normales Mausserum (<i>normal mouse serum</i>)
N-Terminus	Amino-Terminus einer Polypeptidkette
OD	Extinktion bei der im Index angegebenen Wellenlänge und einer Schichtdicke von 1 cm
OFF-Zellen	Neuronen in der Retina, die im Dunkeln depolarisieren ("light off")
ONL	äußere nukleäre Schicht (<i>outer nuclear layer</i>)
ON-Zellen	Neuronen in der Retina, die bei Belichtung depolarisieren ("light on")
OPL	äußere plexiforme Schicht (<i>outer plexiform layer</i>)
OS	Außensegmente (<i>outer segments</i>)
p.A.	pro analysi
PA	Paraformaldehyd
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)

pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
P_{Na}/P_K	relative Permeabilität von Na^+ - gegenüber K^+ -Ionen
rHCN1	HCN-Kanal Typ 1 aus Ratte
rHCN2	HCN-Kanal Typ 2 aus Ratte
rHCN3	HCN-Kanal Typ 3 aus Ratte
rHCN4	HCN-Kanal Typ 4 aus Ratte
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
S1-S6	transmembranale Segmente S1-S6 eines spannungsabhängigen K^+ -Kanals vom <i>Shaker</i> -Typ
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sek	Sekunde(n)
<i>S.purpuratus</i>	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T_m	Hybridisierungstemperatur von Primern bei der PCR
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>unit</i>)
ü.N.	über Nacht
ÜK	über Nacht-Kultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
Verd.	Verdünnung
v/v	Volumenprozent
W	Watt
w/v	Gewichtsprozent
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid
ZNS	Zentralnervensystem

Es wurden die üblichen Abkürzungen des "Système International" und dessen Vorsätze zur Bezeichnung von dezimalen Vielfachen und Teilen verwendet.

Nukleotide innerhalb einer Nukleinsäuresequenz sind durch die Anfangsbuchstaben der Basen bezeichnet (A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin und T: Thymin).

Aminosäuren sind nach dem Einbuchstabenkode abgekürzt:

Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Aspartat	D
Cystein	C
Glutamat	E
Glutamin	Q
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

1 Einleitung

Ionenkanäle kontrollieren den Fluß von Ionen über die Zellmembran. Sie sind integrale Membranproteine und bilden mikroskopisch kleine Poren in der hydrophoben Lipidschicht, durch die verschiedene Ionen strömen können (Hille, 1992). Der Ionenfluß ist entscheidend für die Entstehung und Weiterleitung elektrischer Signale.

Ionenkanäle können anhand ihrer *Ionenselektivität* unterschieden werden. Neben sehr selektiven Na⁺-, K⁺- oder Ca²⁺-Kanälen existieren auch Kanäle, die nur schlecht zwischen verschiedenen Ionen unterscheiden können. Ionenkanäle werden auch anhand ihres *Aktivierungsmechanismus* unterteilt. Während ligandengesteuerte Ionenkanäle durch die direkte Bindung extra- oder intrazellulärer Botenstoffe kontrolliert werden, reagieren spannungsabhängige Ionenkanäle auf Änderungen des Membranpotentials. Im Ruhezustand liegt das Membranpotential vieler Nervenzellen zwischen -60 und -70 mV ("Ruhepotential"). Die meisten spannungsabhängigen Ionenkanäle öffnen, wenn das Membranpotential positivere Werte annimmt ("Depolarisation"). Spannungsabhängige Na⁺- und Ca²⁺-Kanäle leiten dann einen Einwärtsstrom, der die Membran weiter depolarisiert und bei erregbaren Zellen Aktionspotentiale auslösen kann. Spannungsabhängige K⁺-Kanäle leiten dagegen einen K⁺-Auswärtsstrom, der die Membran wieder repolarisiert und in Nervenzellen die Aktionspotentiale beendet. Der andauernde K⁺-Auswärtsstrom verschiebt das Membranpotential in Richtung des K⁺-Gleichgewichtspotentials, das ca. -80 mV beträgt. Nimmt das Membranpotential in Folge dessen kurzfristig negativere Werte als das Ruhepotential der Zelle an, spricht man von einer "Hyperpolarisation".

1.1 Hyperpolarisationsaktivierte und zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle

Hyperpolarisationsaktivierte und zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle (*hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels*; HCN-Kanäle) wurden elektrophysiologisch bereits Ende der Siebziger Jahre des letzten Jahrhunderts im Sinusknoten des Säugetierherzens (Brown et al., 1979; Brown & DiFrancesco, 1980; Yanagihara & Irisawa, 1980) und in Photorezeptoren (Fain et al., 1978; Bader et al., 1979; Attwell & Wilson, 1980; Bader et al., 1982) beschrieben. Im Gegensatz zu den meisten spannungsabhängigen Ionenkanälen werden HCN-Kanäle nicht durch Depolarisation der Zellmembran, sondern durch Hyperpolarisation aktiviert. Deshalb wurden sie auch als

I_h -Kanäle (*hyperpolarization-activated*) bezeichnet. HCN-Kanäle können in Nervenzellen, sensorischen Zellen, Muskelzellen, aber auch in einigen nicht erregbaren Zellen nachgewiesen werden (Übersicht: DiFrancesco, 1993; Pape, 1996; Gauss & Seifert, 2000; Kaupp & Seifert, 2001).

Die HCN-Kanäle unterscheiden sich nicht nur in ihrem Aktivierungsmechanismus deutlich von anderen spannungsabhängigen Ionenkanälen. Sie besitzen einige so ungewöhnliche und charakteristische Eigenschaften, daß sie zunächst auch als I_f -Kanäle (*funny*) oder I_q -Kanäle (*queer*) bezeichnet wurden (Pape, 1996). Im folgenden sollen diese Eigenschaften kurz beschrieben werden.

1. *Ionenselektivität.* HCN-Kanäle weisen eine ungewöhnliche Ionenselektivität auf. Sie sind schwach K^+ -selektiv, leiten aber auch Na^+ -Ionen. Die relative Permeabilität von Na^+ -gegenüber K^+ -Ionen (P_{Na}/P_K) ist abhängig von der Konzentration extrazellulärer K^+ -Ionen und variiert zwischen 0,2 und 0,4 (Edman et al., 1987; Hestrin, 1987; Maricq & Korenbrot, 1990; Wollmuth & Hille, 1992; Solomon & Nerbonne, 1993). Auch extrazelluläre Cl^- -Ionen beeinflussen die Permeationseigenschaften der HCN-Kanäle (Pape, 1996). Die schwache K^+ -Selektivität unterscheidet die HCN-Kanäle sowohl von K^+ -selektiven Kanälen ($P_{Na}/P_K \leq 0,09$; Hille, 1992), als auch von nicht-selektiven Kationenkanälen ($P_{Na}/P_K \approx 1$; Hille, 1992). Unter physiologischen Bedingungen liegt das Umkehrpotential der HCN-Kanäle bei etwa -30 mV. Daher leiten HCN-Kanäle nach Hyperpolarisation der Membran einen Na^+ -Einwärtsstrom, der die Membran depolarisiert.

2. *Blockierbarkeit.* Geringe Konzentrationen extrazellulärer Cs^+ -Ionen blockieren die HCN-Kanäle in Abhängigkeit von der Spannung (Noma et al., 1983; DiFrancesco, 1985). Dagegen sind HCN-Kanäle gegenüber extrazellulären Ba^{2+} -Ionen relativ unempfindlich, wodurch sie sich von den klassischen einwärtsrektifizierenden K^+ -Kanälen (sogenannte K_{ir} -Kanäle) unterscheiden (DiFrancesco, 1985).

3. *Änderung des Öffnungsverhaltens.* Zyklische Nukleotide (cAMP und cGMP) modulieren das spannungsabhängige Öffnen der HCN-Kanäle, indem sie direkt an das Kanalprotein binden. Wenn sich die intrazelluläre Konzentration von cAMP bzw. cGMP ändert, verschiebt sich auch die Aktivierungskurve der HCN-Kanäle. Eine Erhöhung der cAMP-Konzentration verschiebt beispielsweise in isolierten Schrittmacherzellen des Kaninchenherzens die Aktivierungskurve um ca. 10 mV zu positiveren Spannungen (DiFrancesco & Tortora, 1991). Dadurch öffnen die HCN-Kanäle bereits bei weniger negativen Membranpotentialen.

Es gibt einige Hinweise darauf, daß die Eigenschaften der HCN-Kanäle auch durch andere Mechanismen moduliert werden. Dazu zählen die Phosphorylierung des Kanalproteins, sowie die Wechselwirkungen mit Ca^{2+} -Ionen oder anderen Proteinen (Übersicht: Pape, 1996).

Obwohl HCN-Kanäle bereits seit über 20 Jahren elektrophysiologisch untersucht wurden, war ihre Aminosäuresequenz lange Zeit unbekannt. Mittlerweile ist es gelungen, die Gene der HCN-Kanäle von verschiedenen Invertebraten und Vertebraten zu klonieren. Während in den Invertebraten *S.purpuratus*, *H.virescens* und *D.melanogaster* jeweils nur ein einziges Gen gefunden wurde (Gauss et al., 1998; Krieger et al., 1999; Marx et al., 1999), wurden in allen untersuchten Säugetierspezies jeweils vier verschiedene Gene für HCN-Kanäle identifiziert (Santoro et al., 1997; Ludwig et al., 1998; Santoro et al., 1998; Ludwig et al., 1999; Seifert et al., 1999; Shi et al., 1999; Ishii et al., 1999; Übersicht: z.B. Kaupp & Seifert 2001). Diese Isoformen werden als HCN1 bis HCN4 bezeichnet, wobei die Spezies durch ein Präfix gekennzeichnet wird (h = *human*; m = *mouse*; r = *rat*; etc.) (Clapham, 1998). Alle vier Kanaltypen wurden inzwischen in heterologen Expressionssystemen elektrophysiologisch untersucht (Ludwig et al., 1998; Santoro et al., 1998; Ishii et al., 1999; Ludwig et al., 1999; Seifert et al., 1999; Santoro et al., 2000; Moosmang et al., 2001). Jeder Kanaltyp war dabei in der Lage, einen homooligomeren Kanal mit charakteristischen elektrophysiologischen Eigenschaften zu bilden.

1.2 Strukturelle Eigenschaften von HCN-Kanälen

Die HCN-Kanäle sind sowohl mit den spannungsabhängigen K^+ -Kanälen vom *Shaker*-Typ, als auch mit den zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen (*cyclic nucleotide-gated channels*; CNG-Kanäle) phylogenetisch verwandt. Abb. 1.1 zeigt ein Modell der transmembranalen Topologie der HCN-Kanäle, das sich an die Vorstellung über die Struktur der K^+ -Kanäle (Miller, 1991; Jan & Jan, 1992; Pongs, 1992) und der CNG-Kanäle (Henn et al., 1995) anlehnt. Die HCN-Kanäle weisen vermutlich sechs transmembranale Segmente (S1-S6) auf. Der N- und der C-Terminus liegen intrazellulär. Zwischen S5 und S6 befindet sich die porenbildende Region, die maßgeblich die Selektivitäts- und Leitfähigkeitseigenschaften der Ionenkanäle bestimmt (MacKinnon & Yellen, 1990; Yellen et al., 1991; Yool & Schwarz, 1991; Backx et al., 1992; Eismann et al., 1994; MacKinnon, 1995). Das transmembranale Segment S4 enthält ein sogenanntes Spannungsfühlermotiv, wie man es von den spannungsabhängigen Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Kanälen kennt (Übersicht: Stühmer, 1991; Jan &

Jan, 1992; Pongs, 1992). Es ist wahrscheinlich am spannungsabhängigen Öffnen der HCN-Kanäle beteiligt. Im C-terminalen Bereich besitzen HCN-Kanäle, ähnlich wie CNG-Kanäle und cAMP/cGMP-abhängige Proteinkinasen, eine Bindestelle für zyklische Nukleotide (cNMP-Bindestelle; Takio et al., 1984; Weber et al., 1987; Kaupp et al., 1989).

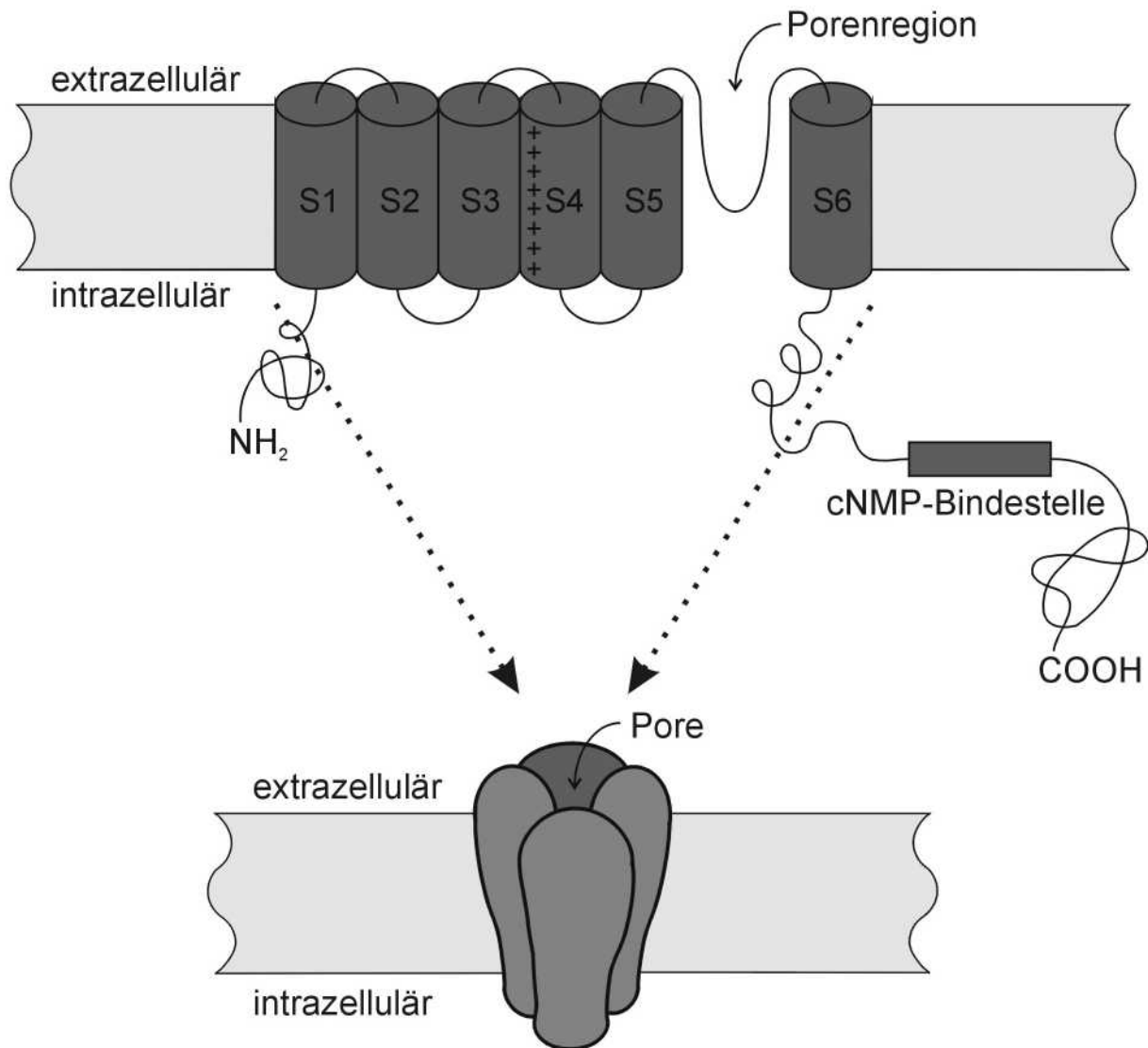


Abb. 1.1: Modell der transmembranalen Topologie der HCN-Kanäle. Im oberen Teil ist die transmembranale Topologie einer Untereinheit des HCN-Kanals mit den sechs transmembranalen Segmenten (S1-S6), der porenbildenden Region (Porenregion) und der Bindestelle für zyklische Nukleotide (cNMP-Bindestelle) dargestellt. N- und C-Terminus der Polypeptidkette sind mit NH₂ bzw. COOH gekennzeichnet. Die untere Skizze zeigt, wie sich vier Untereinheiten zu einem funktionellen Kanal zusammenlagern.

Die Aminosäuresequenzen der vier verschiedenen HCN-Kanaltypen sind stark homolog. Die größte Ähnlichkeit besteht in einem Abschnitt, der vom ersten transmembranalen Segment (S1) bis zum Ende der cNMP-Bindestelle reicht (80 bis 90 % Aminosäureidentität). Die N- und C-terminalen Abschnitte der vier Polypeptidketten weisen nur eine schwache Sequenzähnlichkeit auf. Im Anhang (Abschnitt 8.1) ist ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der vier HCN-Kanäle aus der Ratte (rHCN1 bis rHCN4) gezeigt.

Vermutlich lagern sich wie bei den K^+ -Kanälen (MacKinnon, 1991) und den CNG-Kanälen (Kaupp, 1995) auch bei den HCN-Kanälen vier Untereinheiten zu einem funktionellen Kanal zusammen. Für die CNG-Kanäle konnte gezeigt werden, daß solche Kanalkomplexe aus verschiedenen Untereinheiten bestehen können ("heterooligomere Komplexe"; Kaupp, 1995; Bönigk et al., 1999). Die Vermutung liegt daher nahe, daß funktionelle HCN-Kanäle ebenfalls aus verschiedenen HCN-Kanaltypen bestehen. Erste Experimente deuten darauf hin, daß die Kanalproteine HCN1 und HCN2 in ko-injizierten Froschoozyten heterooligomere Kanalkomplexe bilden (Chen et al., 2001; Ulens & Tytgat, 2001). Ob HCN-Kanäle aber auch *in vivo* als heterooligomere Komplexe vorliegen, kann nur geklärt werden, wenn die zelluläre Lokalisation der vier HCN-Kanaltypen bekannt ist.

1.3 Die physiologische Bedeutung von HCN-Kanälen

Werden HCN-Kanäle aktiviert, leiten sie einen Na^+ -Einwärtsstrom, der die Zellmembran depolarisiert. Sie spielen daher eine wichtige Rolle in vielen Nervenzellen, sensorischen Zellen, Muskelzellen, aber auch in einigen nicht erregbaren Zellen. HCN-Kanäle haben mehrere Funktionen. Sie sind an der Erzeugung und Regulation zellulärer rhythmischer Aktivierungsmuster beteiligt. Sie schützen die Zelle vor zu großer Hyperpolarisation und sind auch an der Verarbeitung einkommender synaptischer Signale beteiligt. Welche Aufgaben HCN-Kanäle in den verschiedenen Zellen genau erfüllen, hängt davon ab, mit welchen anderen Ionenkanälen sie zusammenwirken.

HCN-Kanäle in Schrittmacherzellen des Herzens:

Die physiologische Bedeutung der HCN-Kanäle ist besonders gut in den primären und sekundären Schrittmacherzentren des Herzens untersucht (Übersicht: DiFrancesco, 1993). Bei den Schrittmacherzentren handelt es sich um wenige spezialisierte Muskelzellen im Herzen, die selbstständig Aktionspotentiale in rhythmischer Abfolge erzeugen können. Die endogenen Oszillationen des Membranpotentials werden durch das Zusammenspiel von mindestens vier verschiedenen Ionenkanälen erzeugt: Zwei Ca^{2+} -Kanaltypen, ein K^+ -Kanal und der als "Schrittmacher-Kanal" bezeichnete HCN-Kanal. Die Entstehung von Aktionspotentialen in den Schrittmacherzentren läßt sich wie folgt darstellen (Abb. 1.2):

Membranpotential (mV)

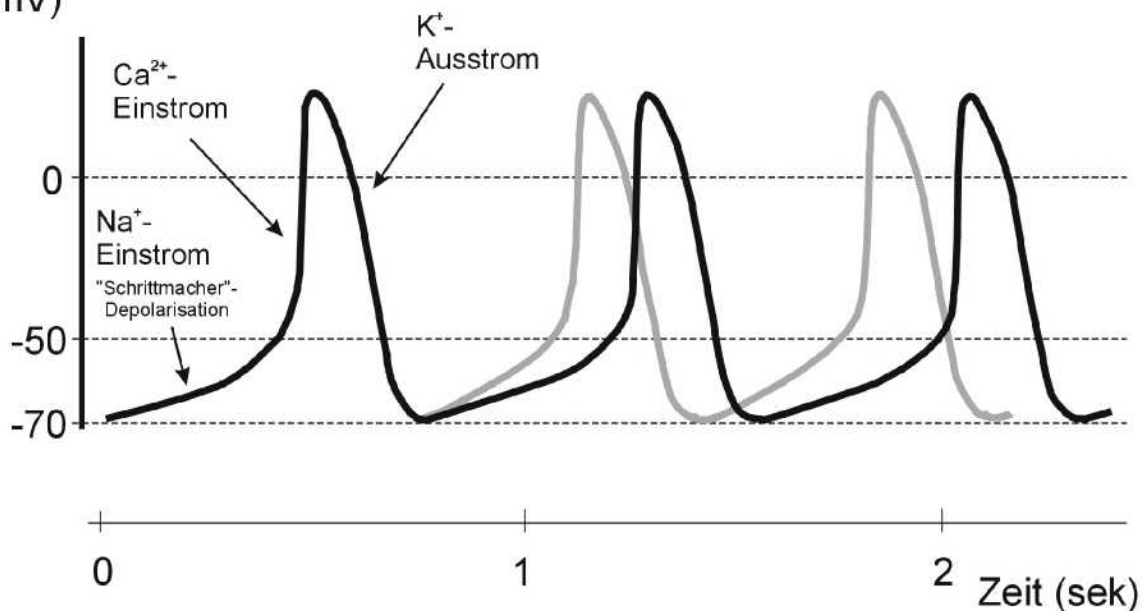


Abb. 1.2: Erzeugung von rhythmischen Aktionspotentialen in Schrittmacherzellen des Herzens. Dargestellt ist die zeitliche Änderung des Membranpotentials bei spontaner Aktivität in Schrittmacherzellen des Herzens. Drei unterschiedliche Ionenströme sind an der Entstehung der Aktionspotentiale (schwarze Kurve) beteiligt. Die Ausschüttung von Adrenalin durch postganglionäre Neuronen des Sympathikus bewirkt eine Erhöhung der Herzschlagfrequenz (graue Kurve).

HCN-Kanäle werden durch Hyperpolarisation der Membran geöffnet. Sie leiten dann einen Einwärtsstrom, der die Membran langsam depolarisiert ("Schrittmacher-Depolarisation"). Bei einem Membranpotential von etwa -50 mV werden spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle vom T-Typ aktiviert. Diese leiten dann einen transienten Ca²⁺-Einstrom, der die Membran weiter depolarisiert. Bei einem Membranpotential von etwa -30 mV werden Ca²⁺-Kanäle des L-Typs aktiviert, die dann ein Ca²⁺-Aktionspotential auslösen. Infolge der Depolarisation schließen die HCN-Kanäle und spannungsabhängige K⁺-Kanäle werden aktiviert. Der K⁺-Ausstrom führt zu einer Repolarisation der Membran. Am Ende des Aktionspotentials liegt das Membranpotential nahe des K⁺-Gleichgewichtspotentials (ca. -80 mV). Durch diese Hyperpolarisation werden die HCN-Kanäle erneut geöffnet und das nächste Aktionspotential vorbereitet. Die Frequenz, mit der die Aktionspotentiale aufeinander folgen, hängt davon ab, wie viele HCN-Kanäle geöffnet werden. Die Ausschüttung von Adrenalin durch postganglionäre Neuronen des Sympathikus erhöht über eine G-Protein-abhängige Signalkaskade die intrazelluläre cAMP-Konzentration. Durch direkte Bindung des cAMP an das HCN-Kanalprotein wird die Aktivierungskurve des HCN-Kanals nach rechts verschoben; d.h. der Kanal öffnet schon bei weniger negativen Spannungswerten. Dadurch wird die "Schrittmacher-Depolarisation" beschleunigt und die Herzschlagfrequenz erhöht sich (graue

Kurve). Die Ausschüttung von Acetylcholin durch parasympathische Neuronen führt dagegen zu einer Abnahme der intrazellulären cAMP-Konzentration und damit zu einer Abnahme der Herzschlagfrequenz (nicht gezeigt).

Die rhythmischen Aktivierungsmuster werden in den primären Schrittmacherzentren (Sinusknoten bzw. Sinus venosus) erzeugt. Die Aktionspotentiale werden dann über die sekundären Schrittmacherzentren (Atrioventrikularknoten, Hiss'sche Bündel und Purkinjefasern) auf den gesamten Herzmuskel übertragen und lösen eine Kontraktion aus. Auch die sekundären Schrittmacherzentren können rhythmische Aktivierungsmuster erzeugen. Ihr Eigenrhythmus wird jedoch normalerweise durch die schneller aufeinanderfolgenden Aktionspotentiale der primären Schrittmacherzentren überlagert. Fällt die Erregungsbildung im Sinusknoten bzw. Sinus venosus aus, kann diese Funktion von den untergeordneten Zentren übernommen werden, wobei das Herz mit niedrigerer Frequenz weiterschlägt. Bislang konnte noch nicht geklärt werden, auf welche Weise sich die HCN-Kanäle in den verschiedenen Schrittmacherzentren voneinander unterscheiden und wie die unterschiedlichen Schlagfrequenzen zustande kommen.

Auch in zahlreichen Regionen des Gehirns erfüllen HCN-Kanäle die Funktion von Schrittmacher-Kanälen. Ein besonders gut untersuchtes Beispiel sind dabei einzelne Neuronen im Thalamus, die bei der Regulation des Schlaf-Wachrhythmus von entscheidender Bedeutung sind (Pape & McCormick, 1989; McCormick & Bal, 1997; Lüthi & McCormick, 1999). Auch in diesen Zellen hat die intrazelluläre cAMP-Konzentration Einfluß auf die Schrittmacheraktivität der HCN-Kanäle.

In vielen anderen Neuronen bestimmen HCN-Kanäle zusammen mit K^+ -Kanälen das Ruhepotential. Dem Einwärtsstrom von Na^+ -Ionen durch HCN-Kanäle wirkt der Ausstrom von K^+ -Ionen entgegen. Die Beteiligung des HCN-Stroms am Ruhepotential kann großen Einfluß auf die Integration synaptischer Signale haben. Beispielsweise wird eine Hyperpolarisation, die durch inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSP) ausgelöst wird, durch die erhöhte HCN-Aktivität reduziert und der Effekt dadurch vermindert (Übersicht: Pape, 1996). Beaumont & Zucker (2000) haben Hinweise darauf gefunden, daß präsynaptische HCN-Ströme über die Serotonin-induzierte Änderung der cAMP-Konzentration direkt an der Kontrolle der synaptischen Transmission beteiligt sind.

HCN-Kanäle in Photorezeptoren:

In Photorezeptoren der Wirbeltiernetzhaut (Retina) wurde schon früh ein hyperpolarisations-aktiver Ionenkanal mit den typischen biophysikalischen Eigenschaften der HCN-Kanäle beschrieben. HCN-Kanäle konnten elektrophysiologisch in den Innensegmenten sowohl von Stäbchen (Fain et al., 1978; Bader et al., 1979; Attwell & Wilson, 1980; Bader et al., 1982), als auch von Zapfen (Attwell et al., 1982; Barnes & Hille, 1989; Maricq & Korenbrot, 1990) nachgewiesen werden.

Im Dunkeln beträgt das Ruhepotential von Stäbchen ca. -30 bis -40 mV. Das Ruhepotential wird bestimmt durch den Einstrom von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen durch CNG-Kanäle in den Außensegmenten der Photorezeptoren und den Ausstrom von K^+ -Ionen durch den K_x -Kanal in den Innensegmenten der Photorezeptoren (Abb. 1.3 A). Bei diesem Membranpotential sind die HCN-Kanäle geschlossen und tragen nicht zum Ruhepotential der Photorezeptoren bei.

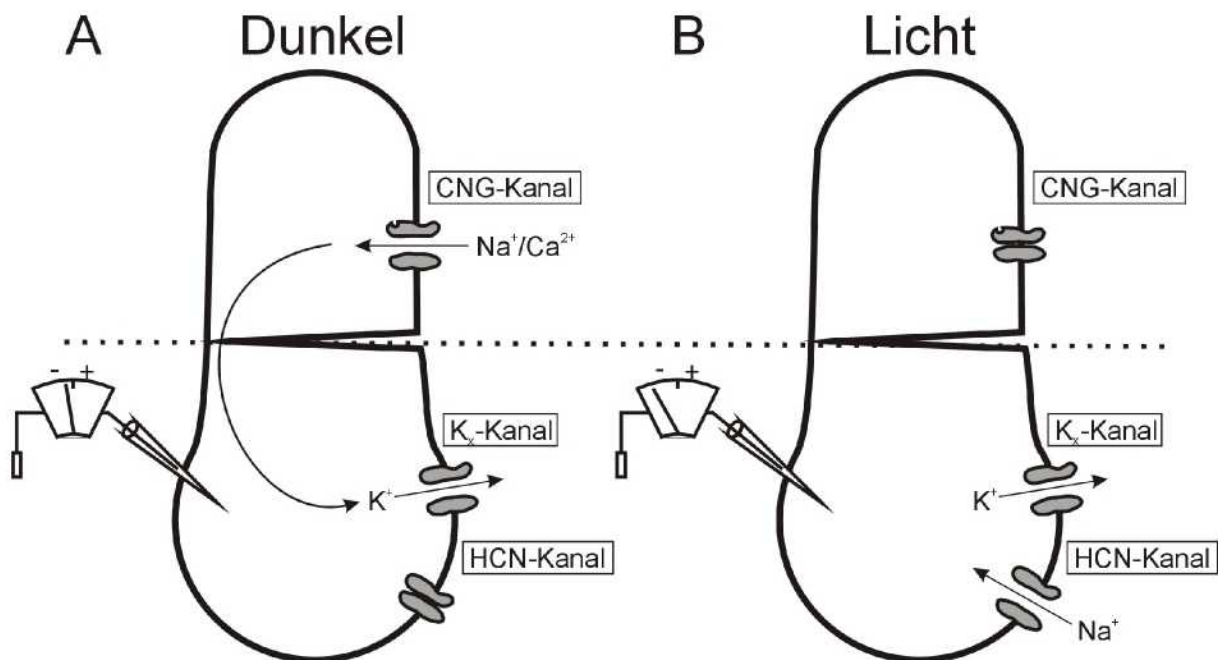


Abb. 1.3: Änderung des Membranpotentials an Photorezeptoren bei Belichtung. Schematische Darstellung eines Photorezeptors, der sich morphologisch in ein Außensegment (oberhalb der gestrichelten Linie) und ein Innensegment (unterhalb) gliedert. Im Dunkeln (A) liegt das Ruhepotential bei ca. -40 mV. Dem Einwärtsstrom von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen durch die CNG-Kanäle wirkt ein Auswärtsstrom von K^+ -Ionen durch die K_x -Kanäle entgegen. Die HCN-Kanäle sind bei diesem Membranpotential geschlossen. Bei Belichtung (B) schließen die CNG-Kanäle, während die K_x -Kanäle geöffnet bleiben. Dies führt zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran (schematisches Spannungsmeßgerät). Bei starker Belichtung der Photorezeptoren bewirkt die Hyperpolarisation ein Öffnen der HCN-Kanäle. Der Einstrom von Na^+ -Ionen wirkt dem K^+ -Ausstrom durch die K_x -Kanäle entgegen und schützt die Zelle vor übermäßiger Hyperpolarisation.

Bei Belichtung der Photorezeptoren ändert die Absorption eines Lichtquants die Konformation des Sehpigments Rhodopsin. Rhodopsin aktiviert dann über ein G-Protein (Transducin) eine Phosphodiesterase, die cGMP zu 5'-GMP hydrolysiert. Dadurch wird die intrazelluläre cGMP-Konzentration verringert. Wenn die cGMP-Konzentration abnimmt, schließen die CNG-Kanäle und der depolarisierende Einwärtsstrom von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen nimmt ab. Der andauernde Auswärtsstrom von K^+ -Ionen durch den K_x -Kanal hyperpolarisiert die Zelle (Abb. 1.3 B). Dadurch wird am synaptischen Endglied der Sehzelle weniger des Transmitters Glutamat ausgeschüttet (Überblick: Stryer, 1991; Yau, 1994; Müller & Kaupp, 1998). Ein starker Lichtreiz hyperpolarisiert die Membran soweit, daß die HCN-Kanäle aktiviert werden. Diese leiten dann einen depolarisierenden Einwärtsstrom, der die Dauer und Amplitude der Hyperpolarisation begrenzt. In Folge dessen schütten die Photorezeptoren wieder verstärkt Glutamat aus. HCN-Kanäle wirken also den Effekten eines starken Lichtreiz entgegen und sind somit an der Lichtadaptation in Photorezeptoren beteiligt. In Frosch-Photorezeptoren werden die HCN-Kanäle nicht durch die Bindung von cAMP oder durch Phosphorylierung moduliert (Akopian & Witkovsky, 1996). Ob cAMP in Säugetier-Photorezeptoren die Eigenschaften der HCN-Kanäle moduliert, ist bislang nicht untersucht worden.

Die CNG-Kanäle in Stäbchen und Zapfen sind aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt (Kaupp, 1995). Es ist daher eine interessante Frage, ob sich auch die HCN-Kanäle in Stäbchen und Zapfen voneinander unterscheiden. Zudem wurden HCN-Ströme auch in Bipolarzellen der Maus- und Rattenretina beschrieben (Kaneko et al., 1989; Karschin & Wässle, 1990). Die Funktion dieser Ströme ist bislang unklar. Auf jeden Fall werden aber HCN-Kanäle in verschiedenen Zelltypen der Retina exprimiert. Die Retina ist im Gegensatz zu vielen anderen Teilen des Zentralnervensystems ein klar gegliedertes Gewebe. Wenn es gelingt, die Lokalisation der HCN-Kanäle in der Retina aufzuklären, kann dieses Wissen die Untersuchungen an Gehirnarealen mit komplizierteren Strukturen erleichtern.

1.4 Aufbau der Retina

Die Retina ist ein ca. 200 μm dickes Nervengewebe, das den Augenhintergrund auskleidet. Sie entsteht in der Embryonalentwicklung als Ausstülpung des Zwischenhirns und ist somit ein Teil des Zentralnervensystems. Die Retina ist anatomisch klar geschichtet (Abb. 1.4) und die verschiedenen Zelltypen lassen sich gut identifizieren.

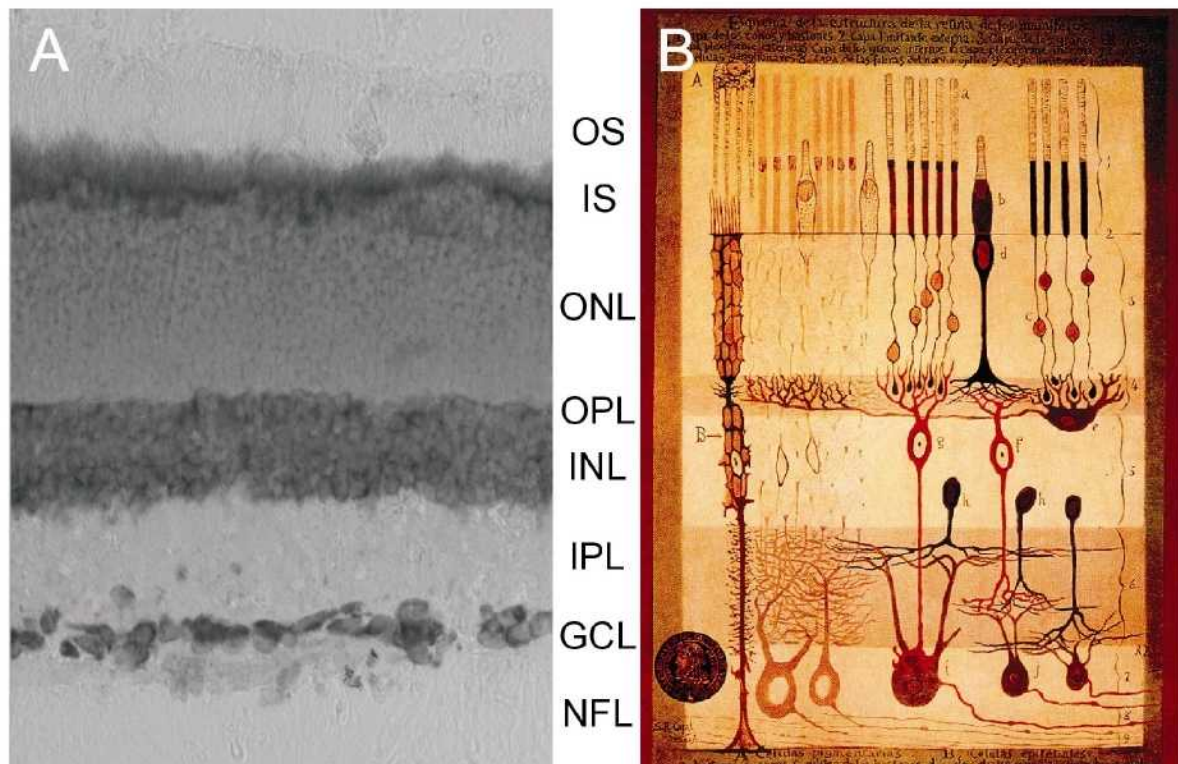


Abb. 1.4: Schichtung der Retina: A): Nisslfärbung eines Vertikalschnitts durch eine Rattenretina. B): Schematischer Aufbau der Retina nach Cajal (entnommen aus Hubel, 1988). OS: Außensegmente, IS: Innensegmente, ONL: äußere nukleäre Schicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere nukleäre Schicht, IPL: innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht, NFL: Nervenfaserschicht.

Das Wirbeltierauge ist ein sogenanntes "inverses Auge"; d.h. die Photorezeptoren befinden sich auf der lichtabgewandten Seite der Retina. Die Zellkörper der Photorezeptoren bilden die äußere nukleäre Schicht (*outer nuclear layer*, ONL). In den Außensegmenten der Photorezeptoren entsteht nach Absorption von Licht ein gradiertes elektrisches Signal ("Phototransduktion"). Die Axone der Photorezeptoren übertragen das Signal in die erste Synapsenschicht, die äußere plexiforme Schicht (*outer plexiform layer*, OPL). Dort wird es auf Neuronen zweiter Ordnung, die Bipolarzellen und Horizontalzellen, übertragen. Deren Zellkörper befinden sich in der inneren nukleären Schicht (*inner nuclear layer*, INL). Die Bipolarzellen leiten das Signal weiter in die innere plexiforme Schicht (*inner plexiform layer*, IPL), wo sie mit Ganglienzellen und Amakrinzellen verschaltet sind. Die Zellkörper von Amakrinzellen liegen in der INL nahe der IPL oder als sogenannte "versetzte Amakrinzellen" neben den Zellkörpern der Ganglienzellen in der Ganglienzellschicht (*ganglion cell layer*, GCL). Die Axone der Ganglienzellen sammeln sich in der Nervenfaserschicht (*nerve fibre layer*, NFL) und laufen als Axonbündel zur retinalen Papille (blinder Fleck). Dort bilden sie den Sehnerv, der die Signale an höhere visuelle Zentren im Gehirn weiterleitet (Übersicht:

Peichl, 1990; Wässle & Boycott, 1991). Im Gegensatz zu den meisten anderen Zellen in der Retina, die vornehmlich gradierte elektrische Potentiale bilden, erzeugen die Ganglienzellen Aktionspotentiale, da die Information über weite Strecken geleitet werden muß.

Das gradierte elektrische Signal, das in den Photorezeptoren als Antwort auf einen Lichtreiz erzeugt wird, wird nicht einfach nur ins Gehirn weitergeleitet. An jeder Synapse wird die Information neu verrechnet und moduliert. Eine besondere Rolle spielen dabei laterale Einflüsse (Schiller, 1992). Sie werden durch zwei Typen von Neuronen übermittelt: die Horizontalzellen und die Amakrinzellen. Horizontalzellen modulieren den Informationsfluß durch die Retina in der OPL, während Amakrinzellen in der IPL wirken.

Die fünf Hauptklassen retinaler Neuronen (Photorezeptoren, Bipolarzellen, Amakrinzellen, Horizontalzellen und Ganglienzellen) lassen sich jeweils in mehrere Subtypen unterteilen. Als Unterscheidungsmerkmale dienen beispielsweise die Morphologie, die verwendeten Neurotransmitter oder zelltyp-spezifische Markerproteine. Eine andere Möglichkeit, verschiedene Zelltypen voneinander zu unterscheiden, ist deren Antwortverhalten auf einen Lichtreiz: alle Zellen, die im Dunkeln ("*light off*") depolarisieren, werden als "OFF-Zellen" definiert. "ON-Zellen" dagegen depolarisieren bei Belichtung ("*light on*").

Neben den fünf Klassen retinaler Neuronen sind in der Retina auch drei Klassen von Gliazellen zu finden, welche die Zellkörper und Axone der Nervenzellen umgeben. Neben den Müllerzellen, die den häufigsten Typ von Gliazellen in der Retina darstellen, konnten auch Astroglia (Ogden, 1978) und Mikroglia (Boycott & Hopkins, 1981) in der Retina nachgewiesen werden.

1.5 Zielsetzung

Nachdem die Gene der HCN-Kanäle identifiziert worden waren, haben mehrere Arbeitsgruppen damit begonnen, die Expressionsmuster der Säugetier-HCN-Kanäle zu untersuchen (Übersicht: Kaupp & Seifert, 2001). Die überwiegend molekularbiologischen Untersuchungen beschränkten sich jedoch meist auf die gewebespezifische Expression der HCN-Kanäle. Insbesondere die zelluläre und subzelluläre Lokalisation der HCN-Kanäle ist aber für deren Funktion entscheidend. In CA1-Pyramidenzellen des Hippocampus beispielsweise erhöht sich die HCN-Kanaldichte vom distalen Ende der Dendriten hin zum apikalen Ende um das Siebenfache. Diese ungleiche Verteilung der HCN-Kanäle innerhalb einer Zelle ermöglicht es, Signale zu synchronisieren, die von unterschiedlich weit entfernten Eingängen stammen (Magee, 1998 und 1999).

In der vorliegenden Arbeit sollten daher die Expressionsmuster der HCN-Kanäle bis zur subzellulären Ebene aufgeklärt werden. Dazu mußten spezifische Antikörper gegen alle vier HCN-Kanaltypen hergestellt werden. Die Qualität der Antikörper sollte zunächst durch Westernblot-Analysen und immunzytochemische Methoden an heterolog exprimierten HCN-Kanälen überprüft werden, bevor die Antikörper für Untersuchungen am nativen Gewebe eingesetzt wurden. Die Expression der HCN-Kanäle sollte zunächst in der Rattenretina - später auch im Ratten- und Mausgehirn - untersucht werden. Zudem sollte die Frage geklärt werden, ob in einem Zelltyp bzw. in einem Zellkompartiment mehrere HCN-Kanaltypen ko-exprimiert werden und ob die HCN-Kanäle heterooligomere Komplexe bilden können. Diese Frage ist insbesondere deswegen wichtig, da heterooligomere Kanalkomplexe ganz andere funktionelle Eigenschaften besitzen können als homooligomere HCN-Kanäle. In diesem Zusammenhang wurde auch untersucht, ob die HCN-Kanäle posttranskriptionale oder posttranslationale Modifikationen erfahren. Das Wissen über die funktionellen Eigenschaften der HCN-Kanäle und ihre zelluläre und subzelluläre Lokalisation erlauben möglicherweise erste Rückschlüsse auf die physiologische Funktion der HCN-Kanäle in den einzelnen Zelltypen.

2 Material und Methoden

Die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden wurden, soweit nicht anders vermerkt, aus Sambrook et al. (1989) entnommen oder in Anlehnung daran modifiziert.

2.1 Material

Es wurden Chemikalien in p.A. Qualität von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Biozym (Hess. Oldendorf), Merck (Darmstadt), MWG-Biotech (Ebersberg), Pierce (Rockford, USA), Qiagen (Hilden), Riedel-de Haën AG (Seelze), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und USB (Bad Homburg) bezogen. Enzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von Ambion (Austin, USA), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), GIBCO BRL (Eggenstein), NEB (Schwalbach) und Roche (Mannheim) geliefert. Für die Erhaltung und Vermehrung von Bakterienkulturen wurden Medien von der Firma Sigma (Deisenhofen) verwendet. Chemikalien und Fertiglösungen für die Zellkultur waren von GIBCO BRL (Eggenstein). Sekundäre Antikörper und Reagenzien für immunologische Nachweise wurden von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), BioSource (Camarillo, USA), Dianova (Hamburg), Molecular Probes (Leiden, Niederlande) und Pierce (Rockford, USA) bezogen. Radionukleotide wurden von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) geliefert. Proteine wurden auf die PVDF-Membran Immobilon P der Firma Millipore (Eschborn) transferiert. Für die Autoradiographie und die Chemilumineszenz wurden ECL Hyperfilme von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) verwendet. Die Peptide, die zur Herstellung der Antikörper verwendet wurden, wurden von der AG Beyermann (FMP Berlin) hergestellt.

Alle Lösungen wurden ausschließlich mit zweifach destilliertem Wasser hergestellt. Soweit erforderlich, wurden die Lösungen durch Autoklavieren (20 min; 121°C) sterilisiert.

2.2 *E.coli*-Zellkultur

2.2.1 Verwendeter Bakterienstamm und Plasmidvektoren

In dieser Arbeit wurde der *E.coli* K12-Stamm mit folgendem Genotyp benutzt:

XL1-Blue:

(Bullock et al., 1987) *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (r_K^- , m_K^+), *supE44*, *relA1*, *lac* [F' *proAB*, *lacI^fZΔM15*, *Tn10* (Tet^r)]. Dieser Bakterienstamm wurde zur Anreicherung von Plasmid-DNA und zur Expression von Maltose-Bindeprotein (MBP) und MBP-Fusionsproteinen verwendet.

In dieser Arbeit wurden folgende Plasmidvektoren benutzt:

pBluescript SK⁻:

(Short et al., 1988; Stratagene) Dieses Plasmid wurde als Vektor für die Klonierung von rekombinanter DNA verwendet.

pcDNA I Amp:

(Invitrogen) Dieses Plasmid wurde für die transiente Expression von Genen in Zellen der menschlichen, embryonalen Nierenzelllinie 293 (HEK 293-Zellen) verwendet.

pMal c2X:

(NEB) Dieses Plasmid wurde zur Expression von Maltose-Bindeprotein (MBP) und MBP-Fusionsproteinen in Bakterien verwendet.

2.2.2 Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für *E.coli*

LB (Luria-Bertani)-Medium:

1 % Baktotrypton

0,5 % Hefeextrakt

1 % NaCl

Für LB-Agar-Platten wurden 1,5 % Agar zugesetzt.

Die Flüssigmedien wurden in Portionen aufgeteilt, autoklaviert (20 min; 121°C) und bei RT gelagert. Agar enthaltende Medien wurden autoklaviert und in sterile Petrischalen gegossen (25-30 ml/Platte). Bei Bedarf wurde Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) oder Tetracyclin (Endkonzentration: 12,5 µg/ml) kurz vor dem Gießen der Platten in den höchstens noch 60°C heißen Agar gegeben. Die Platten wurden bei 4°C aufbewahrt.

Zur Farbidentifizierung von XL1-Blue-Bakterienkolonien mit rekombinanter DNA wurden auf LB-Agarplatten 50 µl X-Gal (250 mg/ml) und 25 µl IPTG (120 mg/ml) ausgestrichen.

2.2.3 Anzucht von *E.coli*-Bakterienkulturen

2.2.3.1 Anzucht von *E.coli*-Zellen zur Plasmidpräparation

E.coli-Zellen einer Bakterienkolonie oder einer Vorkultur wurden mindestens 8 h in LB-Medium bei 37°C in einem Rotationsinkubator (New Brunswick; Nörtingen) oder in einem Warmluftschüttler (Braun-Dissel; Melsungen) inkubiert. Zur Selektion auf Plasmide wurde das Medium mit einem geeigneten Antibiotikum (2.2.2) versetzt.

2.2.3.2 Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation mit Plasmid-DNA

Kompetente Zellen wurden mit einer modifizierten Form der CaCl₂-Methode nach Mandel & Higa (1970) hergestellt. 0,5 ml einer *E.coli*-Übernachtskultur (ÜK) wurden in 50 ml LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert (entspricht einer Bakterienkonzentration von 2×10^8 Zellen/ml) und 10 min bis 2 h auf Eis abgekühlt. Bei den folgenden Arbeitsschritten wurden die Zellen immer auf Eis gehalten und ausschließlich vorgekühlte

Gefäße und Lösungen verwendet. Die Zellen wurden 10 min zentrifugiert (5.000 g; 4°C), das Pellet vorsichtig in 1 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und auf 25 ml aufgefüllt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, in 1 ml 0,1 M CaCl₂/25 % Glycerin resuspendiert und auf 5 ml aufgefüllt. Nach weiteren 2 h auf Eis wurden die Zellen aliquotiert und bei -80°C gelagert. Bei Bedarf wurden die Zellen auf Eis aufgetaut.

2.2.3.3 Anzucht von *E.coli*-Zellen zur Expression von Maltose-Bindeprotein (MBP) und MBP-Fusionsproteinen

Es wurden 500 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) und 0,2 % Glucose mit je 500 µl einer ÜK versetzt, die ein pMal c2X-Plasmid (2.2.1) enthielt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5. Die Expression der MBP-Fusionsproteine wurde dann durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1 mM) induziert. Nach weiteren 3-6 h Inkubation wurden die Zellen für den Zellaufschluß pelletiert (5.000 g; 5 min; RT) und in 25 ml TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0/1 mM EDTA) resuspendiert. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -20°C. Die Reinigung der exprimierten Proteine wird unter 2.16.2.2 beschrieben.

2.3 Plasmid-DNA-Präparationen

DNA wurde grundsätzlich in TE bzw. TE_{RNase} aufgenommen:

TE: 1 mM EDTA; 10 mM Tris/HCl pH 7,5-8,0

TE_{RNase}: TE mit 5 µl/ml RNase-Cocktail (Ambion)

2.3.1 Mini-Präparation durch alkalische Lyse nach Birnboim & Doly (1979)

Für die Präparation wurden die Bakterienzellen aus 2 ml einer ÜK durch Zentrifugation (12.000 g; 1 min; RT) pelletiert und in 100 µl Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 120 µl Lösung II und vorsichtigem Mischen (Invertieren) lysieren die Zellen, wobei die chromosomale DNA an der Zellwand gebunden bleibt. Zur Präzipitation der Zelltrümmer und Proteine wurden 150 µl Lösung III zugegeben, durch Invertieren gemischt und 5 bis 30 min zentrifugiert (12.000 g; 4°C). Der Überstand wurde mit Phenol extrahiert (2.4.1). Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 500 µl Ethanol präzipitiert und zentrifugiert. Nach

Waschen mit 70 % Ethanol wurde erneut zentrifugiert und das Pellet in 20 µl TE aufgenommen.

War die DNA zur Sequenzierung (2.8) bestimmt, mußte sie zusätzlich mittels der LiCl-Plasmidpräparation gereinigt werden, da Verunreinigungen durch RNA die Sequenzreaktionen negativ beeinflussten. Dazu wurden die Bakterienzellen aus einer 5 ml ÜK durch zwei Zentrifugationsschritte (12.000 g; 1 min) in einem 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß pelletiert. Analog zur oben beschriebenen Präparation wurden die Zellen in 150 µl Lösung I resuspendiert, durch Zugabe von 180 µl Lösung II lysiert und Zelltrümmer und Proteine mittels 225 µl Lösung III präzipitiert. Nach Zentrifugation (17.000 g; 5 min; 4°C) wurde der Überstand mit 1,5 ml Ethanol präzipitiert und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 60 µl 30 mM Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert. Zur Präzipitation der RNA wurden 100 µl 4 M LiCl zugegeben, vorsichtig gemischt und zentrifugiert (17.000 g; 5 min; 4°C). Der Überstand wurde mit 500 µl eiskaltem Ethanol präzipitiert und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl TE_{RNase} aufgenommen und 10 bis 20 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 100 µl Endvolumen aufgefüllt und anschließend mit Phenol extrahiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 10 µl 3 M NaAc pH 4,8 und 300 µl eiskaltem Ethanol präzipitiert und zentrifugiert. Nach Waschen mit 70 % Ethanol wurde erneut zentrifugiert und das Pellet in 20 µl TE aufgenommen. Die Ausbeute betrug je nach Dichte der ÜK 1,5-4 µg Plasmid-DNA.

Lösung I:

50 mM Glucose

25 mM Tris/HCl pH 7,5

10 mM EDTA

Lösung II:

0,2 M NaOH

1 % SDS

Lösung III:

3 M KAc pH 4,8

2.3.2 Alkalische Maxi- und Mega-Präparationen

Größere DNA-Mengen wurden mittels der LiCl-Plasmidpräparation isoliert. Für eine Maxi-Präparation wurden die Bakterienzellen aus einer 250 ml ÜK pelletiert (5.000 g; 10 min; 4°C), in 20 ml Lösung I (2.3.1) resuspendiert und mit 24 ml Lösung II (2.3.1) lysiert. Proteine, chromosomale DNA und SDS wurden durch Zugabe von 30 ml Lösung III (2.3.1) gefällt und pelletiert (5.000 g; 10 min; RT). Nach Filtration wurde der Überstand mit dem gleichen Volumen an Isopropanol versetzt, zentrifugiert (5.000 g; 10 min; 4°C) und die Nukleinsäuren in 1,45 ml H₂O und 50 µl Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert. Durch Zugabe von

2,5 ml 4 M LiCl wurde die RNA gefällt und pelletiert (5.000 g; 5 min; 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 12 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (5.000 g; 15 min; 4°C) wurde das Pellet in 500 µl TE_{RNAse} resuspendiert und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend durch Phenol-Extraktion (2.4.1) und Ethanol-Präzipitation (2.4.2) gereinigt. Das Pellet wurde getrocknet und in 250 µl TE aufgenommen.

Mega-Präparationen wurden aus 500 ml Bakterienkulturen angefertigt. Die Volumina der oben angegebenen Lösungen sind entsprechend anzupassen. Die Ausbeute betrug je nach Dichte der ÜK 0,5-1 µg Plasmid-DNA/ml eingesetzter Bakterienkultur.

2.4 Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren

2.4.1 Phenol/Chloroformextraktion

Verunreinigungen von DNA-Lösungen mit Proteinen, Membranbestandteilen etc., die in organischen Lösungsmitteln löslich sind, wurden durch Phenol/Chloroformextraktion entfernt. Die DNA-Lösungen wurden mit dem gleichen Volumen einer 1:1-Mischung aus Phenol und Chloroform versetzt, die Phasen gut gemischt und zur Trennung zentrifugiert (15.000 g; 3 min; RT). Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert, um Phenolreste zu entfernen. Die DNA wurde anschließend mit Ethanol präzipitiert (2.4.2).

2.4.2 Ethanol-Präzipitation

Um DNA zu konzentrieren oder umzupuffern, kann sie durch Einstellung definierter Salz- und Alkoholkonzentrationen präzipitiert werden. Die DNA-Lösung wurde auf eine NaAc-Konzentration von 0,3 M (pH 4,8) eingestellt und mit dem 2,5-3fachen Volumen absoluten Ethanol versetzt, kurz gemischt und 5-30 min bei -20°C inkubiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation (18.000 g; 4°C) pelletiert. Die Dauer der Zentrifugation richtete sich nach der Größe und Konzentration der DNA. Je kleiner und je geringer konzentriert die DNA war, desto länger wurde zentrifugiert (30-120 min). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in TE aufgenommen.

2.4.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.4.3.1 Konzentrationsbestimmung mit Hilfe von Agarose-Gelen

Die Menge an DNA, die auf ein Agarose-Gel mit Ethidiumbromid (2.4.4) aufgetragen wurde, konnte durch Vergleich mit einem gleichzeitig aufgetragenen Größen- und Mengenstandard (2.4.5) anhand der Intensität der Banden abgeschätzt werden.

2.4.3.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur photometrischen Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurde die DNA in TE verdünnt und die Absorption bei 260 nm gegen TE gemessen. Eine OD von 1,0 bei 260 nm entspricht 50 µg DNA/ml oder 33 µg Oligonukleotiden/ml. Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenolresten konnten durch den Quotienten der Absorptionen bei 260 und 280 nm beurteilt werden. Er sollte nicht kleiner als 1,8 sein. Chromosomale DNA, RNA und Nukleotide sind bei dieser Methode nicht von Plasmid-DNA zu unterscheiden.

2.4.4 Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen

Mit der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren für analytische und präparative Zwecke der Größe nach getrennt werden. Für Trennungen im Bereich von 500-10.000 Bp wurden 0,75-1 % Agarose-Gele verwendet. Zur Auftrennung von kleinen DNA-Fragmenten wurden höher konzentrierte Agarose-Gele eingesetzt (1,5-2 %).

Die Agarose wurde in 1x TAE aufgekocht, bis sie vollständig gelöst war. Nach Abkühlung auf 60°C wurde die Gellösung mit 1 µg Ethidiumbromid/ml versetzt und in einen Gelträger mit einem Former für die Probentaschen gegossen. Nach dem Erkalten wurden die Proben, die zuvor mit 1/10 Volumen Farbmarker versetzt worden waren, aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 1x TAE als Laufpuffer bei 90-120 V bis zur ausreichenden Trennung der Nukleinsäuren durchgeführt. Diese konnten durch die Anfärbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht werden.

TAE (50x)

2 M Tris/Acetat pH 7,5

50 mM EDTA

Farbmarker (10x)

10x TAE

50 % Glycerin

0,25 % Xylencyanol

2.4.5 DNA-Größen- und Mengenstandard

λ -DNA mit EcoRI/Hind III geschnitten (MBI Fermentas; Vilnius, Litauen). Fragmentgrößen: 21.226, 5.184, 4.973, 4.268, 3.530, 2.027, 1.904, 1.584, 1.375, 947, 831, 564, 125 Bp. Die Konzentration betrug 67 ng/ μ l

2.4.6 Elution von DNA aus Agarose-Gelen**2.4.6.1 Elution von DNA aus Agarose-Gelen durch Adsorption an QIAEX (Qiagen)**

Die Reinigung wurde in Anlehnung an das Protokoll der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt. Das ausgeschnittene Gelstück wurde zerkleinert und in einem Eppendorfreaktionsgefäß mit 300 μ l QX1-Puffer/100 mg Gel versetzt. Nach Zugabe von 10 μ l QIAEX-Suspension wurde 10 min bei 50°C inkubiert. Dabei wurde die Matrix durch mehrmaliges Invertieren in Suspension gehalten, so daß die DNA daran adsorbieren konnte. Durch Zentrifugation (≥ 10.000 g; 30 sek) wurde die QIAEX-Matrix mit der daran gebundenen DNA pelletiert und je zweimal mit 500 μ l QX2-Puffer und 500 μ l QX3-Puffer gewaschen. Nach 5-10 min Trocknung bei 37°C wurde zur Elution der DNA mindestens 5 min mit 20 μ l 0,1 $\times$ TE bei RT inkubiert. Die Reinigungsausbeute betrug zwischen 50 % und 70 %.

QX1-Puffer:

3 M NaI

4 M NaClO₄

10 mM Tris/HCl pH 7,0

10 mM Na₂S₂O₃QX2-Puffer:8 M NaClO₄

10 mM Tris/HCl pH 7,0

QX3-Puffer:

70 % Ethanol

100 mM NaCl

10 mM Tris/HCl pH 7,5

2.4.6.2 Elution von DNA aus Agarose-Gelen nach der Zentrifugationsmethode

Bei der Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen mit der Zentrifugationsmethode (Heery et al., 1990) wurde der Deckel eines Eppendorfreaktionsgefäßes entfernt, der Boden mit einer Kanüle durchstoßen und mit silanisierter Glaswatte gefüllt. Das ausgeschnittene Agarosestück wurde auf die Glaswatte gelegt. Das Reaktionsgefäß wurde in ein zweites Gefäß gesetzt und in einer Eppendor fzentrifuge zentrifugiert (7.000 g; 10 min; RT). Das Eluat enthielt das DNA-Fragment. Die Reinigungsausbeute betrug zwischen 30 % und 50 %.

2.5 Manipulation von Nukleinsäuren

2.5.1 Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zum Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden die Ansätze in 1x Inkubationspuffer (vom Hersteller mitgeliefert) bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur (meist 37°C) inkubiert. Inkubationen mit mehreren Enzymen wurden bei übereinstimmenden Pufferbedingungen gleichzeitig durchgeführt. Wenn dies nicht möglich war, wurde zwischen den Inkubationen durch Zugabe der entsprechenden Salze die neuen Pufferbedingungen eingestellt, nach Ethanol-Präzipitation (2.4.2) umgepuffert oder das benötigte Restriktionsfragment aus einem präparativen Agarose-Gel eluiert (2.4.4, 2.4.6). Zum Schneiden wurden 3-5 U Enzym/ μ g Plasmid-DNA eingesetzt. Das Volumen eingesetzter Nukleasen sollte dabei 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschreiten, da das Glycerin im Aufbewahrungspuffer der Enzyme inhibitorische Wirkung hat. Restriktionsansätze mit Plasmid-DNA, die durch alkalische Mini-Präparation isoliert worden war, wurden zusätzlich mit RNase-Cocktail (Ambion) versetzt.

Restriktionsanalysen wurden in einem Volumen von 10 μ l durchgeführt und, wenn nicht anders vermerkt, nach 2 h Inkubation vollständig auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Das Volumen für präparative Ansätze betrug 20-100 μ l. Nach mindestens 60 min Inkubationszeit wurde kontrolliert, ob die DNA vollständig geschnitten worden war, gegebenenfalls erneut Enzym zugegeben und wenn nötig ü.N. inkubiert. Bei vollständiger Restriktion wurde der Ansatz auf ein präparatives Agarose-Gel aufgetragen.

2.5.2 Modifizierung von DNA-Fragmenten

2.5.2.1 Glätten überhängender Einzelstrang-Enden

Überhängende 5'-Enden wurden mit dem Klenow-Fragment der *E.coli* DNA-Polymerase I aufgefüllt (5'→3'-Polymeraseaktivität). Durch die 3'→5'-Exonukleaseaktivität des Enzyms wurden überhängende 3'-Enden abgeschnitten. Der Reaktionsansatz (2 U Klenow-Enzym/μg DNA, in einem beliebigen Restriktionspuffer, 100 μmol dNTP) wurde 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend 5 bis 10 min bei 68°C inaktiviert.

2.5.2.2 Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten

Da PCR-Fragmente (2.7) keine endständigen 5'-Phosphat-Gruppen besitzen, wurden sie vor der Ligation (2.5.3.1) in Vektoren phosphoryliert. Die DNA wurde mit 5-10 U T4-Polynukleotidkinase (Roche) in dem mitgelieferten Puffer und 1 mM ATP 1 h bei 37°C inkubiert. Nach 10minütiger Hitze-Inaktivierung der Kinase bei 65°C wurden die Fragmente für die Ligation eingesetzt. Im Falle einer zuvor durchgeführten Klenow-Reaktion mußten die Desoxynukleotide entweder durch Ethanol-Präzipitation (2.4.2) oder durch Agarose-Gelelektrophorese (2.4.4) entfernt werden.

2.5.2.3 Dephosphorylierung geschnittener DNA-Vektoren

Die glatten oder kompatiblen Enden geschnittener Vektor-DNA wurden mit alkalischer Phosphatase (Roche) dephosphoryliert, um eine Religation der Enden zu vermeiden. Dazu wurden 5 μg geschnittene Vektor-DNA, 10 μl 10× Phosphatasepuffer und 2 U alkalischer Phosphatase mit H₂O auf 100 μl aufgefüllt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μl EGTA (0,5 M) und 10 min Inkubation bei 68°C beendet. Die DNA wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert (2.4.1) und anschließend mit Ethanol präzipitiert (2.4.2) oder aus einem Agarose-Gel (2.4.6) eluiert.

10× Phosphatasepuffer:

500 mM Tris/HCl pH 8,5

1 mM EDTA

2.5.3 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.5.3.1 Ligation

Zur Ligation wurden ca. 50 ng geschnittener und dephosphorylierter Vektor und ein 3-5facher molarer Überschuß an Fragment in 1x Ligasepuffer gemischt. Wiesen die Fragmente komplementäre überhängende Einzelstrang-Enden auf, wurde mit 0,5 µl 1 U T4-DNA-Ligase (Roche) 30 min bei 22°C bzw. ü.N. bei 16°C ligiert. Wiesen die Fragmente glatte Enden auf, wurde mit 0,5 µl 6,2 U T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia Biotech) ü.N. bei 16°C ligiert. Das Reaktionsvolumen betrug 10-20 µl.

Ligase-Puffer (10x):

600 mM Tris/HCl pH 7,5

50 mM MgCl₂

10 mM DTE

10 mM ATP

2.5.3.2 Transformation

5-10 µl des Ligationsansatzes (2.5.3.1) wurden mit 5 µl 10x CM-Puffer versetzt, mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt und auf Eis gekühlt. Dazu wurden 150 µl kompetente Zellen (2.2.3.2) gegeben, vorsichtig gemischt und mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Nach 1 min bei 42°C ("Hitsepuls") und 10-15 min auf Eis wurden 800 µl LB-Medium zugegeben und 20 min bei 37°C inkubiert. Nach dieser Regenerationszeit, die der Ausprägung der Antibiotika-Resistenz dient, wurden die Zellen auf LB-Agar (100 µg Ampicillin/ml) ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert.

Die sogenannte "Retransformation" eignete sich, um Plasmid-DNA erneut von Bakterien amplifizieren zu lassen. Dazu wurden 0,5-1 µl Plasmid-DNA mit 30-50 µl der kompetenten Zellen versetzt und 5-10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von LB-Medium und 20 min Regeneration wurde der Ansatz auf LB-Agar mit Antibiotikum plattiert oder als Vorkultur zum Animpfen von 500 ml-Kulturen verwandt.

10x CM:100 mM CaCl₂400 mM MgCl₂**2.6 Nachweis spezifischer Nukleinsäuren****2.6.1 Radioaktive Markierung spezifischer Sonden**

Nukleinsäuren wurden durch spezifische DNA-Sonden nachgewiesen, die mit der *random priming*-Methode (Feinberg & Vogelstein, 1983) radioaktiv markiert worden waren. Die Markierung wurde mit dem "Megaprime DNA Labelling Kit" (Amersham Pharmacia Biotech) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Radionuklid diente [α -³²P]-dCTP (spezifische Aktivität > 6.000 Ci/mM, Amersham Pharmacia Biotech). Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Gelfiltration (Sephadex G75; Amersham Pharmacia Biotech) abgetrennt. Die Markierungseffizienz wurde in einem Szintillationszähler (Tricarb 2000 CA, Packart) bestimmt. DNA-Fragmente, die kürzer als 200 Bp waren, wurden mit genspezifischen Primern markiert.

2.6.2 Untersuchung der Genexpression in menschlichen Geweben

Zur Identifizierung von Geweben, in denen die menschlichen hyperpolarisationsaktivierten und zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanäle vom Typ 1 und 4 (hHCN1 bzw. hHCN4) exprimiert werden, wurden vier verschiedene Multi-Gewebe-Northernblots ("Multiple Tissue Northern Blot"; MTN™) der Firma Clontech (Palo Alto, USA) verwendet. Zur Herstellung dieser MTN™ Blots waren je 2 µg Poly(A)⁺-RNA aus verschiedenen menschlichen Geweben durch Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert und immobilisiert worden ("Northernblot"). Je 2 µg Poly(A)⁺-RNA aus folgenden Geweben waren auf die MTN™ Blots aufgetragen:

Human Multiple Tissue Northern Blot:

Herz, Gehirn, Gebärmutter, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere, Bauchspeicheldrüse

Kat.Nr. 7760-1

Lot.Nr. 8070099

Human Multiple Tissue Northern Blot II:

Milz, Thymus, Prostata, Hoden, Eierstöcke, Dünndarm, Dickdarm, Periphere Leukozyten

Kat.Nr. 7759-1

Lot.Nr. 8060043

Human Brain Multiple Tissue Northern Blot II:

Cerebellum, Cerebraler Cortex, Medulla Oblongata, Rückenmark, Hinterhauptslappen, Stirnlappen, Schläfenlappen, Putamen

Kat.Nr. 7755-1

Lot.Nr. 8040231

Human Brain Multiple Tissue Northern Blot III:

Amygdala, Nucleus Caudatus, Corpus Callosum, Hippocampus, gesamtes Gehirn, Substantia Nigra, Thalamus

Kat.Nr. 7750-1

Lot.Nr. 8040615

Der Nachweis spezifischer Nukleinsäuren erfolgte mit Hilfe von radioaktiv markierten DNA-Sonden (30-50 ng ^{32}P -markierte DNA; 1×10^6 cpm/ml; 2.6.1). Die Hybridisierung der Sonde mit der immobilisierten Poly(A)⁺-RNA erfolgte wie unter 2.6.3 beschrieben.

2.6.3 Hybridisierung von immobilisierter Poly(A)⁺-RNA mit DNA-Sonden und Autoradiographie

Zur Vorhybridisierung wurden die Multi-Gewebe-Northernblots (MTNTM; 2.6.2) 2-4 h bei 65°C in ExpressHybTM-Lösung (Clontech, Palo Alto, USA) inkubiert. Anschließend wurden sie 12-14 h mit 30-60 ng ^{32}P -markierter DNA ($1,5-2 \times 10^6$ cpm/ml) bei 68°C hybridisiert.

Unspezifisch gebundene DNA wurde in folgenden Waschschritten entfernt:

4 x 10 min bei RT in je 200 ml Waschlösung I

2 x 20 min bei 50°C in je 200 ml Waschlösung II

Spezifische Hybride, die aus Nukleinsäuren und radioaktiv markierten DNA-Sonden bestanden, wurden 7 bis 14 Tage bei -80°C unter Verwendung von Verstärkerfolie (Cronex Hi plus; Du Pont) autoradiographisch nachgewiesen (ECL Hyperfilm; Amersham Pharmacia Biotech).

Zur mehrmaligen Verwendung konnte die radioaktive Markierung durch 10 bis 20minütiges Kochen in 0,5 % SDS entfernt werden.

"ExpressHyb™-Lösung":

Kat.Nr. 8015-1

Der Lösung wurden 0,1 mg/ml denaturierter Heringssperma-DNA zugefügt.

Waschlösung I:

2x SSC (0,01 % DEPC)

0,05 % SDS

Waschlösung II:

0,1x SSC (0,01 % DEPC)

0,1 % SDS

Zur Herstellung der beiden Waschlösungen wurde eine 20x SSC-Stocklösung verwendet (3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat, pH 7,0). Sowohl die 20x SSC-Stocklösung, als auch das zur Verdünnung benutzte H₂O waren mit 0,01 % DEPC behandelt worden, um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden. Die verwendeten Glasgefäße wurden 16 h bei 230°C gebacken.

2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) können DNA-Fragmente spezifischer Länge und Sequenz amplifiziert werden. In mehreren Zyklen wird die Matrizen-DNA hitzedenaturiert, mit geeigneten Oligonukleotiden ("Primern") hybridisiert und diese mit Hilfe einer hitzestabilen Polymerase verlängert (Mullis et al., 1986). Das PCR-Fragment kann über Schnittstellen oder nach Klenow-Reaktion (2.5.2.1) und Phosphorylierung (2.5.2.2) in einen Vektor kloniert werden (2.5.3.1).

2.7.1 Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide wurden mit dem "DNA-Synthesizer 391" (Applied Biosystems) hergestellt. Die Abspaltung der Primer von der Säulenmatrix erfolgte in 32 %iger Ammoniaklösung (15 h; 55°C). Nach der Lyophilisierung wurden die Primer in H₂O resuspendiert und mit 1/10 Volumen 3 M NaAc pH 4,8 sowie dem dreifachen Volumen Ethanol gefällt. Die Sequenzen der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Oligonukleotide sind im Anhang (Abschnitt 8.8) aufgeführt.

2.7.2 Bedingungen für die PCR-Reaktionen

Die Reaktionen wurden in einem "DNA Thermal Cycler" (Perkin Elmer) oder in einem "TRIO-Thermoblock" (Biometra) durchgeführt. Vor dem ersten Zyklus wurde die DNA 2 min bei 94°C denaturiert. Während der Zyklen wurde je 45 sek denaturiert und hybridisiert. Die Hybridisierungstemperatur entsprach der niedrigeren Schmelztemperatur (T_m) der beiden Primer. Sie wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$T_m = (G/C) \times 4^\circ\text{C} + (A/T) \times 2^\circ\text{C} - (\text{Basenfehlpaarung}) \times 4^\circ\text{C} - 4^\circ\text{C}$$

Zur Strangverlängerung wurde bei 72°C inkubiert. Die Zeitspanne richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes und betrug dabei ca. 1 sek/10 B. Es wurden 25-40 Zyklen durchgeführt. Es wurden folgende Polymerasen mit dem Puffer des jeweiligen Herstellers verwendet: Taq-Polymerase (Roche) und Primezyme (Biometra; Göttingen).

Ein 100 µl PCR-Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

- 1-10 ng Plasmid-DNA
- je 300 ng spezifischer Primer
- 10 µl 10x PCR-Puffer für die jeweilige Polymerase
- 1 µl 20 mM dNTP
- 1-2,5 U hitzestabile Polymerase

2.7.3 Reinigung der PCR-Produkte

PCR-Produkte wurden durch Phenol/Chloroformextraktion (2.4.1) und Ethanol-Präzipitation (2.4.2) gereinigt. Waren Nebenprodukte vorhanden oder sollten die PCR-Produkte in Plasmidvektoren subkloniert werden, wurde die DNA auf ein Gel aufgetragen (2.4.4) und die Fragmente der gewünschten Größe eluiert (2.4.6).

2.8 DNA-Sequenzierung mit LI-COR DNA-Sequenzierer

Die Sequenzierung erfolgte im "LI-COR DNA Sequencer Long ReadIR 4200" (MWG-Biotech, Ebersberg) und beruht auf der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Die DNA-Markierung erfolgte durch eine PCR (2.7) mit IRD800-Fluorophormarkierten Primern. Zur Sequenzauswertung wurde die Software des Geräteherstellers, sowie die Programme PCGene und PCSupp (Dr. W. Bönigk, IBI-1/Forschungszentrum Jülich) eingesetzt.

2.8.1 Sequenzierreaktion

Es wurde das "Thermo Sequenase Kit" von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) verwendet. Dabei wurde das Protokoll des Herstellers befolgt. Pro kB der zu sequenzierenden DNA wurden ca. 65 ng DNA eingesetzt. Vom IRD800-Fluorophormarkierten Primer (2 pmol/ μ l) wurden 0,6 μ l hinzugegeben. Zur Relaxation der Matrizen-DNA wurde der Ansatz mit 0,7 μ l 50 % DMSO versetzt und anschließend mit H₂O auf ein Endvolumen von 7 μ l aufgefüllt. Der Ansatz wurde zu je 1,5 μ l auf vier PCR-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Je 0,75 μ l der vier Terminationsmische wurden mit dem gleichen Volumen H₂O verdünnt und jeweils zu einem der vier 1,5 μ l-Aliquots gegeben. Die Ansätze wurden mit 15-20 μ l Chill-out 14 Liquid Wax (MJ Research) überschichtet und zur Sequenz-PCR (2.8.2) eingesetzt.

2.8.2 PCR zur Sequenzierung

Die Reaktionen wurden in einem "TRIO-Thermoblock" (Biometra) durchgeführt. Vor dem ersten Zyklus wurde die DNA 2 min bei 94°C denaturiert. Während der Zyklen wurde 40 sek denaturiert. Die Hybridisierung der Primer erfolgte bei 50°C für 40 sek. Zur Strangverlängerung wurde bei 70°C für 1 min inkubiert. Es wurden 30 Zyklen durchgeführt.

Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 3 μ l Stoppuffer abgebrochen. Es wurde der Stoppuffer des Sequenzierkits (2.8.1) benutzt, dem Xylencyanol in einer Endkonzentration von 0,2 % zugesetzt worden war. Zur Denaturierung wurden die Ansätze 2 min auf 70°C erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. 1-1,8 μ l der Proben wurden auf ein Sequenziergel (2.8.3) aufgetragen.

2.8.3 Acrylamid-Gelelektrophorese zur Sequenzierung

Zwei 66 cm lange Glasplatten wurden gründlich mit H₂O und Ethanol gereinigt. Sie wurden durch 0,25 mm starke Abstandshalter getrennt und mit Schraubschienen zusammengedrückt. 41,6 ml einer 4,6 % Gellösung wurden im Vakuum oder durch Sonifizierung entgast und mit 350 µl 10 % APS und 50 µl TEMED versetzt. Die Gellösung wurde in eine 60 ml-Spritze gefüllt und beim luftblasenfreien Gießen durch einen Sterilfilter gedrückt. Ein "Vorformer"-Kamm wurde in das Gel gedrückt, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach 1 h war die Polymerisation des Acrylamids abgeschlossen. Nachdem das Gel in die Kammer eingespannt war, wurde diese mit 1x TBE gefüllt. Die Probestaschen wurden von einem "Haifischzahn"-Kamm gebildet, der leicht auf der Geloberfläche aufsaß.

Die Elektrophorese wurde mit 1x TBE als Laufpuffer bei 45 W und 45°C durchgeführt. Nach einem 45minütigen Vorlauf wurden die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese dauerte 8-10 h. Die Leseweiten betrugen zwischen 600 und 1000 Bp.

10x TBE:

1,34 M Tris Base
450 mM Borsäure
25 mM EDTA
pH 8,3-8,7 (bei 50°C)

4,6 % Gellösung:

21 g Harnstoff
5 ml 10x TBE
0,5 ml DMSO
5,6 ml Rapid Gel XL (USB; Bad Homburg)
30,5 ml H₂O

2.9 Heterologe Genexpression in HEK 293-Zellen

Für die heterologe Expression wurden folgende Zelllinien verwendet:

HEK 293:

Diese menschliche, embryonale Nierenzelllinie 293 (*human embryonic kidney-cells*; HEK 293-Zellen) ist mit einem Adenovirus transfiziert worden. In dieser Arbeit wurden HEK 293-Zellen mit Derivaten des Plasmidvektors pcDNA I Amp transient transfiziert.

HEK 293-FlpIn:

(Invitrogen) Diese HEK 293-Zellen haben eine Flp-Rekombinationserkennungssequenz und ein Zeocin-Resistenzgen stabil in ihr Genom integriert. Die Transfektion dieser Zellen mit Derivaten des Plasmidvektors pcDNA 5-FRT (Invitrogen) gemeinsam mit einer Rekombinase soll die einfache Herstellung von stabilen Zelllinien erlauben. In dieser Arbeit wurden HEK 293-FlpIn-Zellen nur als Kontrolle verwendet.

HEK 293-Flp-hHCN4:

Diese Zelllinie wurde aus der Zelllinie HEK 293-FlpIn durch Transfektion mit dem Plasmid pc5-hHCN4 hergestellt. Das Plasmid pc5-hHCN4 enthält die vollständige cDNA-Sequenz des humanen HCN4-Kanals und wurde mir freundlicher Weise von Frau Dr. R. Gauss (IBI-1, Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt.

2.9.1 Kulturbedingungen für HEK 293-Zellen

HEK 293-Zellen wurden in dem Nährmedium M10 (*minimal essential medium* (MEM), fötales Kälberserum (10 %), L-Glutamin (2 mM), Antibiotika/Antimykotika (1 %), nicht essentielle Aminosäuren (1 %); GIBCO BRL) bei 37°C, 5 % CO₂ und ~95 % Luftfeuchtigkeit auf Petrischalen (Ø 9 cm) kultiviert. Das M10-Medium wurde dreimal wöchentlich gewechselt. Die Generationszeit der HEK 293-Zellen betrug etwa einen Tag. Bei einer Dichte von $\sim 1 \times 10^7$ Zellen/Ø 9 cm Schale (entsprechend 90 % Konfluenz) wurden die Zellen abgelöst und auf neue Schalen verteilt. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 3-5 ml PBS (2.14.2) gewaschen und dann mit 1 ml Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %; GIBCO BRL) bei 37°C abgelöst. Die Zellen wurden in 8-10 ml M10 resuspendiert. In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zelldichte der Suspension bestimmt. Ein Teil der Zellen wurde für die Zellerhaltung zu 6 bis 12×10^5 Zellen auf Ø 9 cm Schalen mit frischem M10-Medium ausgesät. Die verbleibenden Zellen wurden für die Transfektion zu 2×10^5 Zellen auf Ø 5 cm Schalen oder zu 9×10^5 Zellen auf Ø 9 cm Schalen ausplattiert. Nach ca. 40 Splitting-Runden wurden die HEK 293-Zellen verworfen und ein neues Aliquot tiefgefrorener Zellen für die Aussaat vorbereitet.

Für die Langzeitlagerung wurden HEK 293-Zellen geerntet, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase (60-70 % Konfluenz) befanden, und zu $\sim 2 \times 10^6$ Zellen/ml M10 (10 % DMSO) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Aussäen der Zellen wurde folgendermaßen durchgeführt: Sie wurden schnell bei 37°C aufgetaut und vorsichtig zu 10 ml M10 (vorgewärmt) pipettiert. Die Zellen wurden dann pelletiert (200 g; 5 min; RT), in 3-5 ml M10 resuspendiert und zu $\sim 5 \times 10^5$ Zellen auf Ø 9 cm Schalen ausgesät.

2.9.2 Transiente Expression von Proteinen in HEK 293-Zellen

Zunächst wurde die cDNA in den Plasmidvektor pcDNA I Amp (2.2.1) kloniert, der die transiente Expression heterologer Proteine in HEK 293-Zellen erlaubt. Die Transfektion wurde nach der CaPO_4 -Methode (Chen & Okayama, 1987) durchgeführt. Als Kontrolle wurde pcDNA I Amp ohne cDNA-Insertion oder vollkommen ohne Plasmid-DNA transfiziert ("Mock-Transfektion"). Für immunzytochemische Untersuchungen wurden 4×10^5 Zellen (Ø 5 cm Schalen) und für Zellpräparationen $1,8 \times 10^6$ Zellen (Ø 9 cm Schalen) transfiziert. Die Transfektionsansätze hatten folgende Zusammensetzung:

	Ø 5 cm Schale	Ø 9 cm Schale
DNA	5-10 µg in 124 µl H ₂ O	15-30 µg in 372 µl H ₂ O
CaCl ₂ (1M)	41 µl	123 µl
2 x BBS (pH 6,95) ⁽¹⁾	165 µl	495 µl

⁽¹⁾ 2 x BBS (pH 6,95)

50 mM N,N'-bis-(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure (BES); 280 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄

Die Transfektionsansätze wurden 20 min (RT) inkubiert und anschließend auf Schalen mit logarithmisch wachsenden Zellen pipettiert. Die DNA wurde durch eine 20-22 h Inkubation bei 35°C, 3 % CO₂ und ~ 95 % Luftfeuchtigkeit präzipitiert. Zellen, die für Zellpräparationen vorgesehen waren, wurden mit PBS (2.14.2) gewaschen und anschließend mit 8 ml M10-Medium 20-22 h bei 37°C, 5 % CO₂ und ~ 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Für immunzytochemische Untersuchungen wurden die transfizierten Zellen mit 3 ml PBS und mit 2 ml PBS/EDTA (0,5 %, pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurden 300 µl Trypsin/EDTA (GIBCO BRL) zupipettiert und die Zellen bis zu ihrer Ablösung bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden in 4,7 ml M10-Medium resuspendiert und auf Poly-L-Lysin (Sigma) beschichtete Glas-Plättchen in Multiwell-Platten pipettiert (300 µl je Plättchen). Die Plättchen

waren zuvor in den Multiwell-Platten mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml, >1 h) inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und dann mit 100 µl M10-Medium überschichtet worden. Die Zellen wurden 20-22 h bei 37°C, 5 % CO₂ und ~ 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zur Steigerung der Expressionseffizienz wurden die Zellen teilweise nach dem Umsetzen in M10-Medium mit 5 mM Butyrat inkubiert.

2.10 Präparation von Membranproteinen

2.10.1 Präparation von heterolog exprimierten Membranproteinen aus HEK 293-Zellen

Polypeptide, die in Westernblots analysiert werden sollten, wurden aus den Zellen präpariert, in denen sie durch die Transfektion (2.9) mit der entsprechenden DNA exprimiert worden waren. Die Zellen von sechs Ø 9 cm Schalen wurden am 2. Tag nach der Transfektion mit einem Gummispatel von den Schalen abgeschabt. Die Zellen wurden pelletiert (200 g; 10 min; 4°C), mit 30 ml PBS (2.14.2)/0,5 % EDTA gewaschen und erneut pelletiert. Das Pellet wurde in insgesamt 3 ml Puffer A resuspendiert. Die Suspension wurde zum Zellaufschluss fünfmal in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Zellreste und Zellkerne wurden durch Zentrifugation entfernt (200 g; 10 min; 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und aufbewahrt. Das Pellet wurde erneut in 3 ml Puffer A resuspendiert und zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde mit dem Überstand aus der vorhergehenden Zentrifugation vereinigt. Die vereinigten Überstände wurden in einer Beckman-Ultrazentrifuge zentrifugiert (TLA45-Rotor; 45.000 rpm; 15 min; 4°C). Das Pellet (Membranfraktion) wurde zum hypertonischen Waschen in 3 ml Puffer B resuspendiert, ultrazentrifugiert und in 450 µl Puffer C aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Konzentration an Protein wurde durch die Amidoschwarz-Methode (2.11.2) bestimmt. Die Ausbeuten betrugen 100-150 µg Protein pro Ø 9 cm Schale.

Puffer A (hypotonisch):

20 mM NaCl

1 mM EDTA

0,1 mM EGTA

1 mM DTT

20 mM HEPES/NaOH pH 7,4

1:500-verd. mPIC (*mammalian protease inhibitor cocktail*, Sigma)Puffer B (hypertonisch):

wie Puffer A, jedoch 500 mM NaCl

Puffer C (isotonisch):

wie Puffer A, jedoch 150 mM NaCl

2.10.2 Präparation von Membranproteinen aus nativen Geweben

Membranproteine aus nativen Geweben wurden wie unter 2.10.1 präpariert. Die Menge der eingesetzten Puffer richtete sich nach Volumen und Gewicht des homogenisierten Gewebes (ca. 3 ml Puffer A und B bzw. 1 ml Puffer C pro g Gewebe). Die Proteinkonzentration wurde nach der Amidoschwarz-Methode bestimmt (2.11.2). Die Ausbeuten betrugen zwischen 5 und 20 mg Protein pro g Gewebe.

2.11 Quantifizierung von Proteinen**2.11.1 Konzentrationsbestimmung nach Bradford (1976)**

Es wurde das "Protein Assay"-Farbreagens von BioRad (München) verwendet. Die zu vermessende Proteinprobe wurde mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Farbreagens vermischt. Danach wurde die OD₅₉₅ bestimmt. Eine Eichkurve wurde mit BSA (NEB; Schwalbach) erstellt. Im linearen Bereich der Eichkurve (1-10 µg Protein) entspricht eine OD₅₉₅ von 0,06 ca. 1 µg Protein.

2.11.2 Konzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz

Die Konzentration von Proteinlösungen, die Detergenzien oder Lipide enthalten, kann nicht durch die Methode nach Bradford (2.11.1) bestimmt werden. Die Protein-Konzentration solcher Proben wurde mit der Amidoschwarz-Methode bestimmt. Dabei wurde der Amidoschwarz 10B-Farbstoff von Merck (Darmstadt) verwendet. Die zu vermessende Probe wurde mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt und mit 10 µl 10 % SDS vermischt, um Proteine zu solubilisieren. Danach wurden 15 µl 1 % SDS/1 M Tris/HCl pH 7,5 hinzugegeben. Nach dem Mischen wurden 30 µl 104 % (w/v) TCA zur Fällung der Proteine hinzugegeben und der Ansatz nochmals gemischt. Die Proben wurden 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf einen Membranfilter (Porendurchmesser: 45 µm; Millipore, Eschborn) aufgetragen. Die Filter wurden mit 3 ml 6 % TCA gewaschen und für 5 min mit Färbelösung gefärbt. Danach wurden die Filter kurz mit H₂O gespült und mehrmals in Entfärbelösung gelegt bis der Hintergrund auf dem Filter wieder weiß war. Aus den getrockneten Filtern wurden die gefärbten Filterbereiche ausgeschnitten. Danach wurden die Filterstücke in je 1 ml Elutionslösung für 20 min bei RT geschüttelt. Es wurde die OD₆₃₀ bestimmt. Eine Eichkurve wurde mit BSA (NEB) erstellt. Im linearen Bereich der Eichkurve (1-15 µg Proteine) entspricht eine OD₆₃₀ von 0,03 ca. 1 µg Protein.

Färbelösung:

0,5 % Amidoschwarz B10

45 % Methanol

10 % Essigsäure

Entfärbelösung:

90 % Methanol

2 % Essigsäure

Elutionslösung:

50 % Ethanol

25 mM NaOH

50 µM EDTA

2.12 Modifikation von Membranproteinen

2.12.1 Solubilisierung von Membranproteinen

Membranproteine aus transient transfizierten HEK 293-Zellen (2.10.1) oder nativem Gewebe (2.10.2), die für Immunpräzipitationen (2.18) verwendet werden sollten, mußten zunächst solubilisiert werden. Dazu wurden die Membranproteine in Puffer C (2.10.1) mit dem gleichen Volumen einer 2 %igen Triton X-100-Lösung (ebenfalls in Puffer C) gemischt und für 1 h bei 4°C im Schüttler inkubiert. Durch Zentrifugation (17.600 g; 15 min; 4°C) wurden

die solubilisierten Proteine (Überstand) von den nicht-solubilisierten Proteinen (Pellet) getrennt. Das Pellet mit den nicht-solubilisierten Proteinen wurde anschließend in 1 % Triton X-100 in Puffer C resuspendiert. Das Volumen an Triton X-100 entsprach einem Drittel des ursprünglichen Volumens (Membranproteine plus Detergenz). Der Ansatz wurde wie oben beschrieben inkubiert und zentrifugiert. Der Überstand mit den solubilisierten Proteinen wurde mit dem Überstand der ersten Zentrifugation vereinigt. Die Effizienz der Solubilisierung wurde durch Gelelektrophorese (2.13) und Westernblot-Analysen (2.14) getestet.

2.12.2 Deglykosylierung von Membranproteinen

Die Deglykosylierung von Membranproteinen (2.10) erfolgte in zwei Schritten: Zunächst wurden die Proteine in 0,5 % SDS/1 % β -Mercaptoethanol für 10 min bei 37°C denaturiert. Danach erfolgte die eigentliche Deglykosylierung in 50 mM PBS/1 % Nonidet P-40. Der Ansatz wurde 4 h bei 37°C mit 500 U der Peptid/N-Glykosidase F (PNGase F; NEB) inkubiert. Als Negativkontrolle wurde der gleiche Reaktionsansatz ohne Enzym inkubiert.

2.13 Trennung von Proteinen durch Gelelektrophorese

Proteine wurden durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in Modifikation nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Die SDS-PAGE wurde in einer "Minigel Twin"-Kammer (Biometra; Gelmaße: 0,1 x 8 x 10 cm) oder in einer "Sturdier SE 400"-Kammer (Hoefer; Gelmaße: 0,15 x 14 x 15 cm) durchgeführt. Es wurden 7,5-15 %ige Trenngele und 5 %ige Sammelgele verwendet. Die Proben wurden mit 1x SDS-Probenpuffer versetzt. Die elektrophoretische Trennung im Biometra-System erfolgte bei 15 mA im Sammelgel und 20 mA im Trenngel und dauerte ca. 90 min. Im Hoefer-System wurde die Elektrophorese ü.N mit 60 V durchgeführt.

4x SDS-Probenpuffer:

8 % SDS

200 mM Tris/HCl pH 6,8

50 % Glycerin

4 % β -Mercaptoethanol

0,04 % Bromphenolblau

10x SDS-Laufpuffer:

250 mM Tris

1 % SDS

1,92 M Glycin

2.13.1 Verwendete Protein-Größenstandards

Als Größenstandards bei der SDS-PAGE dienten die Proteine des "Low Molecular Weight Calibration Kit" (LMW-Größenstandard) und des "High Molecular Weight Calibration Kit" (HMW-Größenstandard) von Amersham Pharmacia Biotech.

LMW-Größenstandard		HMW-Größenstandard	
Molekulargewicht (kDa)	Protein	Molekulargewicht (kDa)	Protein
94	Phosphorylase b	212	Myosin
67	Albumin	170	α_2 -Makroglobulin
43	Ovalbumin	116	β -Galactosidase
30	Carboanhydrase	76	Transferrin
20,1	Trypsin-Inhibitor	53	Glutamat-Dehydrogenase
14,4	α -Lactalbumin		

2.13.2 Färben von SDS-Polyacrylamid-Gelen mit der Coomassie-Blaufärbung

Das Färben von SDS-Polyacrylamid-Gelen wurde in Anlehnung an Meyer & Lamberts (1965) durchgeführt. Es wurde der Farbstoff Coomassie Blue R 250 von Serva (Heidelberg) verwendet. Die Gele wurden für 1-2 h oder ü.N. in Färbelösung gelegt. Anschließend wurden die Gele bis zum Erreichen des gewünschten Färbegrades in Entfärbelösung gelegt und auf Whatman-Papier getrocknet.

Färbelösung:

0,2 % SERVA Blue R

30 % Ethanol (vergällt)

10 % Essigsäure

Entfärbelösung:

30 % Ethanol (vergällt)

10 % Essigsäure

2.14 Nachweis spezifischer Proteine**2.14.1 Transfer und Immobilisierung von Proteinen ("Westernblot")**

Die Proteine wurden mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt (2.13) und in Anlehnung an Towbin et al. (1979) auf PVDF-Membranen ("Immobilon P"; Millipore; Eschborn) transferiert. Der Transfer ("Westernblot") wurde in einem "Milliblot-Graphit Elektroblot"-System (Millipore; Eschborn) im Halbtrockenverfahren nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Transferzeit betrug 30 min bei 250 mA/800 cm² Gelfläche. Ein erfolgreicher Transfer wurde durch reversible Färbung mit 0,2 % Ponceau S (Sigma) in 2 % Essigsäure überprüft. Gegebenenfalls wurde die Blotmembran in Streifen geschnitten.

2.14.2 Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen

Der immunologische Nachweis von immobilisierten Proteinen erfolgte in drei Schritten. Im ersten Schritt wurden die unspezifischen Bindestellen auf der Membran blockiert. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper (1. Antikörper) inkubiert. Der spezifische Antigen-Antikörperkomplex wurde dann mit einem sekundären Antikörper (2. Antikörper) nachgewiesen, der an Meerrettich-Peroxidase (HRPO) gekoppelt war. Die Inkubationsschritte wurden entweder 30-60 min bei RT oder bei 4°C ü.N. durchgeführt. Zwischen den Inkubationsschritten wurde die Membran gewaschen (je 10 min, RT). Alle Inkubations- und Waschschrte erfolgten unter Schütteln. Die Zusammensetzung der Inkubations- und Waschlösungen, sowie der Ablauf der Arbeitsschritte sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt. Die spezifischen Antigen-1. Antikörper-2. Antikörper-Komplexe wurden mit dem "ECL Westernblot Detection Kit" (Amersham Pharmacia Biotech) bzw. mit "SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate" (Pierce) nach Herstellerangaben detektiert.

Arbeitsschritt	Inkubationszeit (-temperatur)	Inkubationslösung
Blockierungsreaktion	30 min (RT) oder ü.N. (4°C)	Blockierungslösung ⁽¹⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	Waschlösung I ⁽²⁾
1. Antikörperinkubation	1-4 h (RT)	1. Antikörper-Inkubationslsg. ⁽³⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	Waschlösung I ⁽²⁾
2. Antikörperinkubation	30 min (RT)	2. Antikörper-Inkubationslsg. ⁽⁴⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	Waschlösung I ⁽²⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	Waschlösung II ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ PBS; 0,05 % Tween-20; 0,5 % Milchpulver

⁽³⁾ 1. Antikörper in PBS; 0,05 % Tween-20

⁽²⁾ PBS; 0,05 % Tween-20

⁽⁴⁾ 2. Antikörper in PBS; 0,05 % Tween-20; 0,1 % Milchpulver

PBS (pH 7,4-7,5):

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄

2.15 Immunzytochemie

2.15.1 Fixierung und immunzytochemische Färbungen von HEK 293-Zellen

Transient transfizierte HEK 293-Zellen, die mit Antikörpern gefärbt werden sollten, wurden nach der Transfektion auf Glasplättchen umgesetzt (2.9.2). Die Zellen wurden am 2. Tag nach der Transfektion mit PBS (2.14.2) gewaschen und 5-10 min mit 4 % Paraformaldehyd (PA) in 0,1 M Phosphatpuffer (PP) auf den Glasplättchen fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PP gewaschen, in PP/0,05 % NaN₃ aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Die Färbung von transfizierten und fixierten HEK 293-Zellen erfolgte in drei Schritten. Im ersten Schritt wurden die Zellen in einer Lösung aus normalem Ziegeserum (*normal goat serum*, NGS) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem primären Antikörper (1. Antikörper) inkubiert. Im dritten Schritt erfolgte der Nachweis des spezifischen Antigen-Antikörperkomplexes mit einem sekundären Antikörper (2. Antikörper), der an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Die Inkubationsschritte wurden 30-60 min bei RT durchgeführt. Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Zellen zweimal für je 10 min bei RT gewaschen. Die Zusammensetzung der Inkubations- und Waschlösungen, sowie der Ablauf der Arbeitsschritte sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt. Die spezifischen Antigen-1. Antikörper-2. Antikörper-Komplexe wurden über die kovalent gekoppelte Meerrettich-Peroxidase des 2. Antikörpers detektiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 0,05 % Diaminobenzidin (DAB)/0,01 % H₂O₂ in PP gestartet und nach 1-15 min durch

PP gestoppt. Die Zellen wurden mit Mowiol (Hoechst) überzogen und unter einem Phasenkontrast-Mikroskop analysiert.

Arbeitsschritt	Inkubationszeit (-temperatur)	Inkubationslösung
Vorinkubation	30 min (RT)	Vorinkubationslösung ⁽¹⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	PP
1. Antikörperinkubation	1 h (RT)	1. Antikörper-Inkubationslg. ⁽²⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	PP
2. Antikörperinkubation	30 min (RT)	2. Antikörper-Inkubationslg. ⁽³⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	PP

⁽¹⁾ PP; 0,5 % Triton X-100; 10 % NGS

⁽³⁾ 2. Antikörper in PP; 0,5 % Triton X-100; 5 % NGS

⁽²⁾ 1. Antikörper in PP; 0,5 % Triton X-100; 5 % NGS

0,1 M Phosphatpuffer (PP) pH 7,4:

19 mM Na₂HPO₄; 81 mM NaH₂PO₄

Für die Doppelfärbung von ko-transfizierten HEK 293-Zellen wurden alternativ Fluorophor-markierte sekundäre Antikörper (in PP mit 1 % BSA/0,5 % Triton X-100) eingesetzt. Die Fluoreszenz wurde bei entsprechenden Anregungswellenlängen unter einem Konfokalen Laser Mikroskop (Leica TCS) betrachtet.

2.15.2 Lichtmikroskopischer Nachweis von Proteinen in der Rattenretina

Adulte Ratten (Stamm: Sprague Dawley) wurden mit Isofluran tief narkotisiert und dekapitiert. Die Augen wurden entnommen und durch einen Einschnitt an der Ora serrata zu einem Drittel geöffnet. Die Retinae wurden für 10-15 min bei RT in 4 % PA/0,1 M PP (2.15.1) immersionsfixiert und anschließend mehrfach in PP gewaschen. Danach wurde das Gewebe durch Inkubationen in 10 % Saccharose/PP (30 min) und 30 % Saccharose/PP (ü.N.) kryoprotektiert. Die Retinae wurden in Einbettmedium ("OCT compound"; Miles Scientific) flach eingebettet und eingefroren. In einem Cryostaten (Reichert-Jung) wurden 20 µm dicke Vertikalschnitte (senkrecht zu den retinalen Schichten) angefertigt und auf gelatinisierten Objektträgern aufgenommen. Die Schnitte wurden bei -20°C gelagert.

Die Färbung von fixierten Retinaschnitten erfolgte ähnlich wie die Färbung von fixierten HEK 293-Zellen (2.15.1) in drei Schritten. Zunächst wurde das Gewebe mit einer Blockierungslösung vorinkubiert. Daran schloss sich eine Inkubation ü.N. mit dem 1. Antikörper an. Im dritten Schritt wurde der spezifische Antigen-Antikörperkomplex mit einem Fluorophor-gekoppelten 2. Antikörper detektiert. In einigen Fällen wurde diese Prozedur um einen vierten Schritt erweitert, um schwache Färbungen zu intensivieren. Dazu wurde ein tertiärer Antikörper verwendet, der gegen den 2. Antikörper gerichtet war und den gleichen Fluorophor trug. Die Zusammensetzung der Inkubations- und Waschlösungen, sowie der Ablauf der Arbeitsschritte sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt. Die gefärbten Schnitte wurden mit dem "Prolong Antifade Kit" (Molecular Probes) überzogen und unter einem Konfokalen Laser Mikroskop (Leica TCS) analysiert. Für Doppelfärbungen wurden die 1. Antikörper gemischt und gleichzeitig auf die Schnitte gegeben. Alle verwendeten 2. (oder 3.) Antikörper waren kreuzabsorbiert und wurden sorgfältig auf Kreuzreaktionen mit anderen verwendeten Immunglobulinen getestet.

Arbeitsschritt	Inkubationszeit (-temperatur)	Inkubationslösung
Vorinkubation	1 h (RT)	Blockierungslösung ⁽¹⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	PP
1. Antikörperinkubation	ü.N. (RT)	1. Antikörper-Inkubationslsg. ⁽²⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	PP
2. Antikörperinkubation	1 h (RT)	2. Antikörper-Inkubationslsg. ⁽³⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	PP ³⁾
3. Antikörperinkubation	1 h (RT)	3. Antikörper-Inkubationslsg. ⁽⁴⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	PP

⁽¹⁾ PP; 0,5 % Triton X-100; 5 % Chemiblocker (Chemicon)

⁽³⁾ 2. Antikörper in PP; 5 % Chemiblocker

⁽²⁾ 1. Antikörper in PP; 0,5 % Triton X-100; 5 % Chemiblocker; 0,05 % NaN₃

⁽⁴⁾ 3. Antikörper in PP; 5 % Chemiblocker

Rattenretinae, die als sogenannte Gesamtpräparationen (*whole mounts*) gefärbt werden sollten, wurden wie oben beschrieben aus den Augen präpariert, fixiert und gewaschen. Nachdem die Retinae in Saccharose kryoprotektiert worden waren, wurden sie mehrfach in flüssigem Stickstoff schockgefroren und wieder aufgetaut (*cracken*). Dadurch wurden die Zellen aufgebrochen und das Gewebe den Antikörpern zugänglich gemacht. Anschließend wurden die Präparationen auf gelatinisierten Objektträgern aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Die Färbung der Gesamtpräparationen erfolgte wie für die Vertikalschnitte beschrieben mit verlängerten Inkubationszeiten: Die Gesamtpräparate wurden 3-5 Tage im 1. Antikörper (bei 4°C) und ü.N. im 2. Antikörper (bei RT) inkubiert. Die Waschschritte dauerten mehrere Stunden.

2.15.3 Lichtmikroskopischer Nachweis von HCN-Kanälen im Rattengehirn

Die Gewebeschnitte und immunzytochemischen Färbungen von Rattengehirnen wurden von Dr. T.J. Görös (Heinrich Heine Universität Düsseldorf) angefertigt. Die beschriebenen Methoden entsprechen den Bestimmungen der "NIH Principles of Laboratory Animal Care" (1985). Ca. 300 g schwere, männliche Ratten (Stamm: Wistar) wurden mit Pentobarbital narkotisiert und transcardial perfusionsfixiert. Dazu wurden die Blutgefäße der Ratten mit 70 ml PBS (2.14.2) gespült und anschließend die Gewebe mit 500 ml Fixierungslösung fixiert. Danach wurden die Gehirne entfernt und für 2 h in Fixierungslösung nachfixiert. Durch ü.N.-Inkubation in 25 % Saccharose/PBS wurde das Gewebe kryoprotektiert. In einem Gefrier-Mikrotom wurden 70 µm dicke Coronalschnitte angefertigt und freischwimmend weiterbehandelt.

Alle Antikörperfärbungen fanden bei RT auf einem Schüttler statt. Die Schnitte wurden mehrfach in PBS gewaschen, 4 h in PBS/0,5 % Tween 20 inkubiert und anschließend 30 min in PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte 30 min in 1 % H₂O₂/PBS inkubiert, um endogene Peroxidase-Aktivität zu blockieren. Nach 4 x 40minütigem Waschen in PBS wurden die Schnitte jeweils 30 min in Blockierungslösung I und II inkubiert. Die primären HCN-Antikörper wurden in Verdünnungen von 1:5 bis 1:100 in 1. Antikörper-Inkubationslösung verdünnt und die Schnitte darin für 2 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 5 x 40 min in PBS gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde ein biotinylierter Ziege-Anti-Ratte-Antikörper (Dianova) 1:500 in 2. Antikörper-Inkubationslösung verdünnt und die Schnitte darin ü.N. inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 5 x 40 min in PBS gewaschen und mit einem 1:500 verdünnten ABC-Komplex ("Vectastain Elite ABC Kit"; Vector Laboratories Inc.) ü.N. inkubiert. Danach wurden die Schnitte 4 x 40 min in PBS und 40 min in 0,1 M Tris/HCl (pH 7,6) gewaschen. Zum enzymatischen Farbnachweis wurden die Schnitte für 20 min in DAB-Lösung inkubiert. Schließlich wurden die Schnitte 3 x 15 min in 0,1 M Tris/HCl (pH 7,6) gewaschen, in Xylen geklärt und auf gelatinisierten Objektträgern aufgenommen.

Fixierungslösung:

4 % Paraformaldehyd
0,2 % Picrinsäure
0,05 % Glutaraldehyd
in PBS

Blockierungslösung I:

10 % NGS
0,2 % Ziege-Anti-Ratte-Fab-Fragment (Dianova)
in PBS

Blockierungslösung II:

10 % Normales Mausserum (*normal mouse serum*; NMS)

1. Antikörperinkubationslösung:

1 % NGS
0,1 % NaN_3
in PP (2.15.1)

2. Antikörperinkubationslösung:

1 % NGS
in PP (2.15.1)

DAB-Lösung:

0,025 % DAB
0,0015 % H_2O_2
in 0,1 M Tris/HCl pH 7,6

2.15.4 Elektronenmikroskopischer Nachweis von HCN3 in der Rattenretina

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Frau Dr. S. Haverkamp (Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt) angefertigt. Dazu wurden Rattenaugen für 30 min bei RT in 4 % PA/PBS (2.14.2) fixiert. Anschließend wurden die Retinae abpräpariert und 3 x 15 min in PBS gewaschen. Danach wurde das Gewebe durch Inkubationen in 10 % Saccharose/PBS (1-2 h), 20 % Saccharose/PBS (1-2 h) und 30 % Saccharose/PBS (ü.N.) kryoprotektiert. Durch *Cracken* (2.15.2) wurden die Retinae den Antikörpern zugänglich gemacht. Anschließend wurden die Retinae 3 x 15 min in PBS gewaschen und in 4 %igem Agar (Merck)/PBS eingebettet. In einem Vibratom wurden 70 μm dicke Vertikalschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden 3 x 15 min in PBS gewaschen und freischwimmend weiterbehandelt.

Alle Antikörperfärbungen fanden bei RT auf einem Schüttler statt. Der Antikörperrnachweis erfolgte hier durch eine Peroxidasereaktion nach der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode, Hsu et al., 1981). Die Vibratomschnitte wurden für 2 h in EM-Vorinkubationslösung vorinkubiert. Der primäre Antikörper TLL-6C5 wurde 1:20 in EM-Inkubationslösung verdünnt und die Schnitte darin für 2 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 4 x 15 min in PBS gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde ein biotinylierter Ziege-Anti-Ratte-Antikörper (Dianova) 1:100 in EM-Vorinkubationslösung verdünnt. Die Inkubationsdauer betrug 2 h. Anschließend wurden die Vibratomschnitte 4 x 15 min in PBS gewaschen und für 2 h mit einem ABC-Komplex nach Herstellerangaben ("Vectastain Elite ABC Kit"; Vector Laboratories Inc.) inkubiert. Zum enzymatischen Farbnachweis wurden die Schnitte für 5-10 min in DAB-Lösung inkubiert. Um die Farbreaktion zu stoppen, wurden die Schnitte zunächst 2 x 15 min in 0,05 M Tris-Puffer (pH 7,6) und danach 2 x 15 min CC-Puffer gewaschen. Die Schnitte wurden mit 2,5 % Glutaraldehyd/CC-Puffer für 2 h bei 4°C nachfixiert, ü.N. bei 4°C in CC-Puffer und anschließend 4 x 15 min in H₂O gewaschen.

Zur Silberintensivierung wurden die Schnitte für 10 min in EM-Lösung A bei 60°C, für 3 min in EM-Lösung B bei RT und für 3 min in EM-Lösung C bei RT inkubiert. Nach jeder Inkubation wurden die Schnitte 3 x 3 min in H₂O gewaschen. Anschließend wurden sie für 30 min mit 0,5 % Osmiumtetroxid/CC-Puffer bei 4°C osmiert, 3 x 10 min in CC-Puffer gewaschen, in einer aufsteigenden Acetonreihe (30 %, 50 %, 70 %, 85 %: je 15 min; 3 x 10 min 100 %) dehydriert und dann 5 min in Propylenoxid inkubiert. Danach wurden die Schnitte 2 h in eine 1:1-Mischung aus Aceton und Epon und ü.N. in 100 % Epon inkubiert. Die Flacheinbettung erfolgte anschließend in 100 % Epon bei 60°C für 48 h. Von den eingebetteten Vibratomschnitten wurden Ultradünnschnitte mit einem Mikrotom (Reichert) in Serie geschnitten. Die Ultradünnschnitte wurden mit einem Elektronenmikroskop (EM 10C/CR, Zeiss) analysiert und mit einer Digitalkamera aufgenommen.

EM-Vorinkubationslösung:

10 % NGS

1 % BSA

in PBS

EM-Inkubationslösung:

3 % NGS

1 % BSA

0,05 % NaN₃

in PBS

DAB-Lösung:

0,05 % DAB

0,01 % H₂O₂

in 0,05 M Tris/HCl pH 7,6

CC-Puffer:

100 mM Natriumcacodylat/HCl pH 7,5

EM-Lösung B:

0,05 % Tetrachlorogold(III)säure

EM-Lösung A:

3 % Hexamethylentetramin

0,2 % Silbernitrat

0,2 % Di-Natriumtetraborat

EM-Lösung C:

2,5 % Natriumthiosulfat

2.16 Herstellung von monoklonalen Antikörpern

Zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern wurden sowohl Peptide (2.16.1), die an ein Trägerprotein gekoppelt waren, als auch ein MBP-Fusionsprotein (2.16.2) zur Immunisierung von Ratten (2.16.3) verwendet.

2.16.1 Kopplung von Peptiden an Trägerproteine**2.16.1.1 Kopplung von Peptiden an Trägerproteine über 3-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester (MBS)**

Die Kopplung von Peptiden an Trägerproteine über 3-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester (MBS) erfolgte nach Grant (1997). Um Peptide über das kreuzvernetzende Reagenz MBS an ein Trägerprotein koppeln zu können, wurden diese mit einem N-terminalen Cystein versehen. Zusätzlich wurde darauf geachtet, daß kein weiteres Cystein in der Peptidsequenz vorkommt, so daß die Peptide gerichtet an das Trägerprotein gekoppelt werden konnten. Als Trägerprotein fand das Napfschnecken-Hämocyanin (KLH) Verwendung. Die Kopplung erfolgte in drei Schritten: Zunächst wurde das MBS an primäre Aminogruppen des Trägerproteins gebunden. Danach wurden nicht-gekoppelte MBS-Moleküle über eine Säulenchromatographie von den KLH/MBS-Komplexen abgetrennt. Im letzten Schritt wurden die Peptide zu dem KLH/MBS-Komplex zugegeben und über die Cysteingruppen an den Komplex gekoppelt.

Im ersten Schritt wurden 1,5 mg KLH in 100 µl 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 gelöst und mit 20 µl MBS in DMSO (Konz.: 10 mg/ml) versetzt. Als Alternative zum MBS konnte die wasserlösliche Form Sulfo-MBS in der gleichen Konzentration verwendet werden. Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei RT unter ständigem Rühren inkubiert. Anschließend wurden die nicht-gekoppelten MBS-Moleküle über eine PD10-Säule (Amersham Pharmacia Biotech) von den KLH/MBS-Komplexen abgetrennt. Dazu wurde der Reaktionsansatz mit 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 auf 2,5 ml aufgefüllt, über eine äquilibrierte PD10-Säule gegeben und mit 3,5 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 nachgewaschen. Die von der Säule eluierten Fraktionen wurden in 500 µl-Aliquots aufgefangen und deren Proteinkonzentration nach Bradford (2.11.1) bestimmt. Die nicht-gekoppelten MBS-Moleküle eluierten nach ca. 0,5-1 ml von der PD10-Säule; die KLH/MBS-Komplexe ließen sich nach ca. 3-4,5 ml in den Fraktionen nachweisen. Die Fraktionen mit den KLH/MBS-Komplexen wurden anschließend vereinigt und für die Kopplung mit den Peptiden eingesetzt. Dazu wurden 1 mg Peptid in 300 µl 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0 gelöst und zusammen mit den KLH/MBS-Komplexen für 2 h bei RT unter ständigem Rühren inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit H₂O auf 2 ml aufgefüllt und konnte dann zur Immunisierung von Ratten (2.16.3) oder Kaninchen (2.17.1) verwendet zu werden.

2.16.1.2 Kopplung von Peptiden an Trägerproteine über Glutaraldehyd (GA)

Als Alternative zum kreuzvernetzenden Reagenz MBS (2.16.1.1) konnte Glutaraldehyd (GA) zur Kopplung der Peptide an Trägerproteine verwendet werden. Diese Methode ist weniger zeitaufwendig und erforderte zudem keinen Cysteinrest in der Peptidsequenz. Dafür hatte sie aber zwei entscheidende Nachteile: Erstens wurden die Peptide nicht gerichtet an das Trägerprotein gekoppelt; die Kopplung erfolgte nicht nur über den N-Terminus des Peptids, sondern auch über eventuell vorhandene primäre Aminogruppen der Seitenketten. Zweitens wurden in einem erhöhten Maße Moleküle des Trägerproteins untereinander kreuzvernetzt; wurden die Reaktionsansätze bei 4°C oder tieferen Temperaturen gelagert, fielen diese hochmolekularen Aggregate aus. Aus diesen Gründen wurde die Kopplung von Peptiden an Trägerproteine über GA nur zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern (2.17) verwendet. Als Trägerprotein wurde KLH verwendet. Zur Kopplung wurden 1 mg KLH und 1 mg Peptid in insgesamt 750 µl 100 mM Phosphatpuffer pH 7,0 gelöst. Dieser Suspension wurden tropfenweise unter ständigem Rühren 200 µl 0,15 %ige GA-Lösung zugefügt. Der Reaktionsansatz wurde 2 h bei RT unter ständigem Rühren inkubiert. Anschließend wurde

überschüssiges GA durch Zugabe von 50 µl 1 M Glycin und weiteren 2 h Inkubation abgeblockt. Der Reaktionsansatz wurde mit H₂O auf 2 ml aufgefüllt und möglichst umgehend zur Immunisierung von Kaninchen (2.17.1) verwendet.

2.16.2 Expression und Reinigung von Maltose-Bindeprotein (MBP) und von MBP-Fusionsproteinen

2.16.2.1 Expression von MBP und von MBP-Fusionsproteinen

Für die Expression von MBP und MBP-Fusionsproteinen in *E.coli* wurde der Plasmidvektor pMal c2X (NEB) verwendet (2.2.1). Das Genfragment, das für das gewünschte Antigen kodiert, wurde so an das 3'-Ende des MBP-kodierenden Bereiches kloniert, daß der Leserahmen erhalten blieb. Das Fusionsprotein enthielt also N-terminal den MBP-Anteil und C-terminal das Antigen. Die Expression der Proteine (2.2.3.3) und der Aufschluß der Zellen erfolgte nach Riggs (1994). Die Zellen wurden durch Ultraschall-Behandlung aufgeschlossen (Branson Sonificator B-12; Stufe 6-7; 2 x 30 sek; 4°C). Durch Zentrifugation (5.000 g; 5 min; 4°C) wurden die löslichen Zellbestandteile (Überstand) von den unlöslichen (Pellet) getrennt. Bei der Expression des löslichen Fusionsproteins oder des MBP wurde der Überstand weiterverarbeitet.

2.16.2.2 Reinigung von MBP und von MBP-Fusionsproteinen

MBP bindet an die repetitiven Maltosereste von Amylose. Daher können MBP bzw. MBP-Fusionsproteine durch Amylose-Affinitätschromatographie in Anlehnung an Kellerman & Ferenci (1982) gereinigt werden. Als Affinitätsmaterial wurde eine Amylose-Agarose (NEB) verwendet. Der Überstand des Bakterienlysats (2.16.2.1) wurde 1:5 in AAC-Puffer verdünnt und auf Amylosesäulen (Biorad; München) aufgetragen. Danach wurden die gebundenen Proteine mit 20 mM Maltose in AAC-Puffer eluiert. Das Säuleneluat wurde zur Immunisierung von Kaninchen (2.17.1) verwendet.

AAC-Puffer:

200 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 20 mM Tris/HCl pH 7,4

2.16.3 Immunisierung von Ratten und Herstellung von Hybridomzellen

Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. E. Kremmer vom Institut für molekulare Immunologie, GSF München. Die Immunisierung von Ratten (Rasse: Lou/C) und die Herstellung von Hybridomen geschah nach folgendem Schema:

	Grundimmunisierung mit Antigen (Adjuvans in einem 1:1-Verhältnis zugesetzt)
nach 6-8 Wochen	Auffrischungsimmunisierung (<i>boost</i>) mit Antigen (ohne Adjuvans)
nach 3 Tagen	Fusion von Rattenmilz-Zellen mit der Maus-Myelomzelllinie P3X63-Ag8.653
nach 12 Tagen	Primäraustestung der Hybridome im ELISA (Ziel: falsch Positive sollen aussortiert werden)
nach 7 Tagen	Sicherung der Hybridome
nach 14 Tagen	Gewinnung von 5 ml Primärüberstand

Die vermeintlich positiven Primärüberstände wurden durch Gelelektrophorese (2.13), Westernblot (2.14.1) und immunologischem Nachweis (2.14.2) an Membranproteinen aus heterolog transfizierten HEK 293-Zellen (2.10.1) getestet. Die Hybridome, deren Primärüberstände sich in diesen Tests als geeignet erwiesen hatten, wurden unter Berücksichtigung der Ig-Subklasse rekloniert. Die Reklonierung erfolgte durch Einzelzellverteilung, bis alle Hybridome auf der Kulturplatte positiv mit dem Antigen reagierten. Der übriggebliebene Klon wurde expandiert und zur Gewinnung des Überstands mit dem eigentlichen monoklonalen Antikörper (Reinkultur) verwendet.

2.17 Herstellung und Reinigung von polyklonalen Antikörpern

Zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern wurden Peptide verwendet, die entweder über MBS (2.16.1.1), oder über Glutaraldehyd (2.16.1.2) an das Trägerprotein KLH gekoppelt waren.

2.17.1 Immunisierung von Kaninchen

Polyklonale Antikörper wurden hergestellt, indem Kaninchen (Rassen: Weißer Neuseeländer bzw. Chinchilla Bastard) mit Peptiden, die an Trägerproteine gekoppelt waren (2.16.1), immunisiert wurden. Das Antigen (1 mg in 1 ml) wurde im Verhältnis 1:1 mit Adjuvants ABM 3 (je 0,5 mg MPL, TDM, CWS in 2% Öl-Tween-80-H₂O; RIBI ImmunoChemResearch, Inc.) vermischt. 1 ml dieser Suspension wurde subcutan im Nackenbereich des Kaninchens injiziert. In einem 14tägigen Rhythmus wurde die gleiche Menge Antigen nochmals injiziert. Zwei Wochen nach der ersten Injektion wurden dem Tier aus der Ohrarterie 5-10 ml Blut abgenommen. Zur Gewinnung des Serums wurde das Blut 4 h bei RT gelagert und anschließend zentrifugiert (2.000 g; 10 min; 4°C). Das Serum (Überstand) wurde vom Blutkuchen und den anderen unlöslichen Bestandteilen (Pellet) abgetrennt. Die Seren wurden bei -80°C gelagert.

2.17.2 Reinigung von polyklonalen Antikörpern durch Affinitätschromatographie

Polyklonale Antikörper wurden aus den Seren immunisierter Kaninchen durch Affinitätsreaktionen in Anlehnung an Campbell et al. (1951) gereinigt. Die Reinigung erfolgte in drei Schritten. Zunächst wurden die Immunglobuline angereichert, indem das Serum über eine Protein A/G-Säule gegeben wurde. Danach wurden die spezifischen Antikörper durch eine Affinitätschromatographie aus der Immunglobulinfraction isoliert. Im letzten Schritt wurden die gereinigten spezifischen Antikörper in einer "CentriCon 30-Säule" konzentriert, um eine längere Lagerung möglich zu machen.

Zur Anreicherung der Immunglobuline aus dem Serum wurde eine "Protein A/G-UltraLink™-Säule" (Pierce) verwendet. Dazu wurden 2,5-5 ml Serum mit dem gleichen Volumen an 20 mM Phosphatpuffer pH 8,0 verdünnt und dreimal über die mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Säule gegeben. Unspezifisch gebundene Bestandteile des Serums wurden dann mit dem 10fachen Säulenvolumen an 20 mM Phosphatpuffer pH 8,0 von der Säule gewaschen. Die gebundenen Immunglobuline wurden anschließend mit dem 5fachen Säulenvolumen an 100 mM Glycin pH 2,5 sauer eluiert. Zum Schutz der Immunglobuline wurde die Elutionsfraktion direkt in BSA (Endkonzentration: 0,2 %) aufgefangen und mit 1 M Tris/HCl pH 8,8 auf neutralen pH eingestellt.

Für die Affinitätsreinigung der spezifischen Antikörper über eine Sepharose-Säulenmatrix wurden die zur Immunisierung der Kaninchen verwendeten Peptide (Antigene) nach dem Protokoll des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech) an aktivierte "Thiol-Sepharose 4B" gekoppelt (äquimolares Verhältnis zwischen Cysteingruppen der Peptide und aktivierten Thiolgruppen der Säulenmatrix). Der Reaktionsansatz wurde in Minichromatographiesäulen (Biorad) pipettiert und mit dem 10fachen Säulenvolumen an 10 mM Tris/HCl pH 7,4 äquilibriert. Anschließend wurde die Elutionsfraktion mit den angereicherten Immunglobulinen dreimal über die Säule gegeben. In zwei Waschschritten mit je 10 Säulenvolumen 10 mM Tris/HCl pH 7,5, sowie 10 mM Tris/HCl pH 7,5/0,5 M NaCl wurden Antikörper entfernt, die nicht gegen das Antigen gerichtet waren. Die Elution der spezifischen Antikörper erfolgte mit dem 10fachen Säulenvolumen an 100 mM Glycin pH 2,5. Auch nach diesem Reinigungsschritt wurden die Antikörper in 0,2 % BSA aufgefangen und mit 1 M Tris/HCl pH 8,8 auf neutralen pH eingestellt. Die Konzentrierung der gereinigten Antikörper erfolgte über eine "CentriCon 30-Säule" (Amicon) nach Angaben des Herstellers. Die Proteinkonzentration der Antikörperlösung wurde nach Bradford (2.11.1) bestimmt. Die Antikörper wurden in PBS mit 50 % Glycerin und 0,05 % NaN₃ bei -20°C gelagert.

2.18 Immunpräzipitation

Die Immobilisierung von monoklonalen Antikörpern an Protein G-Sepharose (2.18.1) und die Immunpräzipitation von solubilisierten Membranproteinen an einer Antikörper/Säulenmatrix (2.18.2) wurden in Anlehnung an Bonifacino et al. (1999) durchgeführt.

2.18.1 Immobilisierung von monoklonalen Antikörpern an Protein G-Sepharose

Zur Herstellung einer Antikörper/Säulenmatrix wurden monoklonale Antikörper aus immunisierten Ratten (2.16) gerichtet an "Protein G-Sepharose 4B Fast Flow" (Sigma) gebunden. Um zu verhindern, daß sich die Antikörper im Verlauf der eigentlichen Immunpräzipitation (2.18.2) wieder vom Protein G lösen ("Bluten"), wurden sie mit Hilfe des quervernetzenden Reagenz Dimethylpimelimidat (DMP) kovalent an die Säulenmatrix gekoppelt.

Zunächst wurden 1 ml Protein G-Sepharose in eine Minichromatographiesäule (Biorad) pipettiert und mit 10 Säulenvolumen 10 mM Tris/HCl pH 8,0 äquilibriert. Anschließend wurden 50-75 ml Reinkultur eines monoklonalen Antikörpers (2.16.3) dreimal über die Säule gegeben und unspezifisch gebundene Bestandteile der Reinkultur mit dem 10fachen Säulenvolumen an 10 mM Tris/HCl pH 8,0 von der Säule gewaschen. Um Antikörper und Protein G mit Hilfe von DMP kreuzvernetzen zu können, wurde die Säule mit dem 10fachen Volumen an 200 mM Natriumborat pH 9,0 umgepuffert. Danach wurde DMP in einer Endkonzentration von 20 mM hinzugegeben und der Ansatz für 30 min bei RT inkubiert. Während der Inkubation wurde das Säulenmaterial durch Invertieren in Suspension gehalten. Durch Waschen der Antikörper/Säulenmatrix mit dem 20fachen Säulenvolumen an 200 mM Ethanolamin pH 8,0 wurden freie DMP-Moleküle entfernt bzw. noch reaktive Gruppen von einseitig gekoppelten DMP-Molekülen abgesättigt. Die Antikörper/Säulenmatrix wurde schließlich mit 10 Säulenvolumen PBS umgepuffert und in PBS/0,05 % NaN₃ gelagert.

2.18.2 Immunpräzipitation von solubilisierten Membranproteinen an einer Antikörper/Säulenmatrix

Immunpräzipitationen wurden mit solubilisierten (2.12.1) Membranproteinen aus heterolog transfizierten HEK 293-Zellen (2.10.1) oder nativem Gewebe (2.10.2) durchgeführt. Dabei wurde zuerst bestimmt, welche Menge an solubilisierten Membranproteinen nötig war, um das spezifische Protein im Westernblot (2.14) nachweisen zu können. Für die Immunpräzipitation wurde die 5-10fache Menge eingesetzt, um bei der späteren Versuchsauswertung deutliche Signale zu erhalten. Bei heterolog transfizierten HEK 293-Zellen lag die Menge an einzusetzendem Protein meist deutlich unter 100 µg. In diesen Fällen wurde der Proteinsuspension 50 µg BSA (NEB) hinzugefügt. Die Immunpräzipitation wurde im "batch"-Verfahren durchgeführt, um mit kleinen Säulenvolumina arbeiten zu können. Zum Wechseln der Flüssigkeit wurde die Säulenmatrix zentrifugiert (200 g; 5 min; 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Säulenmaterial resuspendiert. Während der Inkubationen wurde das Säulenmaterial durch Invertieren in Suspension gehalten. Die solubilisierten Membranproteine wurden zunächst für 30 min bei 4°C mit 100 µl "Protein G-Sepharose 4B Fast Flow" (Sigma; in Puffer D äquilibriert) vorinkubiert. Dadurch wurden die Bestandteile der Proteinsuspension entfernt, die unspezifisch mit der Gelmatrix wechselwirken. Nach der Vorinkubation wurde die Protein G-Sepharose abzentrifugiert und

die vorinkubierte Proteinsuspension zu 100 µl der in Puffer D äquilibrierten Antikörper/Säulenmatrix (2.18.1) gegeben. Der Ansatz wurde für 2-15 h bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit den nicht-gebundenen Proteinen (Durchfluß) vorsichtig abgenommen und die Antikörper/Säulenmatrix siebenmal mit dem 4fachen Säulenvolumen an Puffer D gewaschen. Durch Zugabe von 100 µl Elutionspuffer, 15minütiger Inkubation bei RT und anschließender Zentrifugation (200 g; 15 min; RT) wurden die gebundenen Proteine von der Antikörper/Säulenmatrix eluiert. Die Auswertung der Immunpräzipitation erfolgte durch Gelelektrophorese (2.13) und Westernblot-Analyse (2.14).

Puffer D:

wie Puffer C (2.10.1), mit 0,1 % Triton X-100

Elutionspuffer:

10 mM Tris/HCl pH 7,5

5 mM EDTA

2 % SDS

3 Ergebnisse

Hyperpolarisationsaktivierte und zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle (HCN-Kanäle) konnten durch elektrophysiologische Untersuchungen in zahlreichen Geweben lokalisiert und charakterisiert werden. Diese Ionenkanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Regulation rhythmischer Aktivierungsmuster, wie sie z.B. im Herzen und in vielen Nervenzellen auftreten. Auch in Zellen ohne spontane Rhythmogenese erfüllen HCN-Kanäle wichtige Funktionen. Sie sind beispielsweise bei der Signalverarbeitung in Seh- und Riechzellen und an der Wahrnehmung von Schmerzen beteiligt (Übersicht: DiFrancesco, 1993; Pape, 1996). Mittlerweile konnten vier verschiedene Gene für HCN-Kanäle in verschiedenen Säugetierspezies identifiziert und in heterologen Expressionssystemen elektrophysiologisch untersucht werden. Die Aktivierungskinetiken der heterolog exprimierten Kanäle unterscheiden sich sowohl untereinander, als auch im Vergleich zu den in nativen Geweben vermessenen HCN-Kanälen. (Übersicht: Santoro & Tibbs, 1999; Gauss & Seifert, 2000; Kaupp & Seifert, 2001).

In der vorliegenden Arbeit werden zum ersten Mal poly- und monoklonale Antikörper gegen alle vier HCN-Kanaltypen vorgestellt. Durch Westernblot-Analysen wurde untersucht, ob die verschiedenen Kanaltypen posttranskriptional oder posttranslational modifiziert werden. Die Lokalisation der HCN-Kanalproteine auf zellulärer und subzellulärer Ebene sollte die Frage klären, ob die verschiedenen Typen von HCN-Kanälen in einem Zelltyp ko-exprimiert werden und eventuell als heterooligomere Komplexe vorliegen können. Die Identifikation von HCN-exprimierenden Zelltypen kann außerdem weitere Hinweise auf die physiologische Funktion der HCN-Kanäle geben.

Das Kapitel "Ergebnisse" ist in vier Teile gegliedert. Der erste Teil beschäftigt sich mit der Untersuchung zur gewebespezifischen Expression von hHCN1 und hHCN4 durch Northernblot-Analysen. Der zweite Teil beschreibt die Herstellung und Charakterisierung von poly- und monoklonalen Antikörpern gegen alle vier HCN-Kanaltypen. Der dritte Teil umfaßt die Untersuchungen zur Expression und Lokalisation der HCN-Kanalproteine in der Rattenretina. Im vierten Teil werden schließlich erste Untersuchungen zur Expression und Lokalisation der HCN-Kanalproteine im Ratten- und Mausgehirn präsentiert.

3.1 Expression der HCN-Kanäle in menschlichen Geweben

Die HCN-Kanäle erfüllen wichtige Funktionen beispielsweise bei der Regulation des Herzschlags in den Schrittmacherzellen des Herzens oder bei der Regulation des Schlaf-Wachrhythmus im Thalamus. Aus diesem Grund besteht auch ein medizinisches Interesse daran, die Expressionsmuster der HCN-Kanalgene in menschlichen Geweben aufzuklären. Daher wurde die Expression der Gene für hHCN1 und hHCN4 in verschiedenen menschlichen Geweben mit Hilfe von "Multiple Tissue Northern Blots" (Clontech; 2.6.2) untersucht. Auf diesen "Multiple Tissue Northern Blots" war die Poly(A)⁺-RNA aus 16 verschiedenen menschlichen Geweben und 14 verschiedenen Regionen des menschlichen Gehirns aufgetragen und immobilisiert. Die Membranen wurden nach Angaben des Herstellers hybridisiert (2.6.3). Als Sonden dienten kurze DNA-Fragmente, die durch PCR mit genspezifischen Primern und cDNA-Klonen als Matrizen-DNA amplifiziert worden waren.

3.1.1 Gewebespezifische Expression von hHCN1

Für die Experimente, die im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit mit hHCN1 durchgeführt wurden, konnte zum ersten Mal ein vollständiger cDNA-Klon des menschlichen HCN1-Kanalgens benutzt werden (s. Anhang 8.5). Als Sonde für die Hybridisierung der "Multiple Tissue Northern Blots" diente ein 353 Bp großes PCR-Fragment, das mit der Primerkombination #2245/#2247 (s. Anhang 8.8) und dem cDNA-Klon λ -C4 als Matrizen-DNA amplifiziert wurde. Der cDNA-Klon λ -C4 kodiert für einen C-terminalen Abschnitt des hHCN1-Proteins und wurde mir freundlicherweise von Frau Dr. R. Gauss (IBI-1, Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt. Das amplifizierte PCR-Fragment entspricht den Aminosäuren 626 bis 743 des vollständigen Kanalproteins. Die Autoradiogramme der hybridisierten "Multiple Tissue Northern Blots" sind in Abb. 3.1 dargestellt.

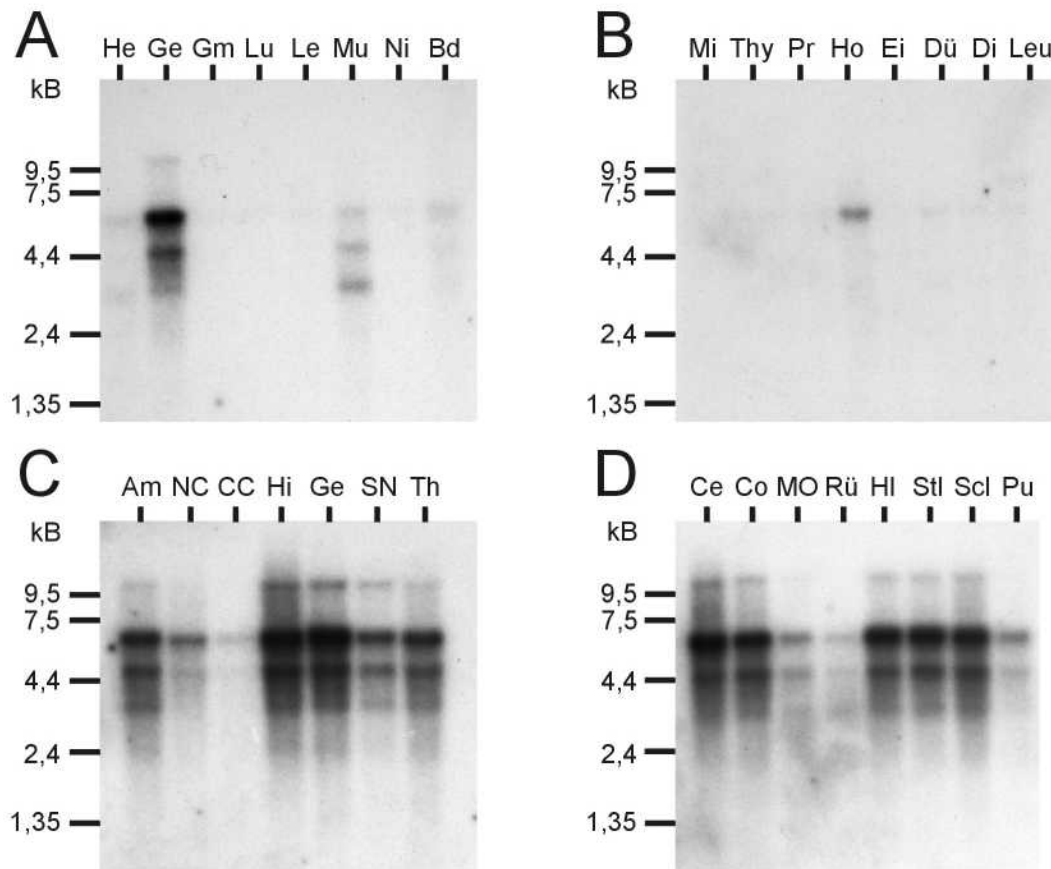


Abb. 3.1: Autoradiogramm der "Multiple Tissue Northern Blots" nach stringenter Hybridisierung mit einem hHCN1-Fragment. Jeweils 2 µg Poly(A)⁺-RNA aus 16 verschiedenen menschlichen Geweben und 14 verschiedenen Regionen des menschlichen Gehirns waren aufgetragen und immobilisiert. Links neben jedem Autoradiogramm sind die Fragmentgrößen eines Größenstandards in kB angegeben. Die Expositionsdauer betrug 14 Tage bei -80°C. **A)** "Human Multiple Tissue Northern Blot": He, Herz; Ge, Gehirn; Gm, Gebärmutter; Lu, Lunge; Le, Leber; Mu, Skelettmuskel; Ni, Niere; Bd, Bauchspeicheldrüse. **B)** "Human Multiple Tissue Northern Blot II": Mi, Milz; Thy, Thymus; Pr, Prostata; Ho, Hoden; Ei, Eierstöcke; Dü, Dünndarm; Di, Dickdarm; Leu, periphere Leukozyten. **C)** "Human Brain Multiple Tissue Northern Blot III": Am, Amygdala; NC, Nucleus Caudatus; CC, Corpus Callosum; Hi, Hippocampus; Ge, Gehirn; SN, Substantia Nigra; Th, Thalamus. **D)** "Human Brain Multiple Tissue Northern Blot II": Ce, Cerebellum; Co, Cerebraler Cortex; MO, Medulla Oblongata; Rü, Rückenmark; HI, Hinterhauptslappen; Stl, Stirnlappen; Scl, Schläfenlappen; Pu, Putamen.

Von den 16 untersuchten menschlichen Geweben (Abb. 3.1 A und B) liefert das Gehirn das mit Abstand stärkste Hybridisierungssignal. In diesem Gewebe lassen sich vier Transkripte unterschiedlicher Größe nachweisen. Das stärkste Signal stammt von einem 6,8 kB großen Transkript. Die anderen Transkripte mit Größen von 9,7 kB, 4,8 kB und 3,5 kB liefern deutlich schwächere Signale. Abgesehen vom Gehirn lassen sich noch Transkripte für hHCN1 im Skelettmuskel, in der Bauchspeicheldrüse und im Hoden nachweisen. Im Gegensatz zum Gehirn liefern im Skelettmuskel die beiden kleineren Transkripte (4,8 und 3,5 kB) stärkere Signale als das 6,8 kB-Transkript. In der Bauchspeicheldrüse und im Hoden läßt sich jeweils

nur das 6,8 kB-Transkript nachweisen; es ist jedoch nicht auszuschließen, daß die anderen Transkripte bei noch längerer Expositionsdauer ebenfalls detektiert werden können. Das gleiche gilt für das 9,7 kB-Transkript, welches in Abb. 3.1 nur im Gehirn zu sehen ist. Andere Gewebe, wie z.B. Herz und Nieren, liefern ebenfalls sehr schwache Hybridisierungssignale.

Bei einer genaueren Untersuchung des Expressionsmusters von hHCN1 im Gehirn (Abb. 3.1 C und D) können in allen 14 untersuchten Gehirnregionen Transkripte detektiert werden. Die stärksten Signale stammen dabei aus dem Cerebralen Cortex und dem Cerebellum, sowie aus mehreren kortikalen Regionen (Hippocampus, Amygdala, Hinterhaupts-, Stirn- und Schläfenlappen).

3.1.2 Gewebespezifische Expression von hHCN4

Die ersten cDNA-Klone, die die vollständige cDNA-Sequenz eines menschlichen HCN-Kanals enthielten, waren aus dem Kanalgemisch hHCN4 abgeleitet (Scholten, 1998; Ludwig et al., 1999; Seifert et al., 1999). Als Sonde für die Hybridisierung der "Multiple Tissue Northern Blots" diente ein 267 Bp großes PCR-Fragment, das mit der Primerkombination #2228/#2230 (s. Anhang 8.8) und dem cDNA-Klon pB-55HH4 (Scholten, 1998) als Matrizen-DNA amplifiziert wurde. Das amplifizierte PCR-Fragment kodiert für einen C-terminalen Abschnitt des hHCN4-Proteins (Aminosäureposition 728 bis 816). Die Autoradiogramme der hybridisierten "Multiple Tissue Northern Blots" sind in Abb. 3.2 dargestellt.

Die Hybridisierung der "Multiple Tissue Northern Blots" mit der hHCN4-spezifischen Sonde zeigte, daß das Gen nur in wenigen Geweben exprimiert wird (Abb. 3.2 A und B). Deutliche Signale lassen sich lediglich im Herzen und im Hoden detektieren. In beiden Geweben kann ein 7,3 kB großes Transkript nachgewiesen werden. Wesentlich stärker ist allerdings das Signal von einem zweiten, 4,5 kB großen Transkript im Hoden. Im Gehirn läßt sich das 7,3 kB große Transkript nur sehr schwach nachweisen. Eine genauere Untersuchung der Expression von hHCN4 in verschiedenen Gehirnregionen (Abb. 3.2 C und D) zeigt jedoch, daß das Gen hauptsächlich in bestimmten Abschnitten exprimiert wird. Dabei läßt sich im Thalamus ein Hybridisierungssignal detektieren, welches noch wesentlich stärker ist, als das des 4,5 kB-Transkripts im Hoden. Deutlich schwächere Signale liefern folgende Hirnregionen: Substantia Nigra, Amygdala, Cerebellum, Cerebraler Cortex, Medulla Oblongata, Hippocampus, Putamen, sowie die Hinterhaupts-, Stirn- und Schläfenlappen.

Keine Signale lassen sich im Nucleus Caudatus, Corpus Callosum und im Rückenmark nachweisen.

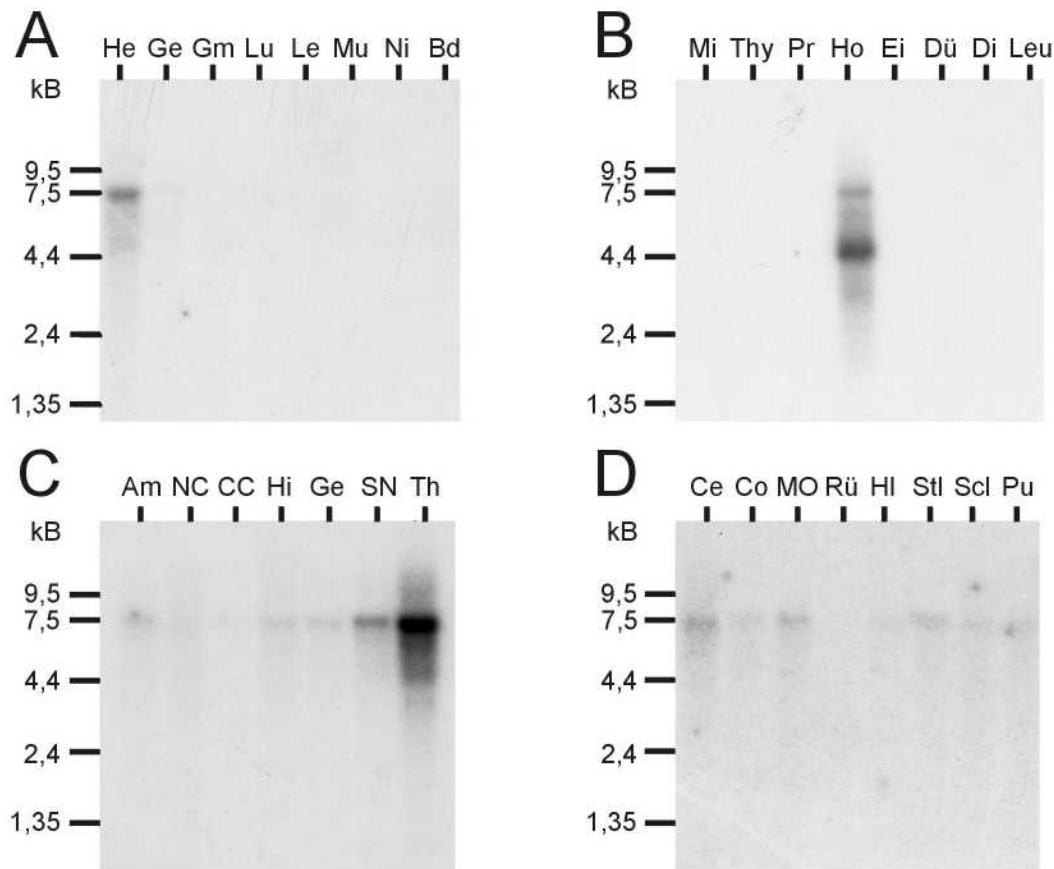


Abb. 3.2: Autoradiogramm der "Multiple Tissue Northern Blots" nach stringenter Hybridisierung mit einem hHCN4-Fragment. Jeweils 2 µg Poly(A)⁺-RNA aus 16 verschiedenen menschlichen Geweben und 14 verschiedenen Regionen des menschlichen Gehirns waren aufgetragen und immobilisiert. Links neben jedem Autoradiogramm sind die Fragmentgrößen eines Größenstandards in kB angegeben. Die Expositionsdauer betrug 14 Tage bei -80°C. **A)** "Human Multiple Tissue Northern Blot": He, Herz; Ge, Gehirn; Gm, Gebärmutter; Lu, Lunge; Le, Leber; Mu, Skelettmuskel; Ni, Niere; Bd, Bauchspeicheldrüse. **B)** "Human Multiple Tissue Northern Blot II": Mi, Milz; Thy, Thymus; Pr, Prostata; Ho, Hoden; Ei, Eierstöcke; Dü, Dünndarm; Di, Dickdarm; Leu, periphere Leukozyten. **C)** "Human Brain Multiple Tissue Northern Blot III": Am, Amygdala; NC, Nucleus Caudatus; CC, Corpus Callosum; Hi, Hippocampus; Ge, Gehirn; SN, Substantia Nigra; Th, Thalamus. **D)** "Human Brain Multiple Tissue Northern Blot II": Ce, Cerebellum; Co, Cerebraler Cortex; MO, Medulla Oblongata; Rü, Rückenmark; HI, Hinterhauptslappen; Stl, Stirnlappen; Scl, Schläfenlappen; Pu, Putamen.

Die Expressionsmuster von hHCN1 und hHCN4 zeigen deutliche Unterschiede. Während hHCN1 im gesamten Gehirn stark exprimiert wird, lassen sich Transkripte von hHCN4 nur in einigen Gehirnregionen, sowie im Herzen nachweisen. Durch die vorliegenden Northernblot-Analysen konnten Regionen identifiziert werden, in denen hHCN1 und hHCN4 als heterooligomere Komplexe vorliegen könnten. Um genauere Aussagen machen zu können, sollte die Expression auf zellulärer Ebene mit Hilfe von Antikörpern untersucht werden.

3.2 Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern gegen HCN-Kanäle

Bisherige Untersuchungen des Expressionsmusters von HCN-Kanälen waren auf den Nachweis von mRNA-Transkripten beschränkt (Ludwig et al., 1998; Santoro et al., 1998; Ishii et al., 1999; Ludwig et al., 1999; Moosmang et al., 1999; Seifert et al., 1999; Shi et al., 1999). Methoden wie z.B. "Northernblots", "RNase Protection Assays" oder "RT-PCRs" erlauben jedoch keine Lokalisation auf zellulärer Ebene. Auch mit *in situ*-Hybridisierungen kann man weder über die Ko-Expression verschiedener Gene in einer Zelle, noch über die subzelluläre Verteilung der Genprodukte genaue Aussagen machen. Um die Frage klären zu können, ob verschiedene Typen von HCN-Kanälen in einer Zelle ko-exprimiert werden und dabei eventuell heterooligomere Komplexe bilden, wurden poly- und monoklonale Antikörper gegen die verschiedenen HCN-Kanäle hergestellt.

3.2.1 Antigene zur Herstellung von Antikörpern gegen HCN-Kanäle

Bisher konnten vier verschiedene Gene für HCN-Kanäle in verschiedenen Säugetierspezies identifiziert werden (Übersicht: Santoro & Tibbs, 1999; Gauss & Seifert, 2000; Kaupp & Seifert, 2001). Gegen jeden dieser vier Typen sollten Antikörper hergestellt werden. Dabei mußten die Antikörper zwei Bedingungen erfüllen: Erstens sollte ein Antikörper nur einen HCN-Kanaltyp erkennen; d.h. ein Antikörper gegen HCN1 sollte nicht mit HCN2, HCN3 oder HCN4 (und natürlich auch nicht mit anderen Proteinen) kreuzreagieren. Zweitens sollte ein Antikörper einen HCN-Kanaltyp in mehreren Spezies erkennen.

Ein Sequenzvergleich der vier Typen von HCN-Kanälen (siehe Anhang 8.1) ergab, daß die beiden Bedingungen nur erfüllt werden können, wenn die Antikörper gegen den N- oder C-Terminus der Kanalproteine gerichtet sind. Die C-Termini der HCN-Kanäle sind für die Auswahl der Epitope geeigneter, da sie länger sind als die N-Termini. In Abb. 3.3 werden die C-terminalen Sequenzen der HCN-Kanäle aus Maus, Ratte und Mensch miteinander verglichen.

	———— cNMP-Bindestelle ————	
MHCN1	MMRRAFETVAIDRLDRIGKNSILLQKFQKDLNTGVFNQENEILKQIVKHDREMVQAIPINYPQMTALNCTSTTTPTSRMRTQSPPVYTATSLSHSN	666
RHCN1	MMRRAFETVAIDRLDRIGKNSILLQKFQKDLNTGVFNQENEILKQIVKHDREMVQAIPINYPQMTALNCTSTTTPTSRMRTQSPPVYTATSLSHSN	666
HHCN1	MMRRAFETVAIDRLDRIGKNSILLQKFQKDLNTGVFNQENEILKQIVKHDREMVQAIAIPINYPQMTTLNCTSTTTPTSRMRTQSPPVYTATSLSHSN	677
MHCN2	MMRRAFETVAIDRLDRIGKNSILLHKVQHDLSGVSFNNQENAI IQEIVKYDREMVQQAELGQRVGLFPPPPPP - QVTSIAIATLQQAAMSFQVQVARPL	718
RHCN2	MMRRAFETVAIDRLDRIGKNSILLHKVQHDLSGVSFNNQENAI IQEIVKYDREMVQQAELGQRVGLFPPPPPP - QVTSIAIATLQQAAMSFQVQVARPL	718
HHCN2	MMRRAFETVAIDRLDRIGKNSILLHKVQHDLSGVSFNNQENAI IQEIVKYDREMVQQAELGQRVGLFPPPPPPQVTSIAIATLQQAAMSFQVQVARPL	742
MHCN3	MMRRAFETVAMDRLLRRIGKNSILQKRSEPSGSGVMEQHLVQHDREMDARGVRLAPGTGARLSGKPVLEPLVHAPLQAAAVTSNVAIALTH	625
RHCN3	MMRRAFETVAMDRLLRRIGKNSILQKRSEPSGSGVMEQHLVQHDREMDARGVRLAPGTGARLSGKPVLEPLVHAPLQAAAVTSNVAIALTH	626
MHCN4	MMRRAFETVALDRLDRIGKNSILLHKVQHDLSGVSFNNQENEI IQIVRHREMAHCAHRVQAAAASATPTPTPIWTPLIQAAPLQAAAATTSVAIALTH	797
RHCN4	MMRRAFETVALDRLDRIGKNSILLHKVQHDLSGVSFNNQENEI IQIVRHREMAHCAHRVQAAAASATPTPTPIWTPLIQAAPLQAAAATTSVAIALTH	797
HHCN4	MMRRAFETVALDRLDRIGKNSILLHKVQHDLSGVSFNNQENEI IQIVRHREMAHCAHRVQAAAASATPTPTPIWTPLIQAAPLQAAAATTSVAIALTH	797

MHCN1	LHSPSPSTQTPQPSAILSPC SYTTAVCSPIQSPLATRTFHYASPTAS-----	714
RHCN1	LHSPSPSTQTPQPSAILSPC SYTTAVCSPIQSPLATRTFHYASPTAS-----	714
HHCN1	LHSPSPSTQTPQPSAILSPC SYTTAVCSPPVQSPLAARTFHYASPTAS-----	725
MHCN2	VGPLALGSPRLVRRAPPGPLPPAASPGPPA-ASPPAAPSSPRAPRTSPYGVPGSPATRVGPALPARRLSRAS-----	789
RHCN2	VGPLALGSPRLVRRAPPGPLPPAASPGPPA-ASPPAAPSSPRAPRTSPYGVPGSPATRVGPALPARRLSRAS-----	789
HHCN2	VGPLALGSPRLVRRAPPGPPAPAAASPGPPPASPPGAPASPRAPRTSPYGG-PAAPLAGPALPARRLSRAS-----	813
MHCN3	QRGPLELSPDSPAT LLARSARRSAGSPASPLVPVRAGPLLARGPWAST SRLPAPPARTLHASLSRTGRSQVSLGGPPPGGARRLGPGR-----	714
RHCN3	QRGPLELSPDSPAT LLARSARRSAGSPASPLVPVRAGPLLARGPWAST SRLPAPPARTLHASLSRTGRSQVSLGGPPPGGARRLGPGR-----	715
MHCN4	HPRLPAAI FRPPPGPLGNL GAGQTPRHPRRLQSLIPALGASPASSPSQVDT PSSSSFHI QQLAGFSAPPGLSPLLPSSSSSSPPPGACGSPAPTPTST	897
RHCN4	HPRLPAAI FRPPPGPLGNL GAGQTPRHPRRLQSLIPALGASPASSPSQVDT PSSSSFHI QQLAGFSAPPGLSPLLPSSSSSSPPPGACGSPAPTPTST	897
HHCN4	HPRLPAAI FRPPPGSGLGNL GAGQTPRHRLKRLQSLIPALGASPASSPSQVDT PSSSSFHI QQLAGFSAPPGLSPLLPSSSSSSPPPGACGSPAPTPTSA	897
MHCN1	-----QLSLMQQPQQQLPQSQVQQTQTQTQTTQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPQTGSSSTPKNEVH	789
RHCN1	-----QLSLMQQPQPQLQQSQVQQTQTQTQTTQQQQQQQQPQPQPQPQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPQTGSSSTPKNEVH	789
HHCN1	-----QLSLMQQPQQVQQSQVQPQTQPQQPSQ-----PQTGSSSTPKNEVH	768
MHCN2	-----	789
RHCN2	-----	789
HHCN2	-----	813
MHCN3	-----	714
RHCN3	-----	715
MHCN4	STAAASTTGGFHFHKGALGGSLSSSDSPLLTPLQPGARSPQAAQPPPLPGARGGLGLEHFLPPPPSSRSPSSSPGQLGQPPGELSGLAAGPSTPET	997
RHCN4	STAAT- TTGGFHFHKGALGGSLSSSDSPLLTPLQPGARSPQAAQPPPLPGARGGLGLEHFLPPPPSSRSPSSSPGQLGQPPGELSGLAAGPSTPET	995
HHCN4	GVAATT- IAGFHFHKGALGGSLSSSDSPLLTPLQPGARSPQAAQPSAPPARGGLGLEHFLPPPPSSRSPSSSPGQLGQPPGELSGLATGPLSTPET	996
MHCN1	KSTQALHNTNLTKEV-----RPLSASQPSLPHE	817
RHCN1	KSTQALHNTNLTREV-----RPLSASQPSLPHE	817
HHCN1	KSTQALHNTNLTREV-----RPLSASQPSLPHE	796
MHCN2	-----RPLSASQPSLPHG	802
RHCN2	-----RPLSASQPSLPHG	802
HHCN2	-----RPLSASQPSLPHG	826
MHCN3	-----RPLSASQPSLPQR	727
RHCN3	-----RPLSASQPSLPQR	728
MHCN4	PPR- PERPSFMAGASGGASPVAF TPRGGLSPPGHSPGPRTFPSPAPPRASG SHGSLLLPPASSPPPPQVQVQRRGTPPLTPGRLTQDL KLISASQPALQD	1096
RHCN4	PPR- PERPSFMAGASGGASPVAF TPRGGLSPPGHSPGPRTFPSPAPPRASG SHGSLLLPPASSPPPPQVQVQRRGTPPLTPGRLTQDL KLISASQPALQD	1094
HHCN4	PPRQPEPPLVAGASGGASPVGFTPRGGLSPPGHSPGPRTFPSPAPPRASG SHGSLLLPPASSPPPPQVQVQRRGTPPLTPGRLTQDL KLISASQPALQD	1096
MHCN1	VSTLISRPHP-TVGESLASIP-----QPVAHVSTGLQAGSRSTVPQVTLFRQMSSGAIPPNRGVPPAPPPPPAA-VQRESPSVLNTPDAE	902
RHCN1	VSTMISRPHP-TVGESLASIP-----QPVAHVSTGLQAGSRSTVPQVTLFRQMSSGAIPPNRGVPPAPPPPPAA-VQRESPSVLNTPDAE	902
HHCN1	VSTLISRPHP-TVGESLASIP-----QPVTAVPGTGLQAGGRSTVPQVTLFRQMSSGAIPPNRGVPPAPPPPPAAALPRESSSVLNTDPAE	882
MHCN2	VPAPSPAASARPASSSTPRLG-----PAPTARTAAPSPDRRDSASPGAASGLDPLDSA	855
RHCN2	APAPSPAASARPASSSTPRLG-----PAPTTRTAAPSPDRRDSASPGAASGLDPLDSA	855
HHCN2	--APGPAASTRPASSSTPRLG-----PTPAARAAAPSPDRRDSASPGAAGGLDPLDSA	877
MHCN3	ATGDGSPRRKGSGERLPPSG-----LLAKPPGTVPQPRSSVPEPVTTPR	771
RHCN3	ATGDGSPRRKGSGERLPPSG-----LLAKPPGTVPQPRSSVPEPVTTPR	772
MHCN4	GAQTLRRASPHSSGESVAAFSLYPRAGGGSG---SSGGLGPPGRPYGAIPGQHVTLPRKTS SSGSLPPPLSLFGARAASSGGPPLTTAAPQREPGARSEPV	1193
RHCN4	GAQTLRRASPHSSGESMAAFSLYPRAGGGSG---SSGGLGPPGRPYGAIPGQHVTLPRKTS SSGSLPPPLSLFGARAASSGGPPLT-AAPQREPGARSEPV	1190
HHCN4	GAQTLRRASPHSSGESMAAFPLFRAGGGSGSGSSGGLGPPGRPYGAIPGQHVTLPRKTS SSGSLPPPLSLFGARATSSGGPPLT-AGPQREPGARPEPV	1195
MHCN1	KPRFASNL	910
RHCN1	KPRFASNL	910
HHCN1	KPRFASNL	890
MHCN2	RSRLSSNL	863
RHCN2	RSRLSSNL	863
HHCN2	RSRLSSNL	885
MHCN3	GPQISANM	779
RHCN3	GPQISANM	780
MHCN4	RSKLPSNL	1201
RHCN4	RSKLPSNL	1198
HHCN4	RSKLPSNL	1203

Abb. 3.3: Aminosäuresequenzvergleich der C-Termini aller HCN-Kanaltypen aus Maus, Ratte und Mensch. Der Sequenzvergleich wurde zunächst mit dem Programm MULTALIN (Corpet, 1988) anhand der Dayhoff-Matrix durchgeführt und anschließend optimiert. Optimierende Lücken sind durch Bindestriche markiert. Der letzte Abschnitt der Bindestelle für zyklische Nukleotide (cNMP-Bindestelle) ist durch eine Linie über der Sequenz gekennzeichnet. Die Sequenzen der Peptide RTQ (HCN1), QQA (HCN2), TLL (HCN3) und SHG (HCN4), die zur Herstellung der Antikörper verwendet wurden, sind fett gedruckt. Der Abschnitt aus rHCN1, der als Fusionsprotein MBP-IHR zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern verwendet wurde, ist kursiv gedruckt. Die Sequenz hHCN3 fehlt, da noch keine vollständige cDNA-Sequenz bekannt ist.

Zur Herstellung der Antikörper wurden hauptsächlich Peptide als Antigene verwendet. Die Sequenzen der Peptide sind in Abb. 3.3 hervorgehoben. Außerdem wurde ein MBP-Fusionsprotein als Antigen verwendet, welches einen Abschnitt des C-Terminus von rHCN1 (Aminosäureposition 775 bis 910) enthält. Dabei wurde in Kauf genommen, daß die Aminosäuresequenzen für diesen Abschnitt zwischen den verschiedenen Spezies nicht vollkommen identisch sind. Tab. 3.1 gibt eine Übersicht über die verwendeten Antigene, deren Position im Kanalprotein und die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen zwischen den verschiedenen Spezies.

Bezeichnung des Antigens (Art des Antigens)	gerichtet gegen HCN-Kanal	Aminosäureposition des Epitops (Identität der Aminosäuresequenzen)
RTQ (Peptid)	HCN1	<u>mHCN1</u> : AS 650 - 685 (100%) <u>rHCN1</u> : AS 650 - 685 (100%) <u>hHCN1</u> : AS 661 - 696 (100%)
MBP-IHR (Fusionsprotein)	HCN1	mHCN1 : AS 776 - 910 (96%) <u>rHCN1</u> : AS 775 - 910 (100%) hHCN1 : AS 755 - 890 (91%)
QQA (Peptid)	HCN2	mHCN2 : AS 676 - 710 (94%) rHCN2 : AS 676 - 710 (94%) <u>hHCN2</u> : AS 699 - 734 (100%)
TLL (Peptid)	HCN3	<u>mHCN3</u> : AS 639 - 674 (100%) <u>rHCN3</u> : AS 640 - 675 (100%) hHCN3 : Partialklon
SHG (Peptid)	HCN4	mHCN4 : AS 1048 - 1083 (100%) rHCN4 : AS 1046 - 1081 (100%) <u>hHCN4</u> : AS 1048 - 1083 (100%)

Tab. 3.1: Übersicht über die zur Herstellung von Antikörpern verwendeten Antigene. Angegeben ist die Bezeichnung und Art des Antigens, der Typ von HCN-Kanal, gegen den die entsprechenden Antikörper gerichtet sind, die Aminosäureposition des Epitops im Kanalprotein und die Identität der Aminosäuresequenzen innerhalb der verschiedenen Spezies. Die HCN-Kanäle, deren Aminosäuresequenz bei der Planung der Peptide bekannt waren, sind unterstrichen. Das Fusionsprotein MBP-IHR beinhaltet einen C-terminalen Abschnitt des Kanalproteins rHCN1. Vom hHCN3-Gen ist bislang nur eine genomische Teilsequenz bekannt, welche die Peptidsequenz TLL nicht beinhaltet; daher kann weder die Aminosäureposition des Peptids, noch die Identität der Aminosäuresequenz angegeben werden.

Die als Antigene verwendeten Peptide (s. Tab. 3.1) RTQ (HCN1), QQA (HCN2), TLL (HCN3) und SHG (HCN4) haben je eine Länge von 43 Aminosäuren. Jedes Peptid besitzt N-terminal ein Cystein, um eine Kopplung an ein Trägerprotein über die Thiol-Gruppe der Aminosäure zu ermöglichen; ein weiteres Cystein ist in den Peptidsequenzen nicht enthalten. Dem Cystein folgen sechs Aminosäuren (GSSHHH), die als Marker zum immunologischen

Nachweis der Peptide verwendet werden können. Bei den restlichen 36 Aminosäuren handelt es sich um spezifische Sequenzen der HCN-Kanäle, die in Abb. 3.3 hervorgehoben sind. Die ersten drei Aminosäuren der spezifischen Sequenz dienen jeweils der Bezeichnung der Antigene.

Die Peptide wurden über 3-Maleimidobenzoyl-N-hydroxy-succinimidester (MBS) an das Trägerprotein KLH gekoppelt (s. 2.16.1.1) und zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern verwendet (3.2.3). Die gekoppelten Peptide RTQ (HCN1) und SHG (HCN4) wurden außerdem zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern verwendet (3.2.2). Zum Test einer anderen Kopplungsmethode wurde das Peptid SHG über Glutaraldehyd (GA) an das Trägerprotein KLH gekoppelt (2.16.1.2) und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet (3.2.2).

Als Alternative zum Peptid RTQ wurde das MBP-Fusionsprotein IHR als Antigen zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern verwendet. Es enthält einen C-terminalen Abschnitt von rHCN1 (Aminosäureposition 775 bis 910). Die Peptidsequenz RTQ ist nicht in diesem Abschnitt enthalten, so daß auf jeden Fall unabhängige Antikörper produziert werden konnten. Das Fusionsprotein wurde folgendermaßen hergestellt: Mit der Primerkombination #2119/#2120 und dem Klon pB-ROCNC1-1 als Matrizen-DNA wurde eine PCR (2.7) durchgeführt. Der Klon wurde mir freundlicherweise von Dr. W. Bönigk (IBI-1, Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt. Das amplifizierte PCR-Fragment wurde phosphoryliert (2.5.2.2), mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XbaI geschnitten und in einen EcoRI/XbaI-geschnittenen pMal c2X-Vektor kloniert (2.5.3). Auf diese Weise wurde das Fragment so an das 3'-Ende des MBP-kodierenden Bereichs kloniert, daß der Leserahmen erhalten blieb. Das MBP-Fusionsprotein (MBP-IHR) wurde in Bakterien exprimiert (2.2.3.3 und 2.17.1) und durch Amylose-Affinitätschromatographie aufgereinigt (2.17.2). Das gereinigte MBP-Fusionproteine wurde zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern verwendet (3.2.3).

3.2.2 Herstellung, Test und Reinigung von polyklonalen Antikörpern

Zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen HCN1 und HCN4 wurden die Peptide RTQ bzw. SHG als Antigene verwendet (3.2.1). Insgesamt wurden sechs Kaninchen wie unter 2.17.1 beschrieben immunisiert. Tab. 3.2 zeigt das Schema der Immunisierung:

Nummer der Kaninchen	verwendetes Peptid	Kopplung über
#63	RTQ	MBS
#68		
#73	SHG	MBS
#76		
#64	SHG	GA
#74		

Tab. 3.2: Schema der Immunisierung von Kaninchen zur Herstellung polyklonaler Antikörper.

Um den Verlauf der Immunantwort zu verfolgen, wurde den Tieren in regelmäßigen Abständen von zwei Wochen Blut entnommen. Die aus dem Blut gewonnenen Seren (2.17.1) wurden durch Westernblot-Analysen (2.14) auf spezifische Antikörper getestet. Die Tests erfolgten mit Membranproteinen von transfizierten HEK 293-Zellen. Diese Zellen exprimierten HCN-Kanalproteine, die C-terminal mit einem Abschnitt aus dem Protein Hämagglutinin (HA) markiert waren (siehe Anhang 8.1). Diese Markierung ermöglicht den immunologischen Nachweis der Proteine durch den Antikörper rat- α HA High Affinity ("rat- α HA"; Roche). Die polyklonalen Antiseren PPc63K (HCN1), bzw. PPc64K, PPc73K, PPc74K und PPc76K (HCN4) erkennen jeweils das gleiche Protein wie der Antikörper rat- α HA. Die Präimmunsere der Kaninchen erkennen diese Proteine nicht. Die besten Antikörper gegen HCN1, bzw. HCN4 (PPc63K und PPc73K) wurden affinitätschromatographisch aus den Seren der Kaninchen gereinigt (2.17.2) und durch Westernblot-Analysen (2.14) und immunzytochemische Methoden (2.15) weiter charakterisiert. Die Charakterisierung der gereinigten Antikörper wird im Abschnitt 3.2.4 beschrieben.

3.2.3 Herstellung und Test von monoklonalen Antikörpern

Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. E. Kremmer vom Institut für molekulare Immunologie (GSF München). Als Antigene wurden die Peptide RTQ, QQA, TLL und SHG (3.2.1), sowie das MBP-Fusionsprotein IHR (3.2.1) verwendet. Die Immunisierung von Ratten und die Herstellung von Hybridomen erfolgte wie unter 2.16.3 beschrieben. Die Kulturüberstände der daraus resultierenden primären Hybridome (im weiteren als Primärkulturüberstände bezeichnet) enthalten Antikörper, die durch Westernblot-Analysen (2.14) auf ihre Spezifität getestet wurden. Die Tests erfolgten mit Membranproteinen von transfizierten HEK 293-Zellen, die HA-markierte Kanalproteine

exprimierten (siehe Anhang 8.1). Abb. 3.4 zeigt beispielhaft einen Spezifitätstest von Primärkulturüberständen gegen HCN4. Die Antikörper PPc73K (Spur 1) und rat- α HA (Spur 2) detektieren das Kanalprotein hHCN4-HA bei ca. 130 kDa. Vier der getesteten 20 Primärkulturüberstände (Spuren 4-23) erkennen das gleiche Bandenmuster. Es handelt sich dabei um die Überstände SHG-4A8 (Spur 9), SHG-2B12 (Spur 14), SHG-1E7 (Spur 19) und SHG-1E5 (Spur 20).

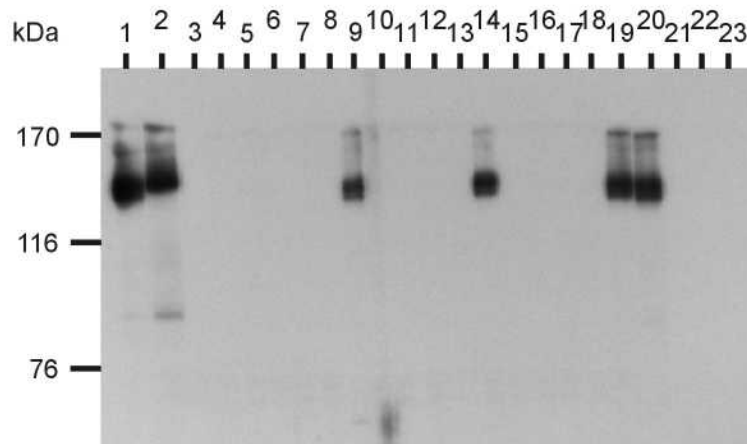


Abb. 3.4: Test von Primärkulturüberständen gegen HCN4 mit Hilfe der Westernblot-Technik. Es wurden je 3 μ g Membranproteine von hHCN4-HA-exprimierenden HEK 293-Zellen mit Hilfe eines 7,5 %igen SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Der immunologische Nachweis erfolgte durch die zu testenden Primärkulturüberstände. Als Positivkontrollen wurden die Antikörper PPc73K und rat- α HA (Roche) verwendet. Als Negativkontrolle wurde ein Membranstreifen nur mit dem 2. Antikörper inkubiert. Links sind die Molekulargewichte des Größenstandards in kDa angegeben. Spur 1: PPc73K (1:600); Spur 2: rat- α HA, (1:2.000); Spur 3: Negativkontrolle; Spur 4: SHG-4C11; Spur 5: SHG-4C10; Spur 6: SHG-4B12; Spur 7: SHG-4B11; Spur 8: SHG-4A9; Spur 9: SHG-4A8; Spur 10: SHG-3E3; Spur 11: SHG-3D11; Spur 12: SHG-3B4; Spur 13: SHG-2C3; Spur 14: SHG-2B12; Spur 15: SHG-2B11; Spur 16: SHG-2A10; Spur 17: SHG-1H5; Spur 18: SHG-1G5; Spur 19: SHG-1E7; Spur 20: SHG-1E5; Spur 21: SHG-1C12; Spur 22: SHG-1C9; Spur 23: SHG-1A1. Alle Primärüberstände wurden in einer 1:40-Verdünnung eingesetzt.

Auf diese Weise wurden Hybridome identifiziert, deren Primärkulturüberstände spezifische Antikörper gegen einen Typ von HCN-Kanal enthalten. Durch Reklonierung (2.16.3) dieser Hybridome wurden die Einzelklone gewonnen, deren Überstände die eigentlichen monoklonalen Antikörper enthalten. Zur Vereinfachung werden die Überstände dieser Reinkulturen im weiteren Verlauf als monoklonale Antikörper bezeichnet. In Tab. 3.3 sind alle produzierten monoklonalen Antikörper aufgelistet. Die genauere Charakterisierung wird im Abschnitt 3.2.4 beschrieben.

3.2.4 Charakterisierung der poly- und monoklonalen Antikörper an transfizierten HEK 293-Zellen

Insgesamt wurden 20 poly- und monoklonale Antikörper gegen HCN-Kanäle hergestellt. Dabei sind fünf spezifisch für HCN1, drei erkennen HCN2, vier sind gegen HCN3 gerichtet und acht Antikörper sind zum Nachweis von HCN4 geeignet. Tab. 3.3 gibt eine Übersicht über die produzierten Antikörper.

Antikörper	verwendetes Antigen	hergestellt in	Antikörperart (Ig-Subklasse)
HCN1-Antikörper			
PPc63K (gereinigt)	Peptid RTQ	Kaninchen	polyklonal
IHR-2G4	Fusionsprotein IHR	Ratte	monoklonal (IgM)
IHR-6C10	Fusionsprotein IHR	Ratte	monoklonal (IgG2a)
RTQ-7C3	Peptid RTQ	Ratte	monoklonal (IgG1)
RTQ-8D12	Peptid RTQ	Ratte	monoklonal (IgG1)
HCN2-Antikörper			
QQA-1A6	Peptid QQA	Ratte	monoklonal (IgG1)
QQA-3G7	Peptid QQA	Ratte	monoklonal (IgG1)
QQA-4A6	Peptid QQA	Ratte	monoklonal (IgG1)
HCN3-Antikörper			
TLL-4D9	Peptid TLL	Ratte	monoklonal (IgM)
TLL-4F6	Peptid TLL	Ratte	monoklonal (IgG2b)
TLL-6C5	Peptid TLL	Ratte	monoklonal (IgG1)
TLL-7H7	Peptid TLL	Ratte	monoklonal (IgG2a)
HCN4-Antikörper			
PPc64K	Peptid SHG	Kaninchen	polyklonal
PPc73K (gereinigt)	Peptid SHG	Kaninchen	polyklonal
PPc74K	Peptid SHG	Kaninchen	polyklonal
PPc76K	Peptid SHG	Kaninchen	polyklonal
SHG-1E5	Peptid SHG	Ratte	monoklonal (IgG1)
SHG-1E7	Peptid SHG	Ratte	monoklonal (IgG1)
SHG-2B12	Peptid SHG	Ratte	monoklonal (IgG1)
SHG-4A8	Peptid SHG	Ratte	monoklonal (IgG1)

Tab. 3.3: Übersicht über die produzierten Antikörper gegen HCN-Kanäle. Die Tabelle zeigt, mit welchem Antigen und in welchem Tier der jeweilige Antikörper hergestellt worden ist. Bei monoklonalen Antikörpern ist außerdem noch die Ig-Subklasse angegeben. Die polyklonalen Antikörper PPc63K und PPc73K wurden affinitätschromatographisch aus den Seren der Kaninchen gereinigt und charakterisiert.

Mit den produzierten Antikörpern sollte die Expression von HCN-Kanälen in der Rattenretina (3.3), sowie im Ratten- und Mausgehirn (3.4) untersucht werden. Diese Untersuchungen sollten mit Hilfe der Westernblot-Technik (2.14) und immunhistochemischer Methoden (2.15) durchgeführt werden. Um herauszufinden, ob die Antikörper für diese Zwecke geeignet sind, wurden sie zunächst an transfizierten HEK 293-Zellen charakterisiert.

3.2.4.1 Westernblot-Analysen an transfizierten HEK 293-Zellen

Für die Westernblot-Analysen wurden HEK 293-Zellen mit den Klonen pcA-rHCN1, pcA-rHCN2, bzw. pcA-rHCN3 (Abschnitt 8.5) transfiziert (2.9.2). Als Negativkontrolle wurden HEK 293-Zellen mit pcDNA I Amp bzw. ohne DNA (Mock-Kontrollen) transfiziert. Bei den Antikörpern gegen HCN4 wurde die stabile Zelllinie HEK 293-Flp-hHCN4 (2.9) bzw. als Negativkontrolle der Wildtyp HEK 293-FlpIn verwendet. Die Membranproteine wurden präpariert (2.10.1), durch SDS-PAGE (2.13) aufgetrennt und auf PVDF-Membranen immobilisiert (2.14.1). Der immunologische Nachweis der immobilisierten Membranproteine erfolgte wie unter 2.14.2 beschrieben. In Abb. 3.5 sind die Westernblot-Analysen der gereinigten polyklonalen Antikörper PPc63K und PPc73K, sowie aller monoklonaler Antikörper gezeigt.

HCN1:

In rHCN1-exprimierenden HEK 293-Zellen erkennen die HCN1-Antikörper ein einzelnes ca. 102 kDa großes Protein (Abb. 3.5 A), das in Mock-transfizierten HEK 293-Zellen nicht exprimiert wird. Die Größe des heterolog exprimierten Proteins ist identisch mit dem aus der Aminosäuresequenz berechneten Molekulargewicht von rHCN1. Werden größere Mengen an heterolog exprimierten Membranproteinen für die SDS-PAGE eingesetzt, erkennen die Antikörper auf transfizierten HEK 293-Zellen noch eine zweite Bande knapp über der 102 kDa-Bande und eine dritte, diffusere Bande bei ca. 120 kDa (nicht gezeigt). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um glykosylierte Formen des Kanalproteins (siehe dazu Abschnitt 3.3.1).

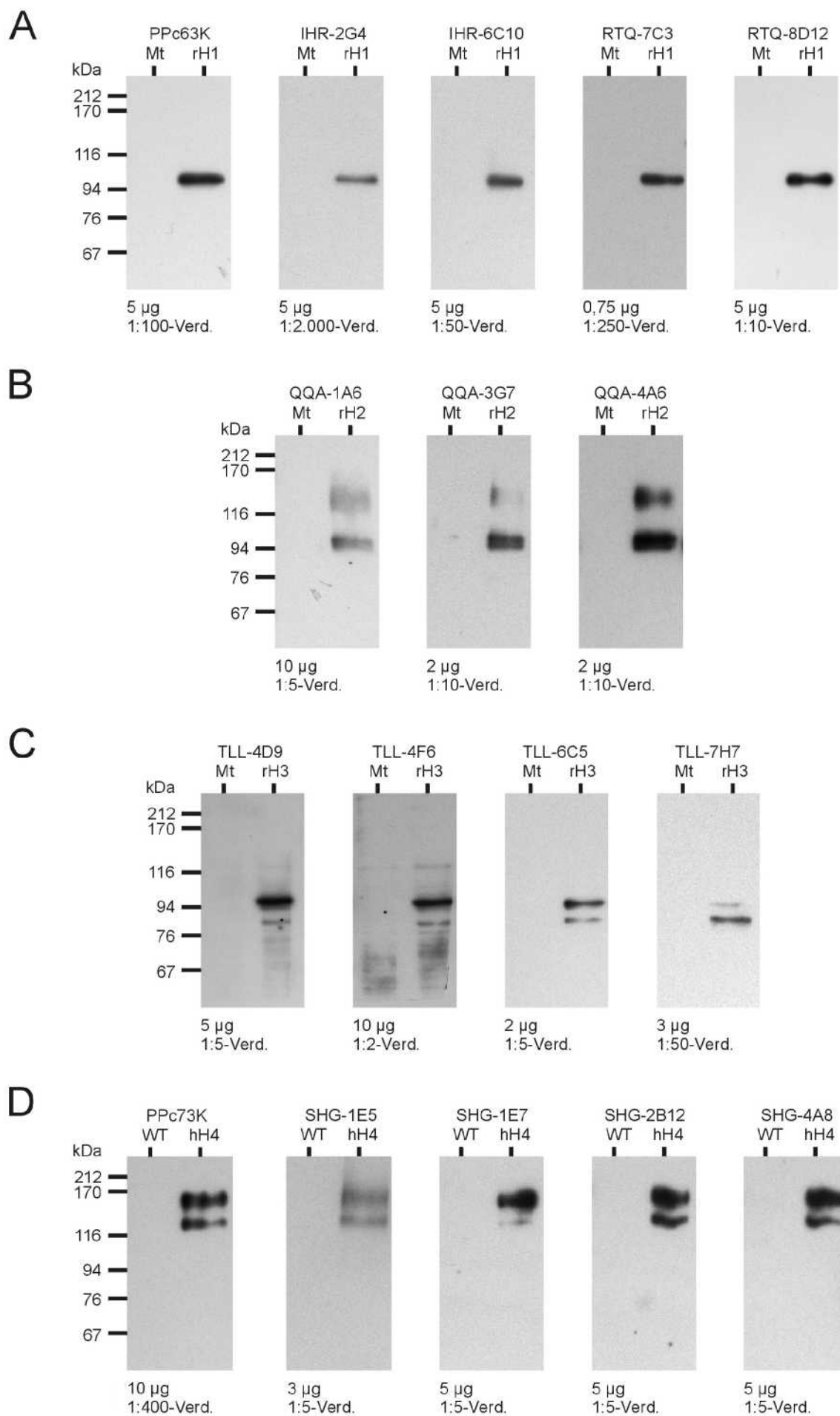


Abb. 3.5: Charakterisierung der Antikörper auf heterolog exprimierten Membranproteinen mit Hilfe der Westernblot-Technik. Die Membranproteine wurden mit Hilfe von 7,5 %igen SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und auf PVDF-Membranen immobilisiert. Die eingesetzten Mengen von Membranproteinen und die verwendeten Antikörper-Verdünnungen sind unter der jeweiligen Abbildung angegeben. Der immunologische Nachweis erfolgte durch Antikörper gegen HCN1 (A), HCN2 (B), HCN3 (C) bzw. HCN4 (D). Links sind die Molekulargewichte der Größenstandards in kDa angegeben. Mt: Mock-transfizierte Zellen; WT: Wildtyp-Zellen HEK 293-FlpIn; rH1: pcA-rHCN1-transfizierte Zellen; rH2: pcA-rHCN2-transfizierte Zellen; rH3: pcA-rHCN3-transfizierte Zellen; hH4: Zelllinie HEK 293-Flp-hHCN4.

HCN2:

In HEK 293-Zellen, die mit pcA-rHCN2 transfiziert worden sind, erkennen die HCN2-Antikörper eine Doppelbande bei 98 kDa und eine diffusere Bande um die 120 kDa (Abb. 3.5 B). Die Größe der untersten Bande liegt nahe dem errechneten Molekulargewicht von 95 kDa. Auch hier ist anzunehmen, daß es sich bei den größeren Proteinen um glykosylierte Formen von rHCN2 handelt (3.3.1). In den Mock-transfizierten Zellen wird keine Bande detektiert.

HCN3:

Die HCN3-Antikörper erkennen in transfizierten HEK 293-Zellen zwei Proteine mit einer Größe von 88 kDa und 95 kDa (Abb. 3.5 C). Das kleinere Protein entspricht damit dem errechneten Molekulargewicht von rHCN3. In Abschnitt 3.3.1 wird untersucht werden, ob es sich bei dem 95 kDa-Protein um eine glykosylierte Form des Kanalproteins handelt. Keine der beiden Banden wird in Mock-transfizierten HEK 293-Zellen detektiert.

HCN4:

In Präparationen von Membranproteinen aus HEK 293-Zellen, die hHCN4 exprimieren, erkennen die HCN4-Antikörper eine Bande bei 132 kDa und eine diffusere Bande von ca. 160 kDa (Abb. 3.5 D), bei der es sich um den glykosylierten hHCN4-Kanal handeln könnte (3.3.1). Keine dieser Banden kann in Membranpräparationen von Mock-transfizierten HEK 293-Zellen bzw. vom Wildtyp HEK 293-FlpIn beobachtet werden.

Um nachzuweisen, daß die Antikörper jeweils nur einen Typ von HCN-Kanal erkennen, wurden die Antikörper auch auf Membranproteinen von HEK 293-Zellen getestet, die mit einem der drei anderen HCN-Kanaltypen transfiziert worden waren. Keiner der Antikörper kreuzreagierte dabei mit einem anderen HCN-Kanaltyp.

Alle 17 getesteten Antikörper sind also zum immunologischen Nachweis von HCN-Kanälen im Westernblot geeignet. Es ist damit zum ersten Mal gelungen, Antikörper gegen alle vier Typen von HCN-Kanälen herzustellen. Durch Westernblot-Analysen kann nun untersucht werden, ob sich die nativen HCN-Kanäle von den heterolog exprimierten Kanalproteinen

unterscheiden. Durch immunhistochemische Färbungen kann das Expressionsmuster aller vier HCN-Kanäle bis zur subzellulären Ebene untersucht werden. Diese Untersuchungen können genauere Hinweise darauf geben, ob HCN-Kanäle *in vivo* als homo- oder heterooligomere Komplexe vorliegen.

3.2.4.2 Immunzytochemische Analysen an transfizierten HEK 293-Zellen

Um zu überprüfen, ob die Antikörper für die Immunhistochemie geeignet sind, wurden sie zunächst an HEK 293-Zellen getestet. Zu diesem Zweck wurden HEK 293-Zellen mit den Klonen pcA-rHCN1, pcA-rHCN2, pcA-rHCN3 bzw. pcA-hHCN4 (Abschnitt 8.5) transfiziert (2.9.2), mit Paraformaldehyd fixiert und die heterolog exprimierten Membranproteine immunologisch nachgewiesen (2.15.1). Abb. 3.6 zeigt beispielhaft die Färbung von HEK 293-Zellen mit dem monoklonalen Antikörper SHG-1E5. Mock-transfizierte Zellen (Abb. 3.6 A) weisen keine Färbung auf, während ca. 25 % der mit pcA-hHCN4 transfizierten Zellen (Abb. 3.6 B) stark angefärbt werden.

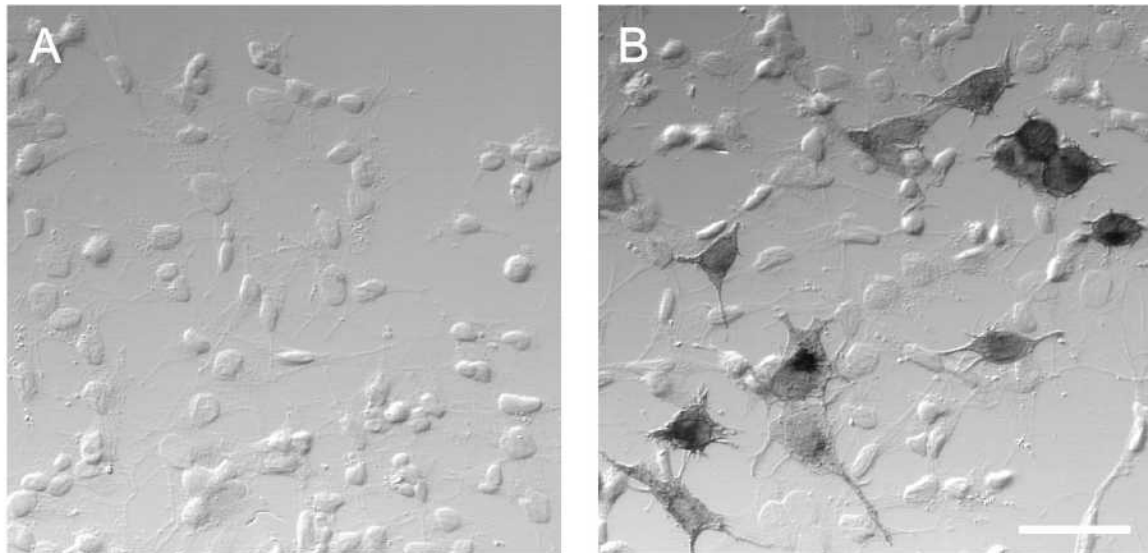


Abb. 3.6: Immunzytochemische Färbung von HEK 293-Zellen mit dem Antikörper SHG-1E5. HEK 293-Zellen wurden ohne DNA (Mock-Kontrolle; A) bzw. mit pcA-hHCN4 (B) transfiziert. Der Antikörper SHG-1E5 wurde jeweils in einer Verdünnung von 1:5 eingesetzt. Der Balken in B entspricht 50 µm.

Tab. 3.4 faßt die Ergebnisse der immunzytochemischen Analysen aller 17 getesteter Antikörper zusammen. Mit Ausnahme des polyklonalen Antikörpers PPc63K (HCN1) und des monoklonalen Antikörpers TLL-4F6 (HCN3) sind alle getesteten Antikörper für die Immunzytochemie geeignet. PPc63K färbt in einer Verdünnung von 1:10 sowohl

pcA-rHCN1-, als auch Mock-transfizierte HEK 293-Zellen an. Die unspezifische Färbung wird zwar bei höheren Verdünnungen schwächer, allerdings liegt auch unter diesen Bedingungen die spezifische Färbung nicht deutlich über der Hintergrundfärbung. Die Färbungen mit TLL-4F6 sind ebenfalls so schwach, daß man keine rHCN3-transfizierten HEK 293-Zellen identifizieren kann. Bei diesem Antikörper liegt das Problem wahrscheinlich darin, daß es keine geeigneten sekundären Antikörper gibt, welche die Ig-Subklasse von TLL-4F6 (IgG2b; Tab. 3.3) gut erkennen.

Antikörper	Verdünnung	spezifische Färbung	Anmerkungen
HCN1-Antikörper (getestet auf pcA-rHCN1-transfizierten Zellen)			
PPc63K	1:10	nein	färbt auch Mock-transfizierte Zellen
IHR-2G4	1:50	ja	
IHR-6C10	1:10	ja	
RTQ-7C3	1:100	ja	
RTQ-8D12	1:5	ja	
HCN2-Antikörper (getestet auf pcA-rHCN2-transfizierten Zellen)			
QQA-1A6	1:5	ja	
QQA-3G7	1:5	ja	
QQA-4A6	1:5	ja	
HCN3-Antikörper (getestet auf pcA-rHCN3-transfizierten Zellen)			
TLL-4D9	1:5	ja	
TLL-4F6	1:5	nein	färbt weder transfizierte, noch Mock-transfizierte Zellen
TLL-6C5	1:5	ja	
TLL-7H7	1:5	ja	
HCN4-Antikörper (getestet auf pcA-hHCN4-transfizierten Zellen)			
PPc73K	1:400	ja	
SHG-1E5	1:5	ja	
SHG-1E7	1:5	ja	
SHG-2B12	1:5	ja	
SHG-4A8	1:5	ja	

Tab. 3.4: Charakterisierung der Antikörper mit Hilfe von transfizierten HEK 293-Zellen durch immunzytochemische Färbungen. Die Tabelle gibt an, in welcher Verdünnung die Antikörper für Zellfärbungen eingesetzt wurden, und ob eine spezifische Zellfärbung beobachtet werden konnte.

3.3 Charakterisierung der HCN-Kanäle in der Rattenretina

Elektrophysiologische Messungen von HCN-Strömen und Untersuchungen zur Expression der HCN-Kanalgene ergaben, daß HCN-Kanäle im Zentralnervensystem (ZNS) der Säugetiere weit verbreitet sind (Übersicht: Pape, 1996; Santoro & Tibbs, 1999; Gauss & Seifert, 2000; Kaupp & Seifert, 2001). Die Retina entsteht in der Embryonalentwicklung als Ausstülpung des Zwischenhirns und ist somit ein Teil des ZNS. Es handelt sich dabei um ein ca. 200 µm dickes Nervengewebe, das den Augenhintergrund auskleidet. Die Retina ist für immunhistochemische Untersuchungen sehr gut geeignet, da sie anatomisch klar geschichtet ist und sich die verschiedenen Zelltypen gut identifizieren lassen. Elektrophysiologische Untersuchungen (Karschin & Wässle, 1990) deuten darauf hin, daß HCN-Kanalproteine auch in der Rattenretina vorkommen.

3.3.1 Westernblot-Analysen mit Membranproteinen der Rattenretina

Mit Hilfe der Westernblot-Technik wurde untersucht, welche HCN-Kanaltypen in der Rattenretina exprimiert werden, und welche Modifikationen die Kanalproteine eventuell erfahren. Dafür wurden Membranproteine isoliert (2.10), durch Gelelektrophorese aufgetrennt (2.13) und auf PVDF-Membranen immobilisiert (2.14.1). Der immunologische Nachweis erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen den jeweiligen HCN-Kanaltyp. Zur Kontrolle wurden die in der Rattenretina detektierten Proteine mit den HCN-Kanalproteinen aus transfizierten HEK 293-Zellen verglichen.

Da aufgrund der bisherigen Westernblot-Experimente (Abschnitt 3.2.4.1) bereits vermutet wurde, daß die HCN-Kanäle glykosyliert sein könnten, wurden Membranproteine deglykosyliert (2.12.2). Es wurde jeweils eine unbehandelte und eine deglykosylierte Probe nebeneinander aufgetragen. Abb. 3.7 zeigt die Westernblot-Analysen mit Membranproteinen von transfizierten HEK 293-Zellen und der Rattenretina.

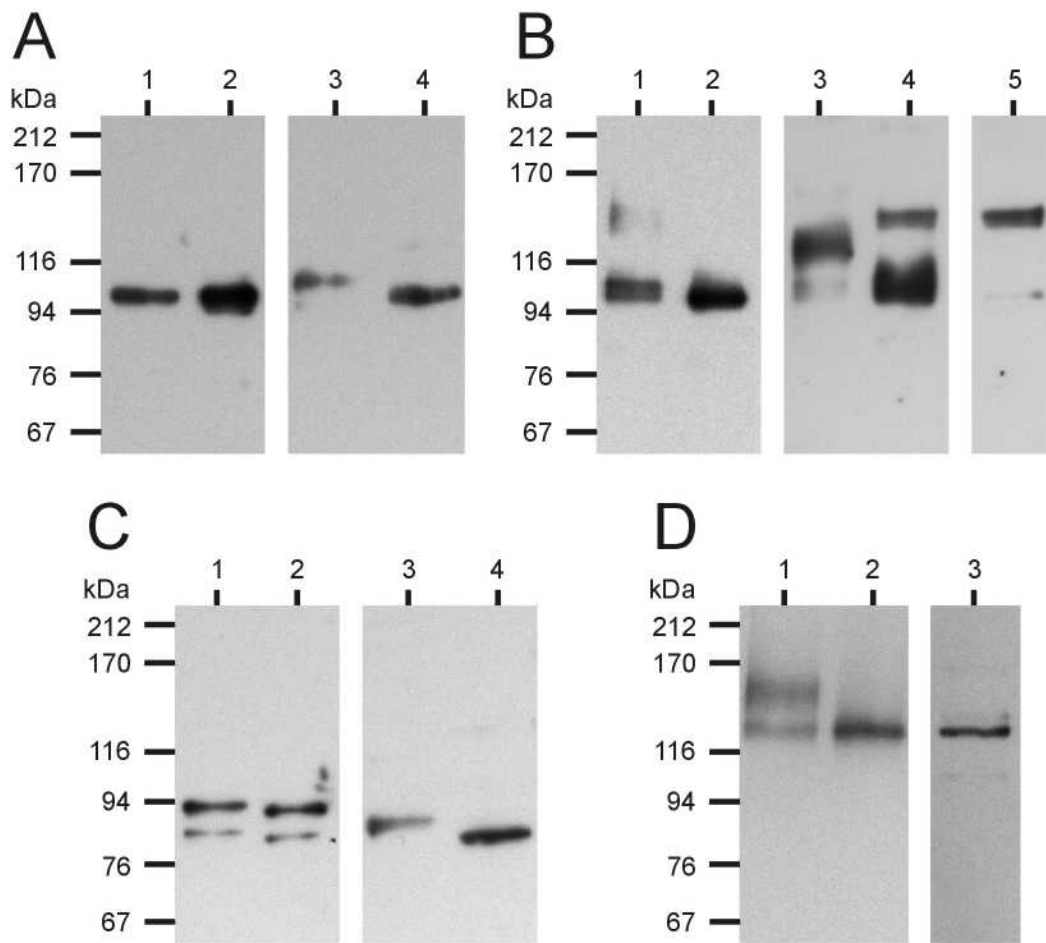


Abb. 3.7: Westernblot-Analysen der HCN-Kanäle in transfizierten HEK 293-Zellen und der Rattenretina.

Die Membranproteine wurden mit Hilfe von 7,5 %igen SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und auf PVDF-Membranen immobilisiert. Die nicht-deglykosylierten Proben wurden in den gleichen Puffern aufgenommen und behandelt wie die deglykosylierten Proben; anstatt des Enzyms PNGase F wurde jedoch H_2O zugegeben. **A)** HCN1: Aufgetragen waren 0,75 µg Membranproteine aus transfizierten HEK 293-Zellen (Spuren 1 und 2), bzw. 50 µg Membranproteine aus der Rattenretina (Spuren 3 und 4). In den Spuren 1 und 3 waren die unbehandelten, in den Spuren 2 und 4 die deglykosylierten Proben aufgetragen. Der Antikörper RTQ-7C3 wurde in einer 1:250-Verdünnung eingesetzt. **B)** HCN2: Aufgetragen waren 2 µg Membranproteine aus transfizierten HEK 293-Zellen (Spuren 1 und 2), bzw. 50 µg Membranproteine aus der Rattenretina (Spuren 3 bis 5). In den Spuren 1 und 3 waren die unbehandelten, in den Spuren 2, 4 und 5 die deglykosylierten Proben aufgetragen. Der Antikörper QQA-3G7 wurde in einer 1:10-Verdünnung eingesetzt. Spur 5 wurde zum Nachweis der Kreuzreaktivität des 2. Antikörpers ohne den 1. Antikörper inkubiert. **C)** HCN3: Aufgetragen waren 2 µg Membranproteine aus transfizierten HEK 293-Zellen (Spuren 1 und 2), bzw. 120 µg Membranproteine aus der Rattenretina (Spuren 3 und 4). In den Spuren 1 und 3 waren die unbehandelten, in den Spuren 2 und 4 die deglykosylierten Proben aufgetragen. Der Antikörper TLL-6C5 wurde in einer 1:5-Verdünnung eingesetzt. **D)** HCN4: Aufgetragen waren 3 µg Membranproteine aus transfizierten HEK 293-Zellen (Spuren 1 und 2), bzw. 50 µg Membranproteine aus der Rattenretina (Spur 3). In den Spuren 1 und 3 waren die unbehandelten, in der Spur 2 die deglykosylierten Proben aufgetragen. Der Antikörper SHG-1E5 wurde in einer 1:5-Verdünnung eingesetzt.

HCN1:

Der Antikörper RTQ-7C3 erkennt in pcA-rHCN1-transfizierten HEK 293-Zellen ein einziges Protein bei 102 kDa, dessen Größe sich durch Deglykosylierung nicht ändert (Abb. 3.7 A, Spuren 1 und 2). Allerdings ist das Signal in der deglykosylierten Probe stärker, als in der unbehandelten Probe. Wird eine größere Menge an unbehandelten Membranproteinen auf das SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, werden zusätzlich eine zweite Bande knapp über der 102 kDa-Bande und eine dritte, diffusere Bande bei ca. 120 kDa detektiert (nicht gezeigt). Diese beiden Banden können durch Behandlung mit der Deglykosidase PNGase F in die 102 kDa-Bande überführt werden. Das Kanalprotein rHCN1 liegt in HEK 293-Zellen also in einem geringen Umfang auch in glykosylierter Form vor. In einer Präparation von Membranproteinen der Rattenretina erkennt RTQ-7C3 ein Protein mit einer Größe von ca. 110 kDa (Abb. 3.7 A, Spur 3). Durch Deglykosylierung verringert sich dessen Größe auf 102 kDa (Spur 4), was mit dem deglykosylierten rHCN1-Protein aus transfizierten HEK 293-Zellen übereinstimmt.

HCN2:

In Präparationen von Membranproteinen aus HEK 293-Zellen, die rHCN2 exprimieren, erkennt der Antikörper QQA-3G7 eine Doppelbande bei 98 kDa und eine diffusere Bande um die 120 kDa (Abb. 3.7 B, Spur 1). Werden die heterolog exprimierten Membranproteine deglykosyliert, detektiert der Antikörper nur noch eine einzelne Bande bei 98 kDa (Spur 2). Auch in unbehandelten Membranpräparationen der Rattenretina werden eine Doppelbande und eine diffuse Bande erkannt (Spur 3). Die Doppelbande entspricht in ihrer Größe derjenigen aus transfizierten HEK 293-Zellen, während die diffuse Bande mit ca. 108 kDa etwas kleiner als die entsprechende Bande in HEK 293-Zellen ist. Dieser Größenunterschied zwischen HEK 293-Zellen und nativem Gewebe beruht wahrscheinlich auf unterschiedlichen Zusammensetzungen der Zuckerketten. Nach Deglykosylierung der Membranproteine erkennt QQA-3G7 auch in der Rattenretina nur noch eine einzelne Bande bei 98 kDa (Spur 4). In Spur 4 ist zusätzlich eine Bande bei 120 kDa zu sehen. Diese Bande ist auch in Spur 5 zu erkennen, in der die gleiche Probe nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurde. Es handelt sich also bei der 120 kDa-Bande um eine Kreuzreaktion des sekundären Antikörpers. Diese Bande ist nicht identisch mit der 120 kDa-Bande in Spur 1, die nur vom primären Antikörper in einer unbehandelten Probe erkannt wird.

HCN3:

Der Antikörper TLL-6C5 erkennt in rHCN3-exprimierenden HEK 293-Zellen zwei Proteine mit Größen von 88 kDa und 92 kDa (Abb. 3.7 C, Spur 1). Das höhere Molekulargewicht läßt sich in diesem Fall nicht mit einer Glykosylierung erklären, da eine Behandlung mit PNGase F lediglich einen Größenverlust beider Proteine, nicht aber eine generelle Änderung des Bandenmusters bewirkt (Spur 2). Auch eine Dephosphorylierung der Membranproteine ändert das Bandenmuster nicht (nicht gezeigt). Auf welche Weise das rHCN3-Kanalprotein in HEK 293-Zellen stattdessen modifiziert ist, muß in zukünftigen Experimenten geklärt werden. Eindeutiger ist dagegen die Situation in der Rattenretina: In einer unbehandelten Membranfraktion wird ein Protein mit einer Größe von 90 kDa detektiert (Spur 3). Durch Deglykosylierung verringert sich die Größe auf 86 kDa (Spur 4), was dem kleineren Protein in transfizierten HEK 293-Zellen entspricht und mit dem errechneten Molekulargewicht von rHCN3 übereinstimmt.

HCN4:

Der Antikörper SHG-1E5 erkennt in HEK 293-Zellen, die hHCN4 exprimieren, zwei Proteine mit Größen von 132 kDa und 162 kDa (Abb. 3.7 D, Spur 1). Die untere der beiden Banden entspricht mit ihren 132 kDa ungefähr dem anhand der Aminosäuresequenz errechneten Molekulargewicht von hHCN4 (129 kDa). Die 162 kDa-Bande läßt sich in einer deglykosylierten Membranfraktion nicht mehr nachweisen, während gleichzeitig die Signalstärke der kleineren Bande zunimmt (Spur 2). In der Rattenretina erkennt SHG-1E5 ebenfalls ein Protein von ca. 130 kDa (Spur 3). Wird eine größere Menge an Membranprotein zur Westernblot-Analyse eingesetzt, wird noch eine zweite Bande bei ca. 135 kDa sichtbar. Diese Bande verschwindet, wenn die Probe vorher mit PNGase F behandelt wurde. Eine deglykosylierte Probe ist in der Abbildung nicht gezeigt, da sich die Signalstärke der 130 kDa-Bande nicht deutlich ändert, dafür aber der Hintergrund durch den sekundären Antikörper bei höheren Proteinmengen zunimmt.

Neben den vier oben beschriebenen Antikörpern wurden auch die anderen in Tab. 3.3 aufgeführten Antikörper mit Membranproteinen der Rattenretina getestet. Die Ergebnisse dieser Westernblot-Analysen sind in Abschnitt 8.2 im Anhang zusammengefaßt.

Mit Hilfe der vorliegenden Westernblot-Analysen konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß alle vier HCN-Kanalgene in der Rattenretina exprimiert werden. Dies wurde durch PCR-Experimente mit cDNA aus der Rattenretina bestätigt (Dr. W. Bönigk, persönliche Mitteilung). Die Kanalproteine rHCN1, rHCN2 und rHCN3 liegen in nativem Gewebe in einer glykosylierten Form vor. Auch das Kanalprotein rHCN4 scheint in einem geringen Maße glykosyliert zu sein. Zwischen dem nativen Gewebe (Rattenretina) und dem heterologen Expressionssystem (HEK 293-Zellen) bestehen allerdings Unterschiede im Glykosylierungsmuster. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß die Kanalproteine auch in verschiedenen Geweben unterschiedlich glykosyliert sein könnten. Es gibt keine Hinweise darauf, daß die Kanalproteine in der Rattenretina außer Glykosylierung noch andere posttranslationale Modifikationen, wie beispielsweise Phosphorylierungen, erfahren. Ebenso wenig konnten Spleißvarianten mit anderen Molekulargewichten nachgewiesen werden. In transfizierten HEK 293-Zellen dagegen ist das Kanalprotein rHCN3 noch zusätzlich modifiziert. Die Art der Modifizierung konnte bislang nicht geklärt werden.

Nachdem mit Hilfe der Westernblot-Analysen gezeigt wurde, in welcher Form die Kanalproteine in der Rattenretina vorliegen, sollte nun untersucht werden, ob die vier HCN-Kanaltypen heterooligomere Komplexe bilden können. Der nachfolgende Abschnitt beschäftigt sich daher mit der zellulären und subzellulären Lokalisation der HCN-Kanäle in der Rattenretina.

3.3.2 Lokalisation der HCN-Kanäle in der Rattenretina

Das Expressionsmuster der HCN-Kanäle in der Rattenretina wurde mit Hilfe immunhistochemischer Methoden (2.15) untersucht. Die Gewebeschnitte und die immunhistochemischen Färbungen wurden freundlicherweise von Dr. F. Müller (IBI-1, Forschungszentrum Jülich) angefertigt.

Die Lokalisation von HCN1 erfolgte in erster Linie mit dem Antikörper RTQ-7C3. Die Ergebnisse wurden durch Färbungen mit den Antikörpern IHR-2G4 und PPc63K bestätigt (nicht gezeigt). Im Vergleich zu RTQ-7C3 und PPc63K färbte IHR-2G4 allerdings noch weitere Strukturen an, was wahrscheinlich auf eine Kreuzreaktion dieses Antikörpers mit anderen Proteinen in der Rattenretina zurückzuführen ist (siehe auch Abschnitt 8.2). PPc63K war nur eingeschränkt brauchbar, da die Färbungen sehr schwach waren und sich kaum vom Hintergrund abhoben. Die Lokalisation von HCN2 geschah mit Hilfe der Antikörper

QQA-4A6 und QQA-3G7. Beide Antikörper färbten identische Strukturen. Die Lokalisation von HCN3 wurde mit Hilfe des Antikörpers TLL-6C5 untersucht. Die Ergebnisse konnten mit dem Antikörper TLL-7H7 bestätigt werden. Die Färbungen für HCN4 wurden mit den Antikörpern SHG-1E5 und PPc73K durchgeführt, welche identische Ergebnisse lieferten. Ein generelles Problem waren die Kreuzreaktionen der sekundären Anti-Ratte-Antikörper, die zum Nachweis der monoklonalen Antikörper verwendet wurden; häufig kam es dabei zu einer unspezifischen Anfärbung von Blutgefäßen (Bg; Abb. 3.8 B und D).

Die Abb. 3.8 zeigt Vertikalschnitte durch die Rattenretina. A) zeigt zur Übersicht die verschiedenen Schichten der Rattenretina. Die Schnitte in B) bis E) wurden mit den Antikörpern RTQ-7C3 (B; HCN1), QQA-4A6 (C; HCN2), TLL-6C5 (D; HCN3) bzw. PPc73K (E; HCN4) gefärbt. Jeder dieser Antikörper markiert mehrere Zelltypen. Dadurch wird das Ergebnis der Westernblot-Analysen bestätigt, daß alle vier Kanaltypen in der Rattenretina exprimiert werden (3.3.1). Die äußere Retina, die die Zellkörper der Photorezeptoren in der äußeren nukleären Schicht (ONL) und deren Innen- (IS) und Außensegmente (OS) umfaßt, werden von den HCN-Antikörpern nur schwach bzw. gar nicht gefärbt. Stärkere Färbungen lassen sich in der inneren Retina nachweisen. Die innere Retina umfaßt die Zellkörper von Bipolar-, Horizontal- und Amakrinzellen in der inneren nukleären Schicht (INL), die Zellkörper und Axone von Ganglienzellen in der Ganglienzellschicht (GCL) und der Nervenfaserschicht (NFL), sowie die synaptischen Bereiche der verschiedenen Zelltypen in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) bzw. inneren plexiformen Schicht (IPL). In Abschnitt 3.3.2.1 wird zunächst die Expression der HCN-Kanäle in der äußeren Retina beschrieben, während in 3.3.2.2 die Verteilung der HCN-Kanäle in der inneren Retina genauer untersucht wird.

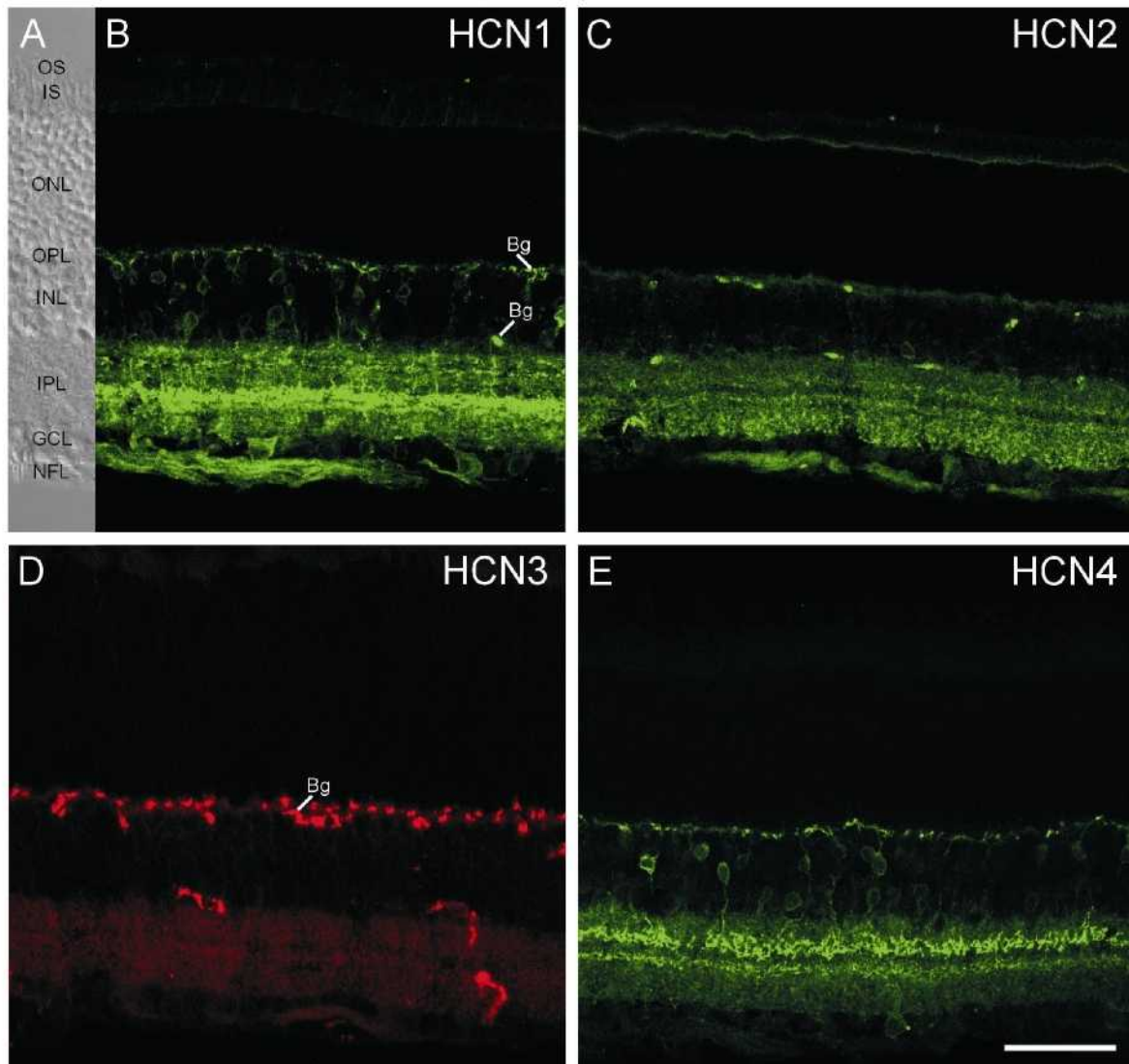


Abb. 3.8: Lokalisation aller vier Typen von HCN-Kanälen in der Rattenretina. Abbildungsteil A zeigt die verschiedenen Schichten der Rattenretina aufgenommen mit einer Nomarski Optik. In B bis E sind immunhistochemische Färbungen von Vertikalschnitten durch die Rattenretina dargestellt. B) Färbungen mit RTQ-7C3 (HCN1) in einer 1:300-Verd.; C) Färbungen mit QQA-4A6 (HCN2) in einer 1:5-Verd.; D) Färbungen mit TLL-6C5 (HCN3) in einer 1:5-Verd.; E) Färbungen mit PPc73K (HCN4) in einer 1:400-Verd.. Blutgefäße, die unspezifisch durch den sekundären Antikörper angefärbt wurden, sind in B und D gekennzeichnet (Bg). Der Balken in E entspricht 50 µm. OS: Außensegmente, IS: Innensegmente, ONL: äußere nukleäre Schicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere nukleäre Schicht, IPL: innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht, NFL: Nervenfaserschicht.

3.3.2.1 Lokalisation der HCN-Kanäle in der äußeren Rattenretina

Elektrophysiologische Untersuchungen ergaben, daß HCN-Kanäle in den Photorezeptoren des Tigersalamanders einer starken Hyperpolarisation der Zellmembran entgegenwirken (Fain et al., 1978; Bader et al., 1979; Attwell & Wilson, 1980; Bader et al., 1982). Es wurde daher vermutet, daß auch in den Photorezeptoren der Rattenretina HCN-Kanäle exprimiert werden.

Die äußere Retina umfaßt die Zellkörper der Photorezeptoren in der äußeren nukleären Schicht (ONL), sowie deren Innen- (IS) und Außensegmente (OS).

In Abb. 3.8 ist keine eindeutige Färbung von Photorezeptoren zu sehen. Daher zeigt Abb. 3.9 in einer Ausschnittsvergrößerung die Färbung der äußeren Retina durch den Antikörper QQA-4A6. Die kurzen Pfeile markieren die gefärbten Zellkörper von Zapfen in der ONL. Zapfen exprimieren demnach HCN2. Auch mit Antikörpern gegen HCN1 und HCN3 können in einigen Fällen die Zellkörper von Zapfen angefärbt werden. Diese Färbungen sind jedoch nur schwach und sehr unregelmäßig. Es könnte sich daher auch nur um unspezifische Färbungen handeln.

Durch alle HCN2-spezifischen Antikörper wird auch die äußere begrenzende Membran gefärbt (Abb. 3.9, langer Pfeil), die von den Endfüßen der sogenannten Müllerzellen gebildet wird. Bislang wurde in der Literatur kein Vorkommen von Ionenkanälen in dieser Schicht beschrieben. Es stellt sich daher die Frage, ob es sich tatsächlich um eine HCN2-spezifische Färbung oder um eine unspezifische Kreuzreaktion der Antikörper handelt. Allerdings lieferten die Ergebnisse der Westernblot-Analysen (Abb. 3.7; Abschnitt 8.2) keine Hinweise auf Kreuzreaktionen.

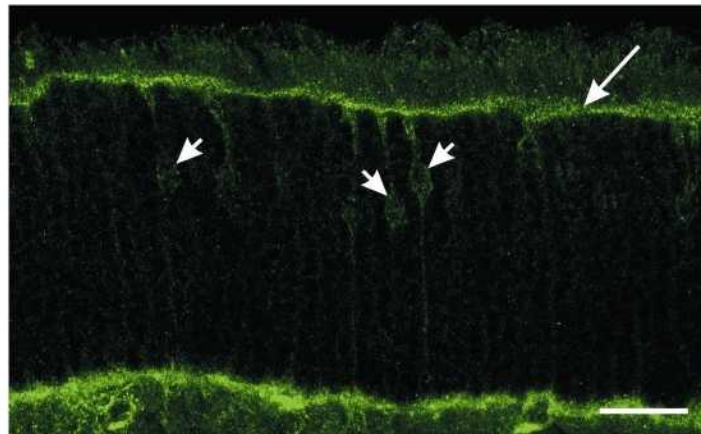


Abb. 3.9: Lokalisation von HCN2 in Zapfen. Dargestellt ist eine immunhistochemische Färbung der äußeren Rattenretina mit dem Antikörper QQA-4A6 (1:5-Verd.). Die angefärbten Zellkörper von Zapfen sind mit kurzen Pfeilen markiert. Der lange Pfeil zeigt auf die angefärbte äußere begrenzende Membran. Der Balken entspricht 20 µm.

In den Stäbchen der Rattenretina konnte bislang durch immunhistochemische Methoden nicht eindeutig geklärt werden, welcher HCN-Kanaltyp exprimiert wird. In einigen wenigen Fällen werden die Zellkörper durch den Antikörper RTQ-7C3 angefärbt. Diese Färbungen liegen allerdings nur knapp über dem Hintergrund, weshalb nicht sicher ist, ob es sich um spezifische Färbungen handelt. Solche schwachen Färbungen der Stäbchen lassen sich z.T. auch mit Antikörpern gegen HCN2 und HCN4 beobachten. In elektrophysiologischen

Untersuchungen kann ein HCN-Strom gemessen werden, der dem aus rHCN1-exprimierenden HEK 293-Zellen ähnelt (E. Ivanova, persönliche Mitteilung). Stäbchen der Mausretina sind in immunhistochemischen Färbungen eindeutig HCN1-positiv (Dr. F. Müller, persönliche Mitteilung).

Im Gegensatz zu den Zellkörpern werden die Innen- und Außensegmente der Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen) durch keinen der Antikörper gegen HCN-Kanäle gefärbt.

3.3.2.2 Lokalisation der HCN-Kanäle in der inneren Rattenretina

In der inneren Retina können vier Hauptklassen von Nervenzellen unterschieden werden, die eine Vielzahl funktioneller Untertypen aufweisen. Zur besseren Übersicht sind die nachfolgenden Ergebnisse nicht nach Zelltypen, sondern anhand der vier HCN-Kanaltypen gegliedert. Vor jedem Abschnitt ist nochmals der entsprechende Abbildungsteil aus Abb. 3.8 dargestellt. Prominente Zellstrukturen sind durch Pfeile hervorgehoben. Da sich die Expressionsmuster von HCN1 und HCN4 sehr ähnlich, werden diese beiden Gene direkt nacheinander besprochen. Die Untersuchungen zur Lokalisation von HCN2 und HCN3 schließen sich daran an.

Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit galt der Expression der HCN-Kanäle in den verschiedenen Typen von Bipolarzellen. Karschin & Wässle (1990) beschreiben HCN-Ströme in isolierten Stäbchenbipolarzellen der Rattenretina. Es war daher zu erwarten, daß in Bipolarzellen HCN-Kanalproteine immunologisch nachgewiesen werden können. In der Rattenretina wurden zehn verschiedene Typen von Bipolarzellen klassifiziert (Euler & Wässle, 1995). Die Typen können anhand der Verzweigung und der Lage der Axone in der IPL voneinander unterschieden werden. Um die nachfolgenden Ergebnisse besser überblicken zu können, zeigt Abb. 3.10 das Klassifizierungsmodell der Rattenbipolarzellen nach Euler et al. (1996). Zusätzlich lassen sich die Bipolarzellen in OFF-Zapfenbipolarzellen (Typ 1 bis 5), ON-Zapfenbipolarzellen (Typ 6 bis 9) und ON-Stäbchenbipolarzellen unterteilen. Einige der Bipolarzellen lassen sich durch immunologische Marker eindeutig identifizieren.

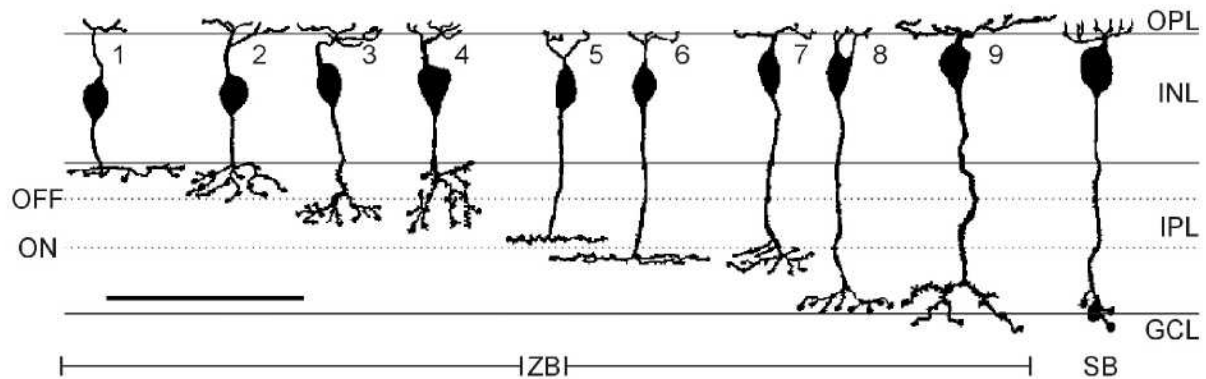


Abb. 3.10: Klassifizierung der Bipolarzellen in der Rattenretina. Dargestellt sind die neun verschiedenen Typen von Zapfenbipolarzellen (ZB) und die Stäbchenbipolarzelle (SB). Die Bipolarzellen lassen sich anhand der Lage ihrer Axone in der IPL identifizieren. Die Dendriten von cholinergen Amakrinzellen bilden in der IPL eine "OFF-cholinerge" und eine "ON-cholinerge" Bande (gestrichelte Linien). Die Grenzen zwischen den verschiedenen Schichten der Retina (OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere nukleäre Schicht, IPL: innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht) sind durch durchgezogene Linien markiert. Der Balken entspricht 60 µm. Die Abbildung wurde verändert nach Euler et al., 1996.

Expressionsmuster von HCN1:

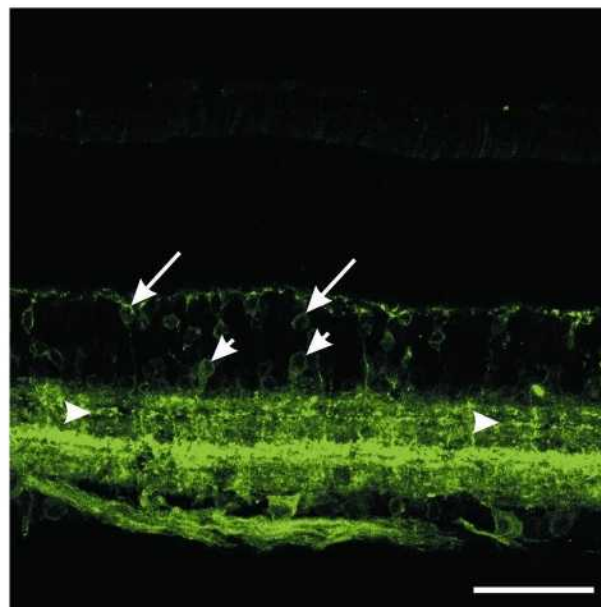


Abb. 3.11: Lokalisation von HCN1 in der Rattenretina. Dargestellt ist die immunhistochemische Färbung eines Vertikalschnitts der Rattenretina durch den Antikörper RTQ-7C3 (1:300-Verd.). Die gefärbten Zellkörper von Typ 5-Zapfenbipolarzellen (lange Pfeile) und Amakrinzellen (kurze Pfeile) sind markiert. Die Pfeilspitzen weisen auf Axonterminalsysteme, die eventuell zu den gefärbten Amakrinzellen gehören. Der Balken entspricht 50 µm.

Mit den Antikörpern gegen HCN1 werden in der INL zahlreiche Zellkörper gefärbt (Abb. 3.11; entspricht Abb 3.8 B). Bei einigen dieser Zellkörper (lange Pfeile) handelt es sich um Bipolarzellen. Die HCN1-positiven Bipolarzellen stratifizieren in der Mitte der IPL, weshalb es sich um Zapfenbipolarzellen vom Typ 5 oder 6 handeln könnte. Um den Typ von Bipolarzelle genauer zu identifizieren, wurde eine Doppelfärbung mit RTQ-7C3 und einem

Antikörper gegen die Cholin-Acetyltransferase (Chat) durchgeführt. Dieser Antikörper färbt cholinerge Amakrinzellen, die mit ihren Dendriten zwei Banden bilden, welche die IPL in drei Regionen unterteilen (Abb. 3.10): Die "OFF-cholinerge" Bande befindet sich nahe der INL, wohingegen die "ON-cholinerge" Bande knapp unterhalb der Mitte der IPL verläuft. Typ 5-Zapfenbipolarzellen stratifizieren oberhalb der "ON-cholinergen" Bande, während die Synapsen von Typ 6-Zapfenbipolarzellen unterhalb liegen. Abb. 3.12 zeigt, daß HCN1-positive Synapsen (rot) vor allem oberhalb der "ON-cholinergen" Bande (grün) liegen. Daraus folgt, daß HCN1 in Typ 5-Zapfenbipolarzellen exprimiert wird.

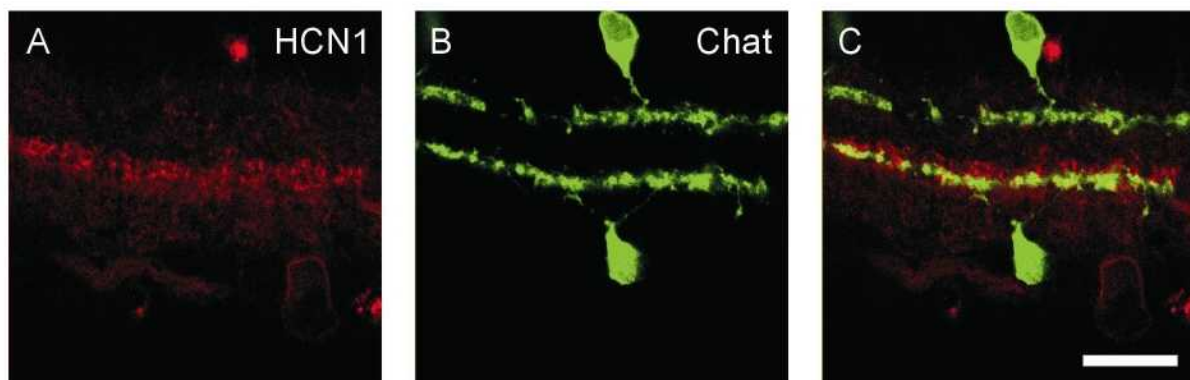


Abb. 3.12: Identifizierung der HCN1-positiven Zapfenbipolarzellen. Dargestellt ist der konfokale optische Schnitt (Schnittdicke $< 1 \mu\text{m}$) einer immunhistochemischen Doppelfärbung. **A)** HCN1-Färbung durch den Antikörper RTQ-7C3 (rot; 1:300-Verd.). **B)** Cholin-Acetyltransferase-Färbung durch den Antikörper Chat (grün; 1:100-Verd.). **C)** Überlagerung der beiden Färbungen. Der Balken entspricht $20 \mu\text{m}$.

Abgesehen von den recht breit gefächerten Axonen der oben beschriebenen Zapfenbipolarzellen sind in Abb. 3.11 zusätzlich noch mehrere dünne Banden, beispielsweise in der OFF-Sublamina der IPL (Pfeilspitzen), gefärbt. Die Ursprünge dieser Fortsätze sind nicht eindeutig zu identifizieren. Da die Axonterminalsysteme der OFF-Zapfenbipolarzellen aber in der Regel dicker sind (Euler & Wässle, 1995), könnte es sich um angefärbte Fortsätze von Amakrinzellen handeln. In der Tat werden auch Zellkörper von Amakrinzellen an der Grenze zwischen INL und IPL gefärbt (kurze Pfeile). In der GCL wird eine starke Färbung von Zellkörpern beobachtet, bei denen es sich wahrscheinlich um Ganglienzellen handelt, da auch in der darunterliegenden Nervenfaserschicht mehrere Axonbündel gefärbt werden.

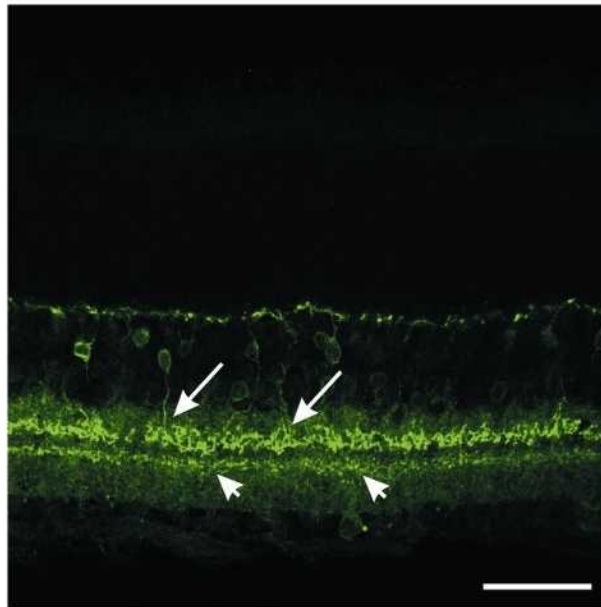
Expressionsmuster von HCN4:

Abb. 3.13: Lokalisation von HCN4 in der Rattenretina. Dargestellt ist die immunhistochemische Färbung eines Vertikalschnitts der Rattenretina durch den Antikörper PPc73K (1:400-Verd.). Die gefärbten Axone von Typ 3-Zapfenbipolarzellen (lange Pfeile) und Typ 5-Zapfenbipolarzellen (kurze Pfeile) sind markiert. Der Balken entspricht 50 µm.

Zwei Typen von Bipolarzellen werden in der INL markiert, deren Axone in zwei verschiedene Schichten der IPL projizieren (Abb. 3.13; entspricht Abb. 3.8 E). Die stärker gefärbten Axone (lange Pfeile) enden in der OFF-Sublamina nahe der INL. In einer stärkeren Vergrößerung (Abb. 3.14) wird eine charakteristische Gabelung dieser Axone deutlich, weshalb diese Zellen eindeutig als OFF-Zapfenbipolarzellen vom Typ 3 identifiziert werden können (Euler & Wässle, 1995).

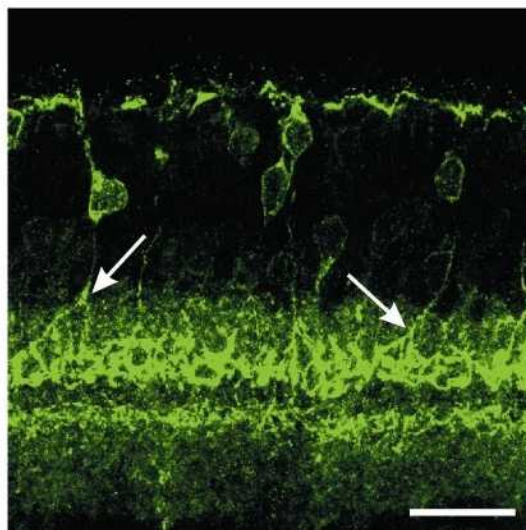


Abb. 3.14: Identifizierung von HCN4-positiven Zapfenbipolarzellen. Dargestellt ist die immunhistochemische Färbung der IPL mit dem Antikörper PPc73K (1:400-Verd.). Die Pfeile markieren die charakteristischen Gabelungen der Axone von Typ 3-Zapfenbipolarzellen. Der Balken entspricht 20 µm.

Die in Abb. 3.13 schwächer gefärbten Axone (kurze Pfeile) stratifizieren in der Mitte der IPL, ähnlich den HCN1-positiven Typ 5-Zapfenbipolarzellen. Es bestand daher die Möglichkeit, daß HCN1 und HCN4 in demselben Zelltyp ko-exprimiert vorliegen. Dies wurde durch Doppelfärbung von Schnitten mit den Antikörpern RTQ-7C3 (HCN1) und PPc73K (HCN4) untersucht. Abb. 3.15 A zeigt einen konfokalen optischen Schnitt durch die IPL. Sowohl HCN1-positive (rot), als auch HCN4-positive (grün) Zellfortsätze bilden zwei Banden. Die beiden oberen Banden sind nicht deckungsgleich, was bedeutet, daß HCN1 und HCN4 in zwei verschiedenen Zelltypen exprimiert werden. Im Gegensatz dazu, sind in der Mitte der IPL HCN1-positive Zellfortsätze zu erkennen, welche die gleiche Form haben wie HCN4-positive Strukturen (Pfeile). In der Überlagerung der beiden Bilder sieht man eine deutliche Gelbfärbung dieser Strukturen. In Abb. 3.12 konnte für HCN1 gezeigt werden, daß es sich dabei um Typ 5-Zapfenbipolarzellen handelt. Somit sind HCN1 und HCN4 in den Axonterminalsystemen von Typ 5-Zapfenbipolarzellen ko-lokalisiert.

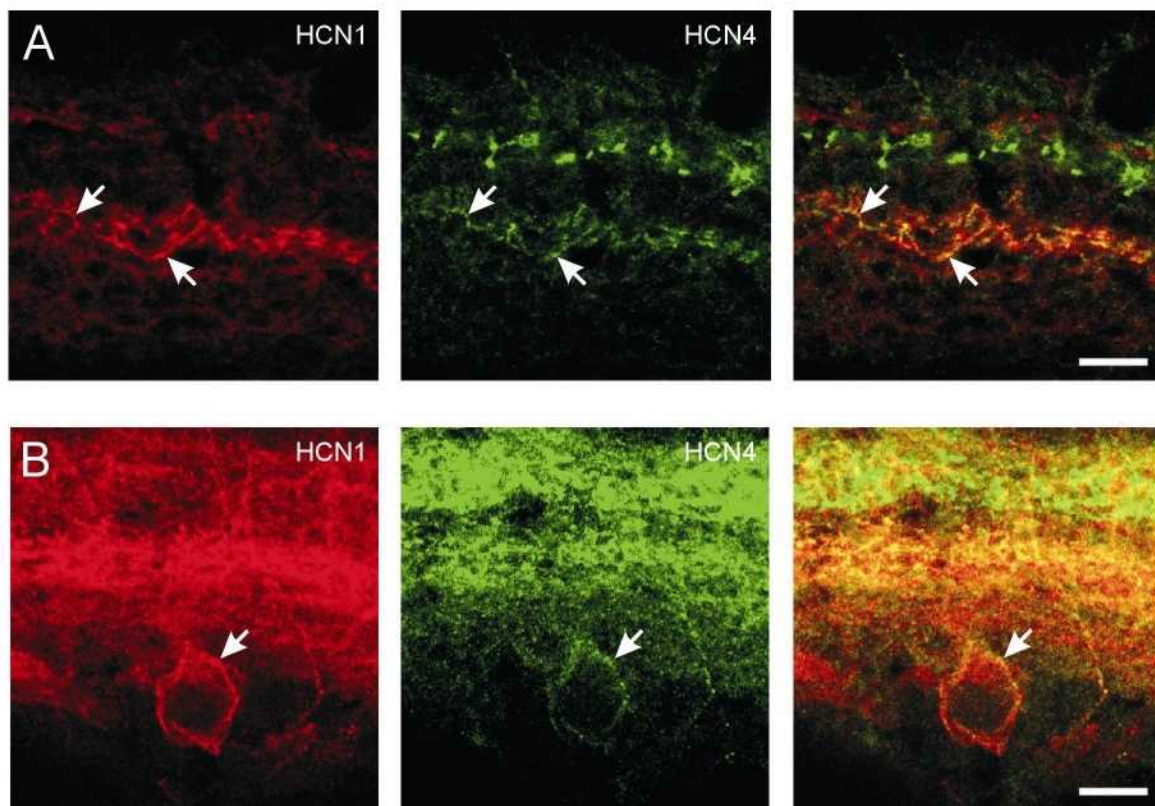


Abb. 3.15 Ko-Lokalisation von HCN1 und HCN4 in der inneren Rattenretina. Dargestellt sind die konfokalen optischen Schnitte (Schnittdicke < 1 µm) von immunhistochemischen Doppelfärbungen durch die Antikörper RTQ-7C3 (1:300-Verd.) und PPc73K (1:400-Verd.). Die Pfeile markieren Strukturen, die sowohl HCN1-positiv (rot), als auch HCN4-positiv (grün) sind und in der Überlagerung gelb erscheinen. **A)** Ko-Lokalisation von HCN1 und HCN4 in den Axonterminalsystemen von Typ 5-Zapfenbipolarzellen. **B)** Ko-Lokalisation von HCN1 und HCN4 in einer Ganglienzelle. Die Balken entsprechen 10 µm.

In anderen Experimenten (nicht gezeigt) konnten neben den Axonen auch die Zellkörper von Typ 5-Zapfenbipolarzellen doppelgefärbt werden. Zusätzlich konnte eine Ko-Lokalisation von HCN1 und HCN4 in den Zellkörpern einiger Ganglienzellen nachgewiesen werden (Abb. 3.15 B).

Expressionsmuster von HCN2:

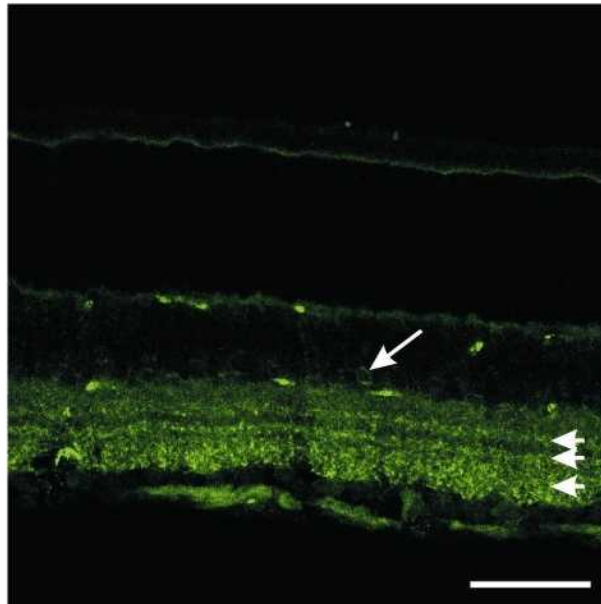


Abb. 3.16: Lokalisation von HCN2 in der Rattenretina. Dargestellt ist die immunhistochemische Färbung eines Vertikalschnitts der Rattenretina durch den Antikörper QQA-4A6 (1:5-Verd.). Die Axonterminalsysteme von Bipolarzellen (kurze Pfeile) und der Zellkörper einer Amakrinzelle (langer Pfeil) sind markiert. Der Balken entspricht 50 µm.

Die Expression von HCN2 lässt sich in mehreren Schichten der IPL nachweisen (Abb. 3.16, kurze Pfeile; entspricht Abb. 3.8 C). Die stärkste Färbung zeigt sich dabei in der inneren Hälfte der IPL, nahe der GCL. Es werden hauptsächlich kleine, blasenartige Strukturen angefärbt, bei denen es sich um Axonterminalsysteme von Bipolarzellen handelt. Vier Typen von ON-Bipolarzellen stratifizieren in diesem Bereich der IPL. Dabei handelt es sich um die Zapfenbipolarzellen vom Typ 7, 8 und 9, sowie um die Stäbchenbipolarzellen. Für die Typen 7 und 9 sind z.Z. keine spezifischen immunologischen Marker bekannt. Typ 8-Zapfenbipolarzellen können dagegen mit einem Antikörper gegen Recoverin (Rec; Euler & Wässle, 1995) angefärbt werden, während sich für den Nachweis von Stäbchenbipolarzellen ein Antikörper gegen die α -Isoform der Proteinkinase C (PKC α ; Greferath et al., 1990) eignet. Abb. 3.17 A zeigt einen konfokalen optischen Schnitt durch die IPL, die mit den Antikörpern gegen PKC α (rot) und HCN2 (grün) doppelgefärbt wurde. Die PKC α -positiven Axone der Stäbchenbipolarzellen enden nahe der GCL. An den axonterminalen Verdickungen wird die

Zellmembran auch durch die HCN2-Antikörper gefärbt (Pfeil). Es bleibt anzumerken, daß in dieser Ebene des konfokalen optischen Schnitts nicht alle Endigungen der gezeigten Stäbchenbipolarzellen HCN2-positiv sind. Diese Endigungen können aber in darunter- oder darüberliegenden Schnittebenen angefärbt werden (nicht gezeigt). Dies ist darauf zurückzuführen, daß das HCN2-Kanalprotein im Gegensatz zu HCN1 oder HCN4 nicht gleichmäßig über das gesamte Axonterminalsystem verteilt, sondern auf punktuelle Abschnitte begrenzt ist. In Abb. 3.17 B ist ein Schnitt durch die IPL gezeigt, der mit Antikörpern gegen HCN2 (grün) und Recoverin (rot) doppelgefärbt wurde. Die gelbgefärbten Strukturen (Pfeile) in der Überlagerung beweisen, daß HCN2 auch in den Axonen der Typ 8-Zapfenbipolarzellen lokalisiert ist. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß HCN2 auch in Typ 7- und Typ 9-Zapfenbipolarzellen vorkommt. Da für diese beiden Zelltypen z.Z. noch keine spezifischen Marker bekannt sind, läßt sich dies mit Hilfe immunhistochemischer Methoden nicht klären.

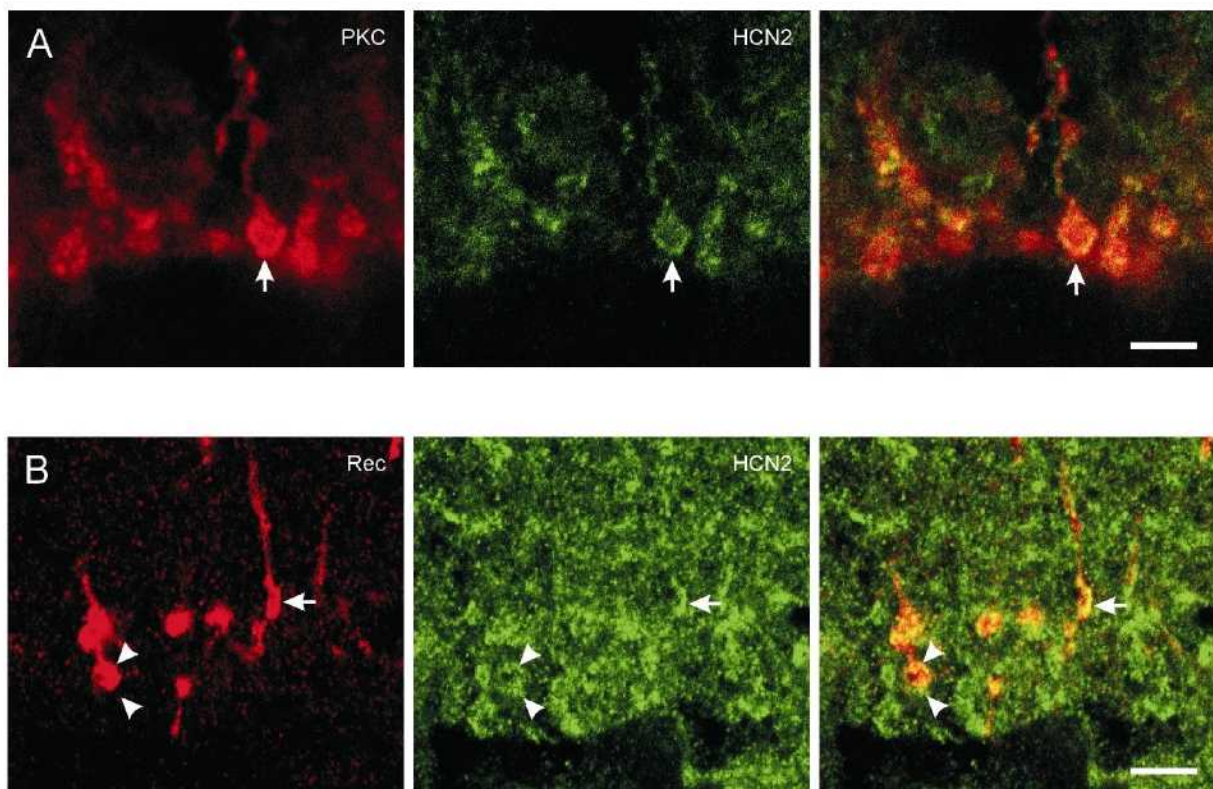


Abb. 3.17: Identifizierung von HCN2-positiven Bipolarzellen. Dargestellt sind die konfokalen optischen Schnitte (Schnittdicke < 1 µm) von immunhistochemischen Doppelfärbungen durch die Antikörper QQA-4A6 (1:5-Verd.) und PKCα (A; 1:40.000-Verd.), bzw. Rec (B; 1:40.000-Verd.). Die Pfeile markieren Strukturen, die sowohl HCN2-positiv (grün), als auch PKCα-, bzw. Rec-positiv (rot) sind und in der Überlagerung gelb erscheinen. **A)** Ko-Lokalisation von HCN2 und PKCα in den Axonterminalsystemen von Stäbchenbipolarzellen. **B)** Ko-Lokalisation von HCN2 und Rec in den Axonterminalsystemen von Typ 8-Zapfenbipolarzellen. Die Balken entsprechen 5 µm.

Im Gegensatz zu den Axonterminalsystemen werden die Zellkörper von Bipolarzellen nur schwach angefärbt (nicht gezeigt). In einigen Fällen kann zudem eine schwache Färbung von Zellkörpern einzelner Amakrinzellen beobachtet werden (Abb. 3.16, langer Pfeil). Ähnlich wie bei HCN1 deuten Färbungen von Axonbündeln in der NFL darauf hin, daß HCN2 auch in Ganglienzellen exprimiert wird. Bislang konnte nicht gezeigt werden, daß HCN1 und HCN2 in den Axonen eines Ganglienzelltyps ko-lokalisiert sind.

Expressionsmuster von HCN3:

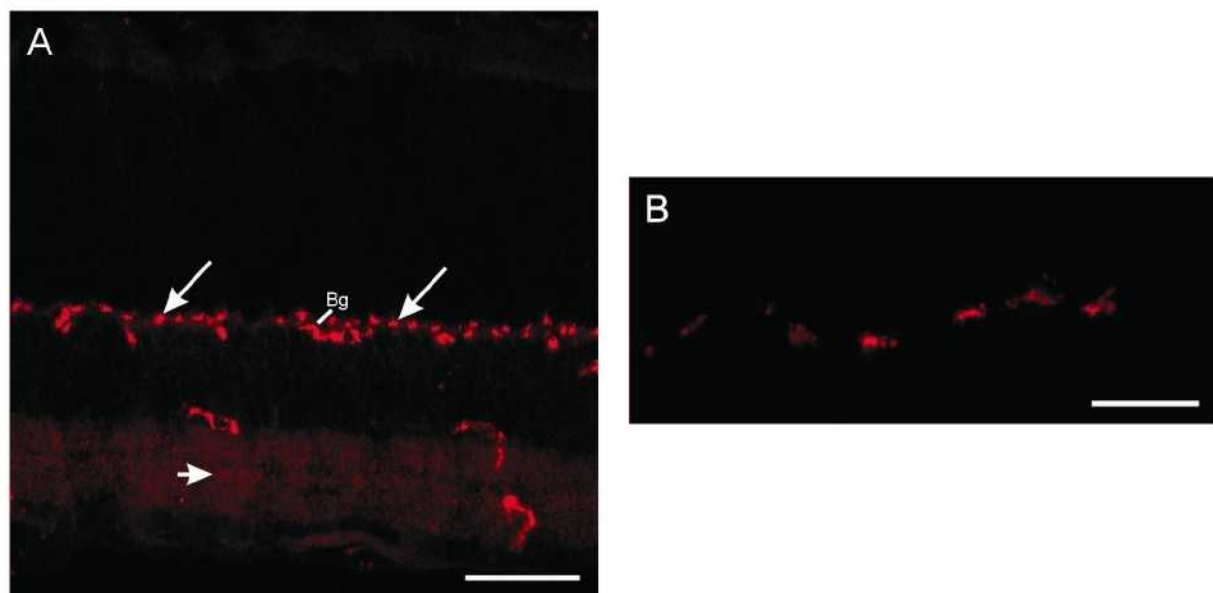


Abb. 3.18: Lokalisation von HCN3 in der Rattenretina. Dargestellt sind die immunhistochemischen Färbungen von Vertikalschnitten der gesamten Rattenretina (A) und der OPL (B) durch den Antikörper TLL-6C5 (1:5-Verd.). Die Pfeile markieren gefärbte synaptische Endigungen in der IPL (kurzer Pfeil) und an den Endfüßen der Zapfen (lange Pfeile). Blutgefäße, die unspezifisch durch den sekundären Antikörper angefärbt wurden, sind gekennzeichnet (Bg). Die Balken entsprechen 50 μ m in A und 20 μ m in B.

Die Färbungen für HCN3 sind auf die plexiformen Schichten der Retina begrenzt (Abb. 3.18 A; entspricht Abb. 3.8 D). Es werden keine Zellkörper gefärbt. Eine schwach gefärbte Bande HCN3-positiver Axone liegt in der Mitte der IPL. Dabei handelt es sich um den Bereich, in dem HCN1 und HCN4 ko-lokalisiert sind (kurzer Pfeil). In Doppelfärbungen mit HCN3- und HCN4-Antikörpern konnte nachgewiesen werden, daß diese beiden HCN-Kanaltypen nicht ko-lokalisiert sind (nicht gezeigt). Daraus kann gefolgert werden, daß auch HCN3 und HCN1 nicht in einer Zelle ko-exprimiert werden. Es war jedoch noch nicht möglich, den Zelltyp zu identifizieren, in dem HCN3 vorkommt. Es kann sich um die Axonterminalsysteme von Typ 6-Zapfenbipolarzellen oder um Dendriten von Amakrin- oder Ganglienzellen handeln. In der OPL färben die HCN3-Antikörper die synaptischen Bereiche an den Endfüßen der Zapfen (lange Pfeile). Abb. 3.18 B zeigt diesen Bereich in einer höheren Vergrößerung. Die

Zapfenendfüße bilden komplexe Synapsen mit bis zu zehn verschiedenen Typen von postsynaptischen Zellen (Haverkamp et al., 2000). Mit Hilfe von Doppelfärbungen sollte geklärt werden, ob HCN3 präsynaptisch in den Zapfen oder postsynaptisch in einem nachgeschalteten Zelltyp exprimiert wird. Dazu wurden sowohl vertikale Schnitte, als auch Gesamtpräparationen ("*whole mounts*") gegen HCN3 und verschiedene Marker für nachgeschaltete Zelltypen doppelgefärbt. Bei diesen Zelltypen kann es sich um ON-Bipolarzellen (Marker: metabotroper Glutamatrezeptor Typ 6; mGluR6), Horizontalzellen (Calbindin 28 K; CabP) oder bestimmte Typen von OFF-Bipolarzellen (Glutamatrezeptor Typ 1; GluR1) handeln. Abb. 3.19 zeigt die Doppelfärbung einer Gesamtpräparation mit Antikörpern gegen HCN3 (rot) und mGluR6 (grün) mit der OPL im Fokus. Bei den mGluR6-positiven Strukturen handelt es sich um die Dendritenspitzen von Bipolarzellen. TLL-6C5 färbt 5-8 μm große, ovale Strukturen, welche die mGluR6-positiven Zellen umschließen. Es kann keine Ko-Lokalisation nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse werden mit den Antikörpern gegen GluR1 und CabP erzielt (nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, daß HCN3 präsynaptisch im Zapfen exprimiert wird.

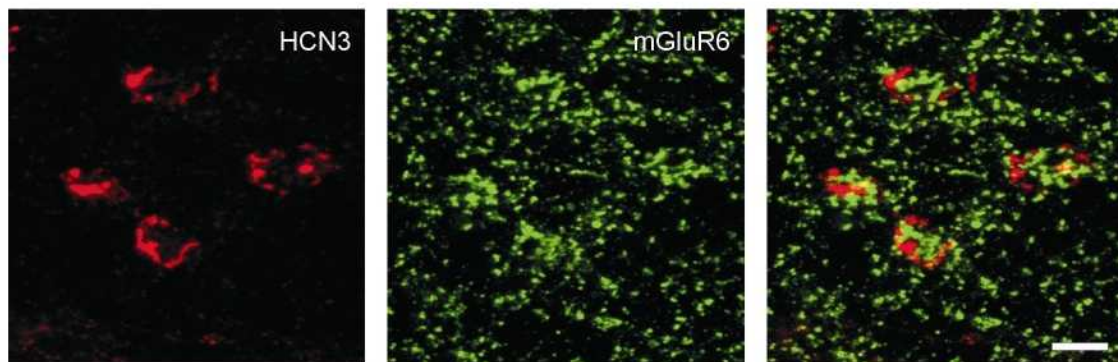


Abb. 3.19: Lokalisation von HCN3 an den Zapfenendfüßen. Dargestellt ist der konfokale optische Schnitt (Schnittdicke < 1 μm) einer immunhistochemischen Doppelfärbung durch die Antikörper TLL-6C5 (rot; 1:5-Verd.) und mGluR6 (grün; 1:7.500-Verd.). Der Balken entspricht 5 μm .

Der direkte Nachweis, daß HCN3 im Zapfenendfuß exprimiert wird, gelang mit Hilfe der Elektronenmikroskopie (2.15.4). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden freundlicherweise von Frau Dr. S. Haverkamp (Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt) angefertigt. In Abb. 3.20 sind elektronenmikroskopische Aufnahmen vom Zapfenendfuß dargestellt. In beiden Aufnahmen sind synaptische Bänder (lange Pfeile) in den Zapfenendfüßen (ZE) und invaginierende Zellfortsätze (kurze Pfeile) zu erkennen. In den dunkel gefärbten Abschnitten wird das HCN3-Kanalprotein vom Antikörper detektiert. Diese Färbungen liegen präsynaptisch sowohl an der Membran, die die invaginierenden Zellfortsätze umgibt, als auch in fingerartigen Ausstülpungen an der Basis des Endfußes.

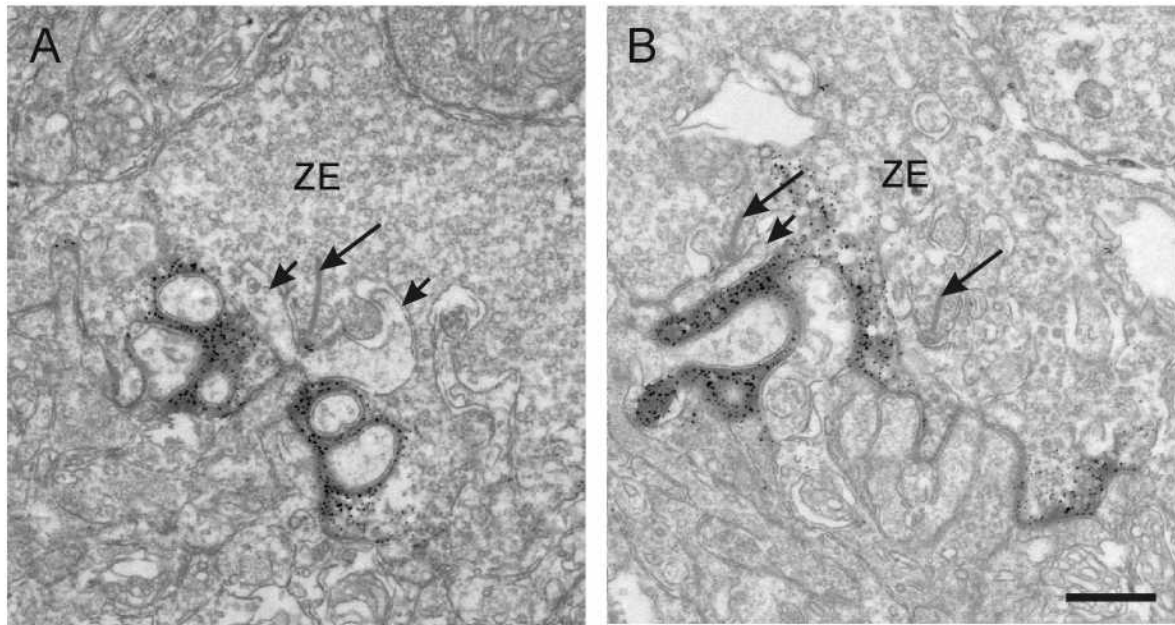


Abb. 3.20: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zapfenendfüßen. Dargestellt sind die immunhistochemischen Färbungen von Zapfenendfüßen durch den Antikörper TLL-6C5 (1:20-Verd.). Die Pfeile markieren die synaptischen Bänder (lange Pfeile) in den Zapfenendfüßen (ZE) und invaginierende Zellfortsätze (kurze Pfeile). Der Balken entspricht 0,5 μm .

Sowohl HCN3 (Abb. 3.20), als auch HCN2 (Abb. 3.9) können im Zapfen nachgewiesen werden. Die beiden HCN-Kanäle unterscheiden sich aber in ihrer subzellulären Lokalisation. Während HCN2-spezifische Antikörper die Zellkörper in der ONL färben, läßt sich das HCN3-Kanalprotein hauptsächlich an den Zapfenendfüßen in der OPL nachweisen. Eine direkte Ko-Lokalisation der beiden HCN-Kanäle war bislang noch nicht möglich, da alle verfügbaren Antikörper in einer Spezies (Ratte) hergestellt worden waren. Für weiterführende Experimente ist die Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen mindestens einen dieser beiden Typen von HCN-Kanälen geplant.

3.3.3 Immunpräzipitationen

In den vorangegangenen Abschnitten 3.3.1 und 3.3.2 konnte gezeigt werden, daß in der Rattenretina alle vier HCN-Kanaltypen exprimiert werden. Eine Ko-Lokalisation der Kanäle konnte dabei nur für HCN1 und HCN4 in Typ 5-Zapfenbipolarzellen, sowie einigen Ganglienzellen nachgewiesen werden. In diesen Zellen besteht daher die Möglichkeit, daß die beiden HCN-Kanaltypen als heterooligomere Komplexe vorliegen. Als nächstes sollte untersucht werden, ob sich solche Komplexe tatsächlich in der Rattenretina nachweisen lassen. Auch für diese Untersuchungen konnten die hergestellten Antikörper eingesetzt

werden. Der Nachweis von heterooligomeren Komplexen aus HCN1 und HCN4 sollte mit Hilfe der "Immunpräzipitation" erfolgen.

Die Immunpräzipitation ist eine Methode zur Reinigung von Proteinen, bei der die sehr spezifischen und hochaffinen Wechselwirkungen von Antigen und Antikörper ausgenutzt werden (Bonifacino et al., 1999). Der Antikörper wird an eine Säulenmatrix - beispielsweise Protein G-Sepharose - gekoppelt und mit einem Proteingemisch, welches das Antigen enthält, inkubiert. Der Komplex aus Antigen, Antikörper und Säulenmatrix kann leicht von den übrigen Bestandteilen des Proteingemischs getrennt werden. Die erfolgreiche Präzipitation des Antigens kann durch Westernblot-Analysen überprüft werden.

Viele Proteine sind Teil eines Proteinkomplexes und treten in Wechselwirkung mit anderen Proteinen. Diese Protein-Protein-Wechselwirkungen bleiben - zumindest teilweise - bei der Immunpräzipitation erhalten. Deshalb wird neben dem eigentlichen Antigen auch der Interaktionspartner präzipitiert. Mit dieser sogenannten Ko-Immunpräzipitation (Elion, 1999) können die Wechselwirkungen von Proteinen nach heterologer Expression in Zelllinien, aber auch in nativem Gewebe untersucht werden.

In den folgenden drei Abschnitten wird zunächst beschrieben, wie die Methode der Immunpräzipitation optimiert wurde. Abschnitt 3.3.3.2 beschäftigt sich mit der Ko-Immunpräzipitation von hHCN1 und hHCN4 aus ko-transfizierten HEK 293-Zellen, während in 3.3.3.3 die Immunpräzipitationsexperimente an der Rattenretina besprochen werden.

3.3.3.1 Optimierung der Immunpräzipitation

Suche nach geeigneten Detergenzien:

Für die Immunpräzipitationen müssen die HCN-Kanäle aus Membranen von transfizierten HEK 293-Zellen solubilisiert werden. Die Solubilisierungseffizienz eines Detergenz wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst; dazu gehören u.a. die Hydrophobizität und die Gesamtladung des zu solubilisierenden Proteins, sowie die Lipidzusammensetzung der Zellmembran. Es wurden daher mehrere Detergenzien getestet, ob sie sich zur Solubilisierung von HCN-Kanalproteinen aus HEK 293-Zellmembranen eignen. Tab. 3.5 gibt einen Überblick über die getesteten Detergenzien. Es handelt sich dabei in allen Fällen um nicht-denaturierende, nicht-ionische bzw. zwitterionische Detergenzien, die die Wechselwirkungen zwischen Proteinen nur geringfügig beeinflussen.

Detergenz	Konz. zur Solubilisierung
Triton X-100	1 % (v/v)
Dodecylmaltosid	20 mM
Octylglycosid	40 mM
CHAPS	18 mM
Digitonin	1 % (v/v)
Deoxycholat	12 mM
Nonidet P40	10 mM

Tab. 3.5: Übersicht über die getesteten Detergenzien. Die Spalte "Konz. zur Solubilisierung" gibt an, in welcher Endkonzentration das jeweilige Detergenz eingesetzt wurde.

Die Solubilisierung von Membranproteinen aus transfizierten HEK 293-Zellen erfolgte wie es unter 2.12.1 am Beispiel von Triton X-100 beschrieben ist. Die Endkonzentrationen der getesteten Detergenzien während der Inkubation mit den Membranproteinen sind in Tab. 3.5 angegeben. Nach der Inkubation wurde überprüft, wieviel des eingesetzten HCN-Kanalproteins im Überstand mit den solubilisierten Membranproteinen nachzuweisen war und wieviel im Membranpellet zurückblieb. Dazu wurden gleiche Proteinmengen aus beiden Fraktionen durch Gelelektrophorese (2.13) aufgetrennt und mit Hilfe der Westernblot-Technik (2.14) analysiert. Abb. 3.21 zeigt am Beispiel von hHCN1-HA-exprimierenden HEK 293-Zellen die solubilisierende Wirkung mehrerer Detergenzien.

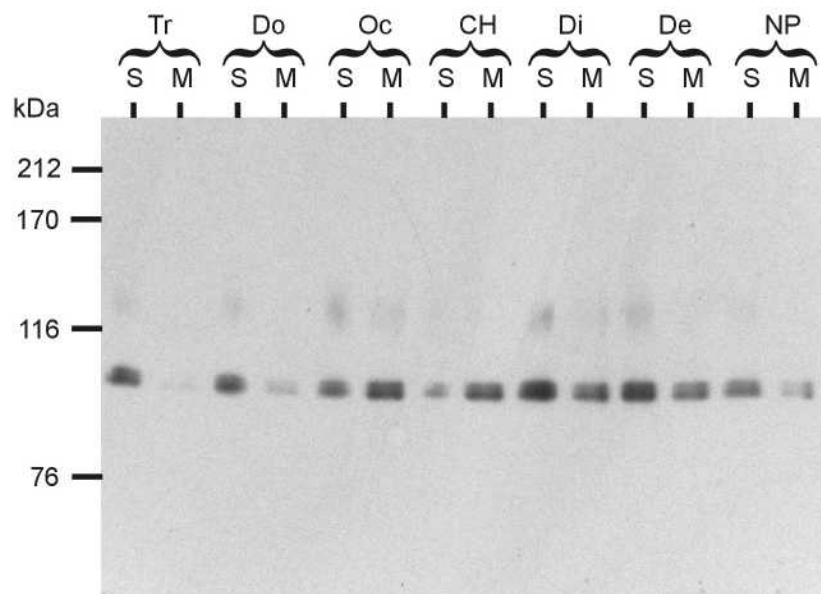


Abb. 3.21 Test der Solubilisierungseigenschaften verschiedener Detergenzien für Membranproteine von hHCN1-HA-exprimierenden HEK 293-Zellen. Es wurden jeweils 5 µg solubilierte Proteine (S) bzw. nicht-solubilierte Proteine (M) mit Hilfe eines 7,5 %igen SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Der immunologische Nachweis von hHCN1-HA erfolgte durch den Antikörper rat-αHA (Roche) in einer 1:1.000-Verdünnung. Links sind die Molekulargewichte des Größenstandards in kDa angegeben. Tr, Triton X-100; Do, Dodecylmaltosid; Oc, Octylglycosid; CH, CHAPS; Di, Digitonin; De, Deoxycholat; NP, Nonidet P-40

hHCN1-HA läßt sich besonders gut mit den Detergenzien Triton X-100, Dodecylmaltosid und Nonidet P-40 solubilisieren; d.h. es kann ein größerer Anteil des eingesetzten Kanalproteins in der Fraktion mit den solubilisierten Membranproteinen nachgewiesen werden, als in der Fraktion mit den nicht-solubilisierten Proteinen zurückbleibt. CHAPS dagegen ist nicht zur Solubilisierung von hHCN1-HA geeignet. Alle anderen Detergenzien liefern akzeptable Ergebnisse. In gleicher Weise wurde getestet, welche dieser Detergenzien sich zur Solubilisierung von hHCN4, rHCN2 bzw. rHCN3 eignen (nicht gezeigt). Die Ergebnisse dieser Tests wurden zusammengefaßt und miteinander verglichen. Daraus ergab sich, daß die Detergenzien Triton X-100 und Dodecylmaltosid die vier unterschiedlichen HCN-Kanalproteine gleich gut solubilisieren und daher zum Einsatz bei einer (Ko-)Immunpräzipitation geeignet sind. Die nachfolgenden Experimente wurden mit Triton X-100 als Detergenz durchgeführt.

Test der geeigneten Antikörper/Säulenmatrix:

Zur Herstellung einer Antikörper/Säulenmatrix wurde der monoklonale Antikörper SHG-1E5 (HCN4) an Protein G-Sepharose geheftet (2.18.1) und die Antikörper/Säulenmatrix für Immunpräzipitationen (2.18.2) mit solubilisierten Membranproteinen aus pcA-hHCN4-transfizierten HEK 293-Zellen eingesetzt. Das solubilierte Proteingemisch wurde zunächst mit Protein G-Sepharose vorinkubiert, an die kein Antikörper gekoppelt war. Dadurch wurden Bestandteile aus dem Proteingemisch entfernt, die unspezifisch mit dem Säulenmaterial wechselwirkten. Danach wurde das vorinkubierte Proteingemisch mit der Antikörper/Säulenmatrix inkubiert. Proteine, die nicht gebunden haben (Durchfluß), wurden anschließend abgetrennt und die Säule siebenmal mit Puffer D (2.18.2) gewaschen. Durch Inkubation mit dem Elutionspuffer (2.18.2) wurden gebundene Proteine von der Antikörper/Säulenmatrix eluiert. Zur Auswertung der Immunpräzipitation wurden gleiche Mengen der verschiedenen Fraktionen auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf einer PVDF-Membran immobilisiert (2.14). Abb. 3.22 zeigt das Ergebnis einer solchen Immunpräzipitation.

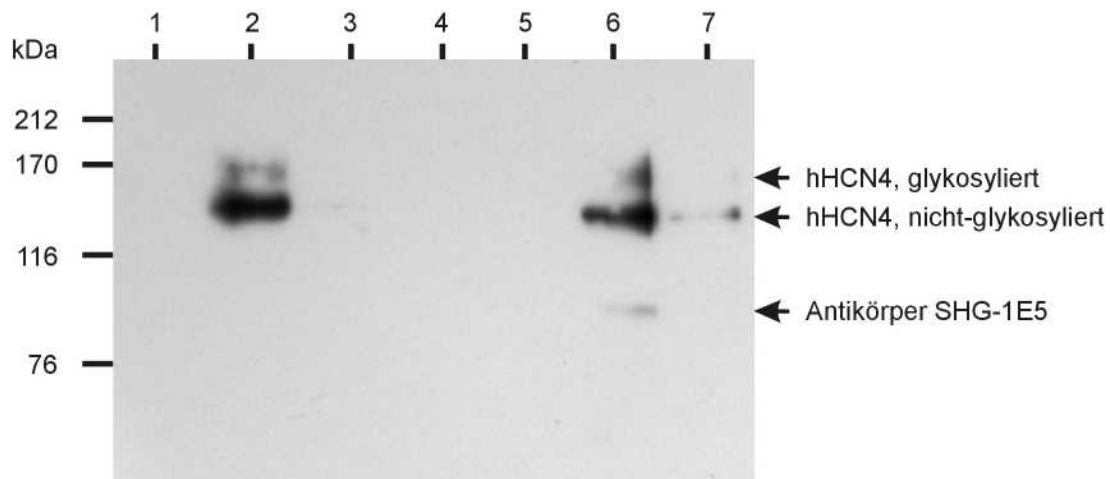


Abb. 3.22: Immunpräzipitation mit solubilisierten Membranproteinen von hHCN4-exprimierenden HEK 293-Zellen an einer SHG-1E5/Säulenmatrix. Dargestellt ist der typische Verlauf einer Immunpräzipitation. Die aufgetragenen Proben entsprechen 4 µg solubilisierter Membranproteine von transfizierten HEK 293-Zellen. Von den zu testenden Säulenmaterialien wurden je 10 µl in 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 3 min in siedendem Wasser inkubiert. Die Proben wurden mit Hilfe eines 7,5 %igen SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Der immunologische Nachweis erfolgte durch den Antikörper SHG-1E5 in einer 1:50-Verdünnung. Links sind die Molekulargewichte des Größenstandards in kDa angegeben. Rechts markieren Pfeile das Kanalprotein hHCN4 und den Antikörper SHG-1E5, der nicht vollständig an die Säulenmatrix gekoppelt war und durch den Elutionspuffer heruntergewaschen wurde. Spur 1: Protein G-Sepharose nach Vorinkubation; Spur 2: solubalisierte Membranproteine (Einsatz); Spur 3: Durchfluß; Spur 4: 1. Waschschrift; Spur 5: 7. Waschschrift; Spur 6: Eluat; Spur 7: SHG-1E5/Säulenmatrix nach Immunpräzipitation.

Mit Hilfe des Antikörpers SHG-1E5 läßt sich hHCN4 in einer Membranpräparation von transfizierten HEK 293-Zellen nachweisen (Abb. 3.22, Spur 2). Nach der Inkubation mit der SHG-1E5/Säulenmatrix kann hHCN4 weder im Durchfluß (Spur 3), noch in den verschiedenen Waschfraktionen (Spuren 4 und 5) detektiert werden. Durch Inkubation mit dem Elutionspuffer kann der größte Anteil an hHCN4 wieder von der SHG-1E5/Säulenmatrix eluiert werden (Spur 6). Bei dieser Elution werden häufig auch Antikörper, die nicht vollständig an Protein G gekoppelt sind, von der Säule gelöst ("Bluten"). Die Bande bei ca. 95 kDa (Spur 6) entspricht beispielsweise zwei schweren Antikörperketten, die bei der Herstellung der Antikörper/Säulenmatrix durch Dimethylpimelimidat quervernetzt wurden, und ebenfalls vom sekundären Anti-Ratte-Antikörper erkannt werden. Ein geringerer Anteil an hHCN4 bleibt jedoch an der SHG-1E5/Säulenmatrix gebunden (Spur 7). Daß auch dieser Rest spezifisch an die Antikörper/Säulenmatrix gebunden hatte, zeigt ein Vergleich mit Protein G-Sepharose, die zur Präinkubation des Proteingemischs verwendet wurde (Spur 1). In dieser Fraktion ist kein hHCN4-Kanalprotein nachzuweisen.

Mit Hilfe der SHG-1E5/Säulenmatrix ist es also möglich, eine quantitative Immunpräzipitation von hHCN4 aus transfizierten HEK 293-Zellen durchzuführen. Auf gleiche Weise wurde getestet, ob sich die Antikörper RTQ-7C3 und RTQ-8D12 zur Herstellung einer

Antikörper/Säulenmatrix eignen (nicht gezeigt). In beiden Fällen gelang es jedoch nicht, hHCN1 quantitativ aus Membranpräparationen von transfizierten HEK 293-Zellen zu präzipitieren. Möglicherweise besitzen die Antikörper eine zu geringe Affinität zum Antigen oder binden nur schlecht an Protein G.

3.3.3.2 Immunpräzipitationen mit Membranproteinen aus transfizierten HEK 293-Zellen

Die Verteilung der HCN-Kanäle in der Rattenretina (3.3.2) ließ vermuten, daß HCN1 und HCN4 heterooligomere Komplexe bilden. Deshalb wurden zunächst Immunpräzipitationsexperimente mit HEK 293-Zellen durchgeführt. Das Expressionssystem hat den Vorteil gegenüber nativem Gewebe, daß bestimmt werden kann, welcher HCN-Kanaltyp exprimiert wird. Für die Experimente wurden HEK 293-Zellen entweder mit dem Plasmid pcA-hHCN1 oder pcA-hHCN4 transfiziert (2.9.2). Außerdem wurden HEK 293-Zellen mit beiden Plasmiden ko-transfiziert. Um nachzuweisen, daß bei der Ko-Transfektion auch tatsächlich beide Kanalproteine in einer Zelle gleichzeitig exprimiert werden, wurden ko-transfizierte HEK 293-Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen HCN1 und HCN4 doppelgefärbt (2.15.1). Abb. 3.23 zeigt, daß sowohl Zellen vorkommen, die ausschließlich hHCN1 (rot) bzw. hHCN4 (grün) exprimieren, als auch Zellen, die beide Kanalproteine exprimieren (gelb). In ca. 50 % der hHCN4-positiven Zellen kann auch hHCN1 nachgewiesen werden.

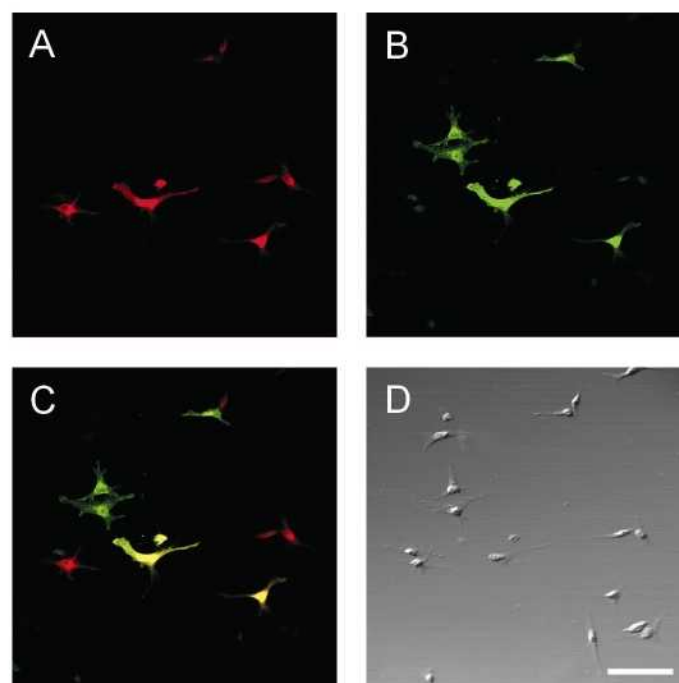


Abb. 3.23: Nachweis der Ko-Expression von hHCN1 und hHCN4 in ko-transfizierten HEK 293-Zellen. HEK 293-Zellen wurden mit pcA-hHCN1 und pcA-hHCN4 ko-transfiziert. Die fixierten Zellen wurden mit den Antikörpern PPc73K (1:400-Verd.) und RTQ-7C3 (1:100-Verd.) doppelgefärbt. hHCN4-positive Zellen (A, grün) und hHCN1-positive Zellen (B, rot) erscheinen in der Überlagerung (C) gelb gefärbt, wenn sie die beiden Kanalproteine ko-exprimieren. D) Überblick über den abgebildeten Bereich mit einer Nomarski Optik. Der Balken entspricht 100 μm .

Zur Durchführung der Ko-Immunpräzipitation wurden Membranproteine (2.10.1) von hHCN4- bzw. hHCN1-exprimierenden HEK 293-Zellen, sowie hHCN4/hHCN1-exprimierenden HEK 293-Zellen solubilisiert (2.12.1) und mit der SHG-1E5/Säulenmatrix (3.3.3.1) inkubiert. Die (Ko-)Immunpräzipitation erfolgte wie unter 2.18.2 beschrieben. Zur Versuchsauswertung wurden die verschiedenen Fraktionen durch Gelelektrophorese (2.13) aufgetrennt und immunologisch nachgewiesen (2.14). Der Nachweis von hHCN4 erfolgte durch den Antikörper SHG-1E5, der Nachweis von hHCN1 durch RTQ-7C3. Abb. 3.24 zeigt das Ergebnis eines solchen Experiments.

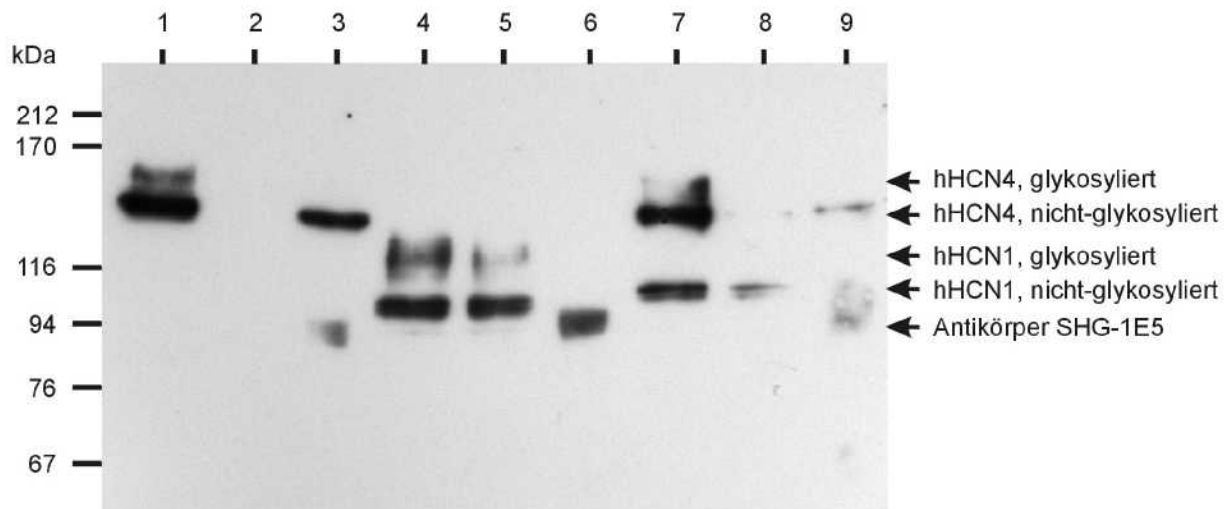


Abb. 3.24: (Ko-)Immunpräzipitation von hHCN4 und hHCN1 aus transfizierten HEK 293-Zellen. Die aufgetragenen Proben entsprechen 10 μg solubilisierter Membranproteine von transfizierten HEK 293-Zellen. Die Proben wurden mit Hilfe eines 7,5 %igen SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Der immunologische Nachweis erfolgte durch die Antikörper SHG-1E5 (1:50-Verd.) und RTQ-7C3 (1:500-Verd.). Links sind die Molekulargewichte in kDa angegeben. Rechts markieren Pfeile die Kanalproteine hHCN4 und hHCN1, sowie den herunterblutenden Antikörper. Spur 1: Einsatz hHCN4-exprimierende Zellen; Spur 2: Durchfluß hHCN4-exprimierende Zellen; Spur 3: Eluat hHCN4-exprimierende Zellen; Spur 4: Einsatz hHCN1-exprimierende Zellen; Spur 5: Durchfluß hHCN1-exprimierende Zellen; Spur 6: Eluat hHCN1-exprimierende Zellen; Spur 7: Einsatz hHCN4/hHCN1-ko-exprimierende Zellen; Spur 8: Durchfluß hHCN4/hHCN1-ko-exprimierende Zellen; Spur 9: Eluat hHCN4/hHCN1-ko-exprimierende Zellen.

Wird hHCN4 alleine exprimiert, kann das Kanalprotein quantitativ durch die SHG-1E5/Säulenmatrix präzipitiert werden (Abb. 3.24, Spuren 1 bis 3). Der größte Anteil an hHCN4 (Spur 1) läßt sich im Säulenuat nachweisen (Spur 3), während im Durchfluß hHCN4 nicht zu detektieren ist (Spur 2). Es ist wahrscheinlich, daß ein geringer Anteil an hHCN4 nicht von der SHG-1E5/Säulenmatrix eluiert werden kann (vgl. Abb. 3.22, Spuren 6 und 7). Bei der diffusen Bande bei ca. 95 kDa in Spur 3 handelt es sich um den Antikörper SHG-1E5, der von der Säulenmatrix "blutete".

Wird hHCN1 alleine exprimiert, kann das Kanalprotein nicht durch die SHG-1E5/Säulenmatrix präzipitiert werden (Abb. 3.24, Spuren 4 bis 6). Nahezu die gesamte Menge an hHCN1, die für die Immunpräzipitation eingesetzt wurde (Spur 4), kann im Durchfluß nachgewiesen werden (Spur 5). Ein geringer Teil wurde wahrscheinlich während der Waschschritte von der Säule gewaschen, da sich im Eluat hHCN1 nicht mehr nachweisen läßt (Spur 6). Auch in diesem Eluat können Antikörper detektiert werden, die von der Säulenmatrix "bluteten" (vergleiche Spur 3).

Wenn hHCN4 und hHCN1 ko-exprimiert worden sind, kann hHCN1 nicht durch die SHG-1E5/Säulenmatrix ko-präzipitiert werden (Abb. 3.24, Spuren 7 bis 9). Sowohl hHCN4, als auch hHCN1 lassen sich im Einsatz nachweisen (Spur 7). Die Signale der beiden HCN-Kanäle sind ungefähr gleich stark. Ähnlich wie bei den einzel-transfizierten HEK 293-Zellen läßt sich der größte Teil von hHCN1 im Durchfluß nachweisen (Spur 8), während sich im Eluat keine nachweisbare Menge an hHCN1 mehr befindet (Spur 9). Im Gegensatz dazu sind für hHCN4 deutliche Unterschiede zwischen einzel- und ko-transfizierten Zellen zu beobachten. So läßt sich bei den ko-transfizierten Zellen nur noch eine geringe Menge an hHCN4 im Eluat (Spur 9) nachweisen. Gleichzeitig kann bereits im Durchfluß hHCN4 detektiert werden (Spur 8).

Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt: Die Ko-Expression von hHCN4 und hHCN1 führt nicht zu einer Ko-Immunpräzipitation von hHCN1 und hHCN4 an einer HCN4-Antikörpersäule. Stattdessen scheint die Affinität des hHCN4-Kanalproteins für den Antikörper herabgesetzt zu sein, so daß die Immunpräzipitation von hHCN4 nicht mehr vollständig war. Wie läßt sich die geringere Wechselwirkung zwischen hHCN4-Kanalprotein und HCN4-Antikörper erklären? Obwohl Westernblot-Analysen nicht auf eine Kreuzreaktion der HCN4-Antikörper hindeuten (vergleiche 3.2.4 und 3.3.1), kann hHCN1 möglicherweise in geringem Umfang mit dem HCN4-Antikörper kreuzreagieren. In diesem Fall kompetitiert hHCN1 mit hHCN4 um die Bindung an den HCN4-Antikörper, auch wenn ausschließlich homooligomere hHCN1-Komplexe vorliegen. Deshalb wurden

Membranproteine aus hHCN4-exprimierenden HEK 293-Zellen mit Membranproteinen aus hHCN1-exprimierenden Zellen gemischt und für die Immunpräzipitation eingesetzt. In diesem Versuchsansatz kann man davon ausgehen, daß ausschließlich homooligomere Komplexe von hHCN4 bzw. hHCN1 vorliegen. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt und mit Hilfe der Westernblot-Technik (2.14) ausgewertet. Da die Hintergrundfärbung durch die "blutenden" Säulen jedesmal sehr hoch war, sind die Ergebnisse nicht als Abbildung gezeigt. Die Ergebnisse entsprachen jedoch den Experimenten mit einzel-transfizierten HEK 293-Zellen: hHCN4 wurde durch die SHG-1E5/Säulenmatrix quantitativ präzipitiert, während sich die gesamte Menge an hHCN1 im Durchfluß nachweisen ließ. hHCN1 zeigt also keine Kreuzreaktion mit dem HCN4-Antikörper. Die in Abb. 3.24 (Spuren 7-9) zu beobachtende, verminderte Wechselwirkung zwischen hHCN4-Kanalprotein und HCN4-Antikörper scheint daher eine Folge der Ko-Expression von hHCN4 mit hHCN1 zu sein. Was immer die richtige Erklärung sein mag, ein direkter Nachweis heterooligomerer Komplexe ist nicht gelungen.

3.3.3.3 Immunpräzipitationen mit Membranproteinen der Rattenretina

In Abschnitt 3.3.2 wurde gezeigt, daß HCN1 und HCN4 in Typ 5-Zapfenbipolarzellen und einigen Ganglienzellen der Rattenretina ko-exprimiert werden. Daher sollte untersucht werden, ob sich heterooligomere Komplexe der beiden Kanalproteine in der Rattenretina durch Ko-Immunpräzipitationen nachweisen lassen.

Zunächst wurde getestet, ob sich rHCN1 und rHCN4 genau wie die heterolog exprimierten Kanalproteine durch das Detergenz Triton X-100 aus der Zellmembran solubilisieren lassen. Dazu wurden Membranproteine aus der Rattenretina mit Triton X-100 behandelt (2.12.1), gleiche Mengen von solubilierten Proteinen und nicht-solubilierten Proteinen durch SDS-Gelelektrophorese (2.13) aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert (2.14.1). Der immunologische Nachweis erfolgte mit den Antikörpern RTQ-7C3 und SHG-1E5. Abb. 3.25 zeigt die Ergebnisse der Solubilisierungstests.

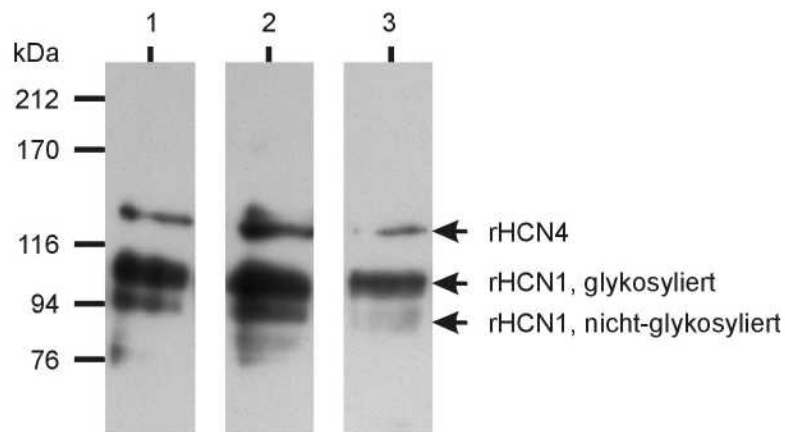


Abb. 3.25: Solubilisierung von Membranproteinen der Rattenretina mit Triton X-100. Aufgetragen sind je 50 µg unbehandelte (Spur 1), solubilierte (Spur 2) und nicht-solubilierte (Spur 3) Membranproteine der Rattenretina. Die Proben wurden mit Hilfe eines 7,5 %igen SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Der immunologische Nachweis erfolgte durch die Antikörper RTQ-7C3 (1:250-Verd.) und SHG-1E5 (1:5-Verd.). Links sind die Molekulargewichte der Größenstandards in kDa angegeben. Rechts markieren Pfeile die Kanalproteine rHCN4 und rHCN1.

rHCN1 und rHCN4 lassen sich mit Triton X-100 in ausreichendem Maße aus der Zellmembran solubilisieren. Wie in Abschnitt 3.3.1 bereits beschrieben wurde, läßt sich rHCN4 als eine einzelne Bande bei 130 kDa nachweisen, während rHCN1 in einer glykosylierten (110 kDa) und einer nicht-glykosylierten (102 kDa) Form vorliegt (Abb. 3.25, Spur 1). Bei einem Vergleich der Spuren 2 und 3 fällt auf, daß sich die nicht-glykosylierte Form von rHCN1 wesentlich besser solubilisieren läßt, als die glykosylierte Form des Kanalproteins. Bei der nicht-glykosylierten Form von rHCN1 handelt es sich wahrscheinlich um Kanalproteine, die im Golgi-Apparat prozessiert werden und noch nicht in die Zellmembran eingebaut worden sind. Da nicht klar ist, zu welchem Zeitpunkt sich die Peptikketten zu einem funktionellem HCN-Kanal zusammenlagern, könnten die nicht-glykosylierten Kanalproteine u.U. die Ergebnisse der Ko-Immunpräzipitation verfälschen.

Als nächstes galt es zu klären, wieviel Protein für eine Immunpräzipitation eingesetzt werden muß. In Abschnitt 3.3.2 wurde gezeigt, daß nicht alle Zellen in der Rattenretina, die rHCN4 exprimieren, auch rHCN1-positiv sind. Somit kann nur ein Bruchteil der in der Retina nachweisbaren Menge von rHCN4 überhaupt in einem heterooligomeren Komplex mit rHCN1 vorliegen. Um diesen Bruchteil genauer zu quantifizieren, wurde die Fluoreszenzintensität von HCN4-gefärbten Schnitte der Rattenretina (vgl. Abb. 3.14) mit Hilfe eines Konfokalen Laser Mikroskops und dem dazugehörigen Computerprogramm TCS NT (Leica) bestimmt. Die Fluoreszenzintensität in dem Bereich der IPL, in dem rHCN4 und rHCN1 kolo- lokalisiert sind, wurde zur Fluoreszenzintensität des gesamten Schnitts ins Verhältnis gesetzt. Dies ergab, daß maximal 10 % der rHCN4-Immunfluoreszenz in der Rattenretina mit der

rHCN1-Immunfluoreszenz in der IPL übereinstimmt. Daraus folgt, daß bei einer Immunpräzipitation von rHCN4 nur maximal 1/10 des rHCN4-Kanalproteins im Eluat als heterooligomerer Komplex mit rHCN1 vorliegen könnte. Diese geringe Menge könnte durchaus unter der Nachweisgrenze liegen.

Die Immunpräzipitation von rHCN4 aus der Rattenretina an einer SHG-1E5/Säulenmatrix erfolgte wie unter 2.18.2 beschrieben. Es wurden 550 µg solubilisierter Membranproteine eingesetzt. Die verschiedenen Fraktionen der Immunpräzipitation wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (2.13) und auf eine PVDF-Membran transferiert (2.14.1). Der immunologische Nachweis erfolgte mit den Antikörpern RTQ-7C3 und SHG-1E5. Das Experiment wurde zweimal mit verschiedenen Inkubationszeiten durchgeführt (nicht gezeigt). Beide Male war das Hintergrundsignal durch den "blutenden" Antikörper so hoch, daß nicht zwischen spezifischen und unspezifischen Signalen unterschieden werden konnte. Das Verhältnis verbesserte sich auch nicht, wenn mehr Membranprotein (660 µg) zur Immunpräzipitation eingesetzt wurde.

Sollten rHCN1 und rHCN4 in der Rattenretina tatsächlich heterooligomere Komplexe bilden, so ist deren Menge so gering, daß sie nicht durch Immunpräzipitation nachgewiesen werden können. Welche weiteren Möglichkeiten existieren, heterooligomere Komplexe aus HCN-Kanalproteinen nachzuweisen, wird im Kapitel "Diskussion" besprochen werden.

3.4 Charakterisierung der HCN-Kanäle im Ratten- und Mausgehirn

Elektrophysiologische Messungen von HCN-Strömen und Untersuchungen zur Genexpression der HCN-Kanalgene ergaben, daß HCN-Kanäle im Zentralnervensystem (ZNS) der Säugetiere weit verbreitet sind (Übersicht: Pape, 1996; Santoro & Tibbs, 1999; Gauss & Seifert, 2000; Kaupp & Seifert, 2001). Abschnitt 3.3 beschäftigte sich mit der Lokalisation der HCN-Kanäle in der Rattenretina. Bereits in dieser kleinen Region des ZNS ergeben sich für die vier HCN-Kanaltypen große Unterschiede im zellulären und subzellulären Expressionsmuster. Dies kann ein Hinweis darauf sein, daß die verschiedenen HCN-Kanaltypen unterschiedliche Funktionen in den Zellen erfüllen. Eine Aufgabe für die Zukunft wird daher sein, die Expressionsmuster der HCN-Kanäle in anderen Abschnitten des ZNS aufzuklären. In Abschnitt 3.4.1 wird die Expression der HCN-Kanäle im Ratten- und Mausgehirn mit Hilfe der Westernblot-Technik (2.14) untersucht. Abschnitt 3.4.2 umfaßt erste Untersuchungen zur Lokalisation der HCN-Kanäle im Rattengehirn.

3.4.1 Westernblot-Analysen mit Membranproteinen des Ratten- und Mausgehirns

Die Expression der HCN-Kanäle im Ratten- und Mausgehirn wurde mit Hilfe der Westernblot-Technik untersucht. Dafür wurden Membranproteine isoliert (2.10), durch Gelelektrophorese aufgetrennt (2.13) und auf PVDF-Membranen immobilisiert (2.14.1). Der immunologische Nachweis erfolgte durch spezifische Antikörper gegen den jeweiligen Typ von HCN-Kanal. Abb. 3.26 zeigt die Westernblot-Analysen für HCN1, HCN2 und HCN4.

HCN1 (Abb. 3.26 A):

In Spur 1 sind als Positivkontrolle Membranproteine von rHCN1-exprimierenden HEK 293-Zellen aufgetragen. Im Rattengehirn (Spur 2) wird ähnlich wie in der Rattenretina (vergleiche Abb. 3.7 A) die glykosylierte Form des Kanalproteins mit einem Molekulargewicht von 110 kDa detektiert. Die zweite Bande, die in Spur 2 bei 102 kDa zu sehen ist, entspricht der nicht-glykosylierten Form von rHCN1. Im Mausgehirn (Spur 3) wird eine Bande detektiert, die das gleiche Molekulargewicht besitzt wie das glykosylierte rHCN1-Kanalprotein.

HCN2 (Abb. 3.26 B):

Der Antikörper QQA-4A6 erkennt das gleiche Bandenmuster wie QQA-3G7 in Abb. 3.7. B. In Präparationen von Membranproteinen aus rHCN2-exprimierenden HEK 293-Zellen (Spur 1) werden eine Doppelbande bei 98 kDa und eine diffusere Bande bei ca. 120 kDa nachgewiesen. Sowohl im Rattengehirn (Spur 2), als auch im Mausgehirn (Spur 3) wird eine Bande bei ca. 110 kDa detektiert. Dieses Molekulargewicht entspricht der glykosylierten Form von rHCN2 in der Rattenretina (vergleiche Abb. 3.7 B).

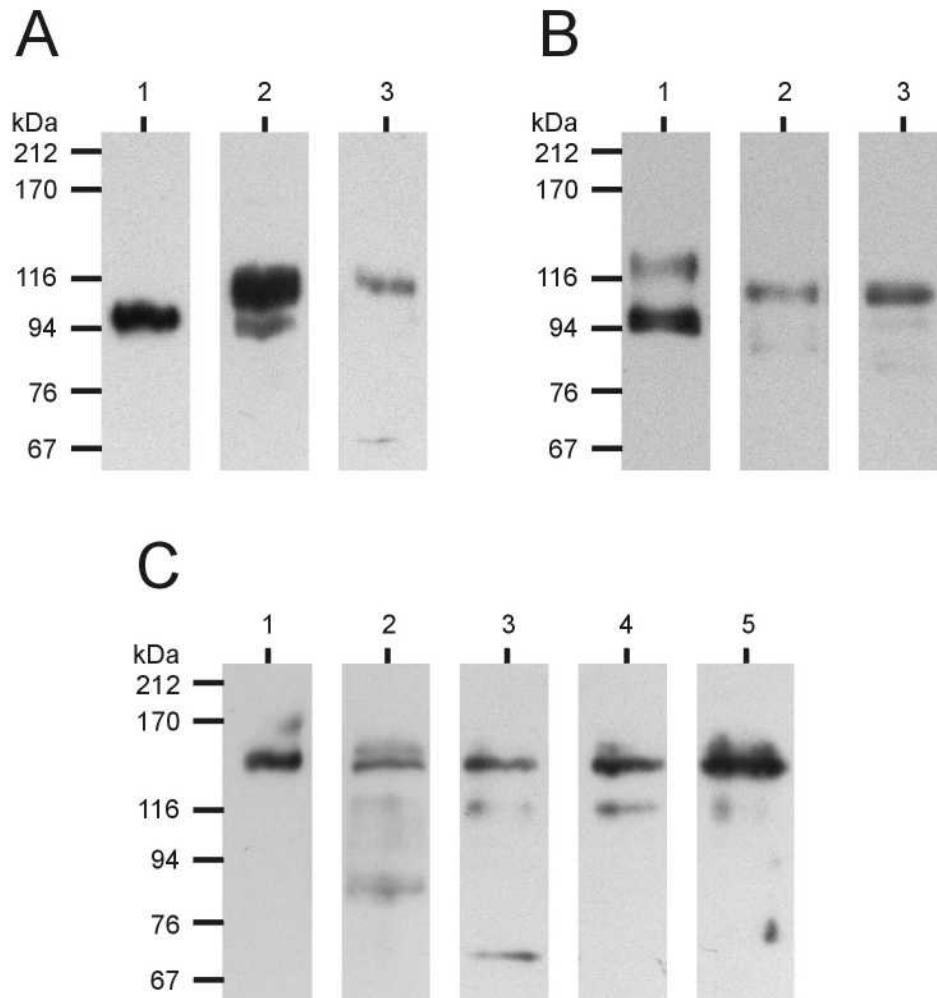


Abb. 3.26: Westernblot-Analysen von HCN1, HCN2 und HCN4 im Ratten- und Mausgehirn. Die Membranproteine wurden mit Hilfe von 7,5 %igen SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und auf PVDF-Membranen immobilisiert. Der immunologische Nachweis erfolgte durch die Antikörper RTQ-7C3 (A; 1:250-Verd.), QQA-4A6 (B; 1:20-Verd.) bzw. SHG-1E5 (C; 1:5-Verd.). **A)** HCN1: Aufgetragen waren 1 µg Membranproteine aus transfizierten HEK 293-Zellen (Spur 1), 25 µg Membranproteine aus Rattengehirn (Spur 2), bzw. 25 µg Membranproteine aus Mausgehirn (Spur 3). **B)** HCN2: Aufgetragen waren 3 µg Membranproteine aus transfizierten HEK 293-Zellen (Spur 1), 30 µg Membranproteine aus Rattengehirn (Spur 2), bzw. 60 µg Membranproteine aus Mausgehirn (Spur 3). **C)** HCN4: Aufgetragen waren 7 µg Membranproteine aus transfizierten HEK 293-Zellen (Spur 1), 200 µg Membranproteine aus Rattengehirn (Spur 2), 75 µg Membranproteine aus Mausgehirn (Spur 3), 50 µg Membranproteine aus Mausgehirn/Thalamus (Spur 4), bzw. 50 µg Membranproteine aus Mausgehirn/olfaktorisches Gewebe (Spur 5).

HCN4 (Abb. 3.26 C):

Auch durch den HCN4-Antikörper SHG-1E5 werden im Rattengehirn (Spur 2) die gleichen Banden (ca. 130 kDa) detektiert wie in der Rattenretina (vgl. Abb. 3.7 D). Zum Vergleich sind in Spur 1 Membranproteine aus transfizierten HEK 293-Zellen aufgetragen. Im Mausgehirn (Spur 3) läßt sich ebenfalls ein Protein mit einem Molekulargewicht von 130 kDa nachweisen. Im Gegensatz zu HCN1 und HCN2 wird HCN4 nicht ubiquitär im Gehirn exprimiert, sondern ist auf einige wenige Gehirnnareale beschränkt (s. Abschnitt 3.1;

Moosmang et al., 1999; Monteggia et al., 2000). Für die Spuren 4 und 5 wurden daher Membranproteine aus Arealen des Mausgehirns präpariert, in denen eine stärkere HCN4-Genexpression nachgewiesen werden kann (Spur 4: Thalamus; Spur 5: Bulbus Olfactorius, Olfaktorischer Cortex und Piriformer Cortex). Tatsächlich ist das HCN4-Signal in diesen Spuren stärker, als in einer Präparation aus Gesamthirn (Spur 3). Bei den zusätzlichen Banden, die in den Spuren mit Membranproteinen aus Ratten- und Mausgewebe zu sehen sind, handelt es sich um Kreuzreaktionen des verwendeten sekundären Antikörpers, wie Tests ohne primären Antikörper ergaben (nicht gezeigt).

HCN1, HCN2 und HCN4 lassen sich mit Hilfe der Westernblot-Technik im Ratten- und Mausgehirn nachweisen. Der Nachweis von HCN3 gelang bisher nicht. Das Problem dabei ist die Kreuzreaktion des sekundären Anti-Ratte-Antikörpers, der zum Nachweis der monoklonalen primären Antikörper verwendet wurde. Diese Kreuzreaktion ist so stark, daß man bei höheren Proteinmengen nicht unterscheiden kann, ob es sich um unspezifische Signale durch den sekundären Antikörper oder um sehr schwache spezifische HCN3-Signale handelt. Im Gegensatz zu HCN4 gibt es auch kein Gehirnareal, in dem HCN3 stark exprimiert wird (Moosmang et al., 1999; Monteggia et al., 2000), so daß auch keine Anreicherung des HCN3-Kanalproteins möglich ist.

Neben den oben beschriebenen monoklonalen Antikörpern RTQ-7C3, QQA-4A6 und SHG-1E5 wurden auch die meisten anderen der in Tab. 3.3 aufgeführten Antikörper in Westernblot-Experimenten getestet. Die Abschnitte 8.3 und 8.4 im Anhang fassen die Ergebnisse dieser Tests zusammen.

3.4.2 Lokalisation der HCN-Kanäle im Rattengehirn

Das Expressionsmuster der HCN-Kanäle im gesamten Rattengehirn sollte mit Hilfe immunhistochemischer Methoden (2.15) untersucht werden. Die Struktur des Gehirns ist jedoch so komplex, daß es einige Jahre dauern wird, bis die zelluläre und subzelluläre Lokalisation aller vier HCN-Kanaltypen abgeschlossen sein wird. Die folgenden Ergebnisse repräsentieren daher lediglich erste Untersuchungen, die in zukünftigen Experimenten intensiviert werden müssen. Die Gewebeschnitte und immunhistochemischen Färbungen wurden freundlicherweise von Dr. T.J. Görcs (Heinrich Heine Universität Düsseldorf) angefertigt.

Gezeigt sind immunhistochemische Färbungen des Parietalen Rattencortex, der im Gegensatz zu anderen Gehirnnarealen – beispielsweise dem Thalamus – eine einfache anatomische Gliederung aufweist. Der Parietale Cortex ist Teil des Neocortex, zu dem außerdem der Präfrontale, Frontale, Temporale und Occipitale Cortex gehören. Der gesamte Neocortex wird in sechs Schichten (I bis VI) unterteilt, wobei Schicht I die Außenschicht darstellt. Zur besseren Übersicht zeigt Abb. 3.27 die Organisation der Pyramidenzellen im Cortex.

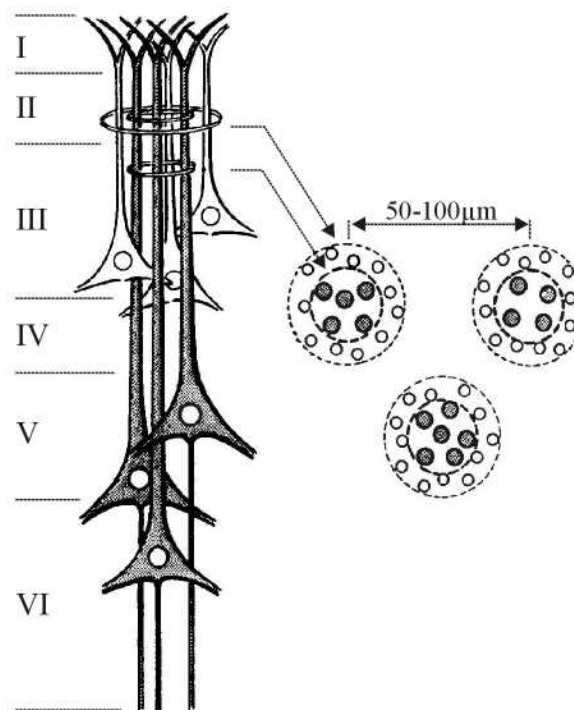


Abb. 3.27: Lage und Organisation der Pyramidenzellen im Cortex. Drei bis fünf Dendritenschäfte von Pyramidenzellen (dunkle Zellen), deren Zellkörper in den Schichten V und VI liegen, sind zu einem Bündel zusammengefaßt und stratifizieren in den Schichten I und II. Mehrere Dendriten von Pyramidenzellen (helle Zellen), deren Zellkörper in der Schicht III liegen, vereinigen sich mit diesen Bündeln. Der Abstand zwischen den Bündeln (rechts schematisiert) beträgt 50-100 µm. Links markieren Linien die Grenzen der corticalen Schichten I bis VI. Die Abbildung ist abgeändert nach Arbib et al. (1997).

Die Zellkörper der Pyramidenzellen liegen in den Schichten V und VI bzw. in Schicht III. Die Dendriten der Pyramidenzellen sind zu Bündeln zusammengefaßt und stratifizieren in den Schichten I und II, wo sie weitverzweigte Fortsätze ausbilden. Drei bis fünf Dendriten von Schicht V/VI-Pyramidenzellen bilden den Kern eines Bündels. In Schicht III vereinigen sich die Dendriten der dort befindlichen Pyramidenzellen mit den aufsteigenden Bündeln. Die Abstände zwischen solchen Bündeln betragen ca. 50-100 µm. Außer den Pyramidenzellen befinden sich in den Schichten I bis VI noch zahlreiche andere Neuronen unterschiedlicher Größe und Funktion.

Expressionsmuster von HCN1:

Der Antikörper RTQ-7C3 färbt sowohl die verzweigten Dendritenbäume (kurze Pfeile), als auch die aufsteigenden Dendritenbündel (Pfeilspitzen) von Pyramidenzellen (Abb. 3.28 A). Abb. 3.28 B zeigt in einer Ausschnittsvergrößerung die Verzweigungen der Dendriten in den Schichten I und II. Die gleichmäßige Anordnung der HCN1-positiven Dendritenbündel ist in Abb. 3.28 C gut zu erkennen. Die Abstände zwischen den Bündeln betragen ca. 70 μm , was gut mit den Literaturwerten (Arbib et al., 1997) übereinstimmt. Im Gegensatz zu den Dendriten werden die Zellkörper und Axone der Pyramidenzellen nicht angefärbt.

Auch Nicht-Pyramidenzellen werden durch RTQ-7C3 in verschiedenen Schichten des Cortex angefärbt. In den Schichten II und III lassen sich einzelne bipolare Neuronen nachweisen (Abb. 3.28 A, lange Pfeile), während bei stärkerer Vergrößerung multipolare Neuronen in Schicht V sichtbar werden (Abb. 3.28 D).

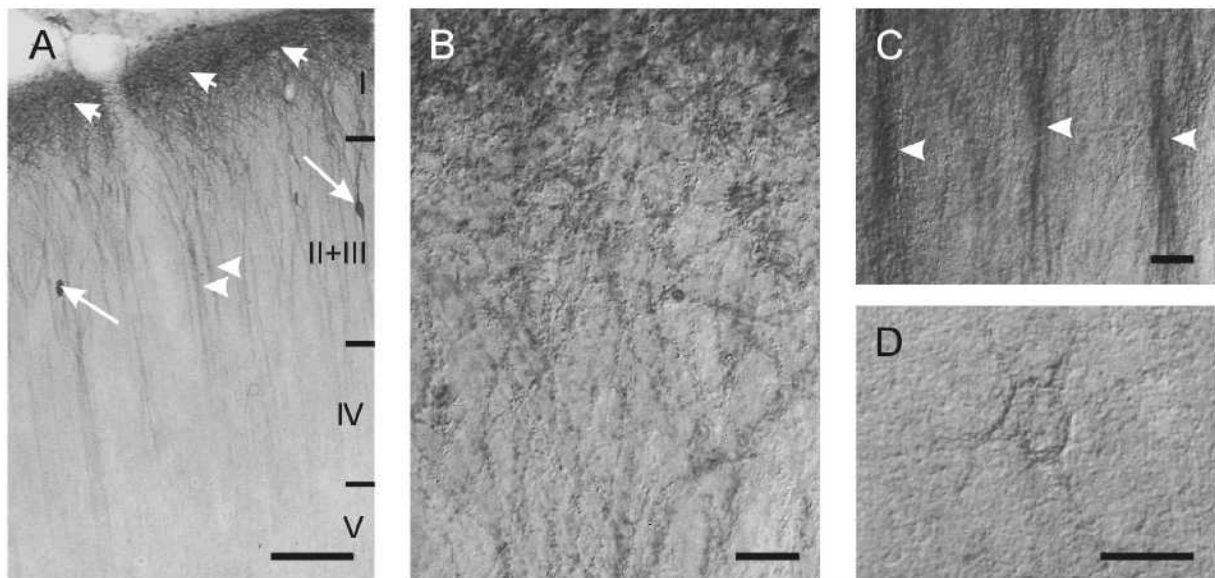


Abb. 3.28: Lokalisation von HCN1 im Parietalen Cortex. Dargestellt sind die immunhistochemischen Färbungen von Coronschnitten des Rattencortex durch den Antikörper RTQ-7C3 (1:40-Verd.). **A):** Übersicht über die corticalen Schichten I-V. Die gefärbten Dendritenbäume (kurze Pfeile) und Dendritenbündel (Pfeilspitzen) der Pyramidenzellen sind markiert. Lange Pfeile markieren HCN1-positive bipolare Neuronen in den Schichten II und III. **B):** HCN1-positive Dendritenbäume von Pyramidenzellen in den Schichten I und II. **C):** HCN1-positive Dendritenbündel von Pyramidenzellen in den Schichten III und IV. **D):** HCN1-positive multipolare Nicht-Pyramidenzelle in Schicht V. Die Balken entsprechen 100 μm in A, 20 μm in B, 25 μm in C und 25 μm in D.

Expressionsmuster von HCN2:

HCN2 läßt sich ähnlich wie HCN1 in den Dendritenbäumen (kurze Pfeile) und den aufsteigenden Dendritenbündeln (Pfeilspitzen) von Pyramidenzellen nachweisen (Abb. 3.29 A). Allerdings sind die Färbungen durch den HCN2-Antikörper QQA-4A6 wesentlich schwächer als die HCN1-spezifischen Färbungen. Abb. 3.29 B zeigt in einer Ausschnittsvergrößerung die Anordnung der HCN2-positiven Dendritenbündel von Pyramidenzellen. Die Abstände zwischen den Bündeln sind vergleichbar mit denen der HCN1-positiven Bündel. Die Anzahl der HCN2-positiven Dendritenbündel ist jedoch geringer. Durch Doppelfärbungen muß in zukünftigen Experimenten geklärt werden, ob HCN1 und HCN2 in den gleichen Dendritenbündeln ko-lokalisiert sind oder ob HCN2 möglicherweise alleine in einer Subpopulation von Pyramidenzellen exprimiert wird. Die Zellkörper der Pyramidenzellen werden durch QQA-4A6 nicht angefärbt.

Außer in Pyramidenzellen läßt sich HCN2 in sehr kleinen Neuronen nachweisen, die gleichmäßig über die Schichten III bis VI verteilt sind (Abb. 3.29 A, lange Pfeile). Abb. 3.29 C zeigt ein solches Neuron in einer Ausschnittsvergrößerung. Form und Verteilung der Zellen lassen vermuten, daß es sich um GABAerge Neuronen handelt. Dies kann jedoch nur durch immunhistochemische Doppelfärbungen geklärt werden.

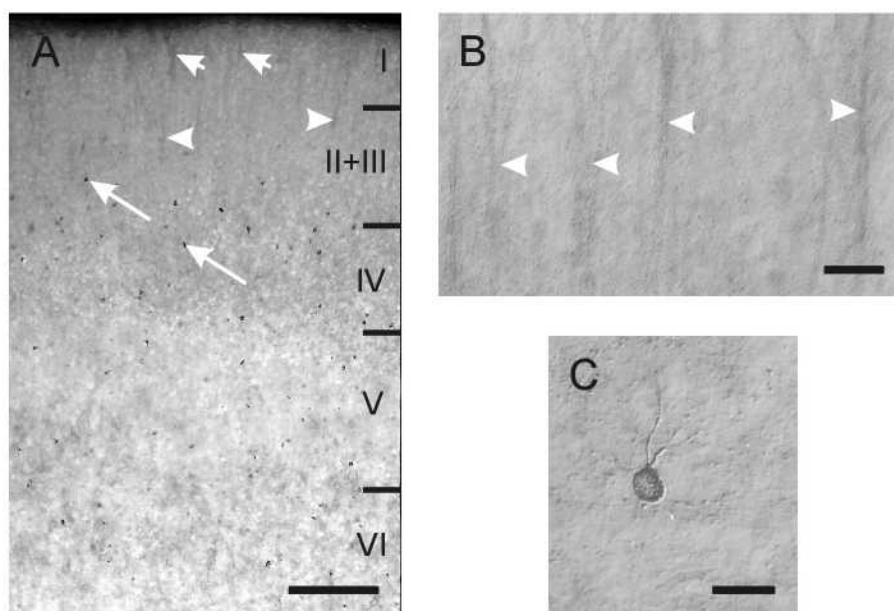


Abb. 3.29: Lokalisation von HCN2 im Parietalen Cortex. Dargestellt sind die immunhistochemischen Färbungen von Coronalen Schnitten des Rattencortex durch den Antikörper QQA-4A6 (1:20-Verd.). **A):** Übersicht über die corticalen Schichten I-VI. Die gefärbten Dendritenbäume (kurze Pfeile) und Dendritenbündel (Pfeilspitzen) der Pyramidenzellen sind markiert. Lange Pfeile markieren einige der sehr kleinen HCN2-positiven Neuronen, die gleichmäßig über die Schichten III bis VI verteilt sind. **B):** HCN2-positiv Dendritenbündel von Pyramidenzellen in den Schichten III und IV. **C):** Kleines HCN2-positives Neuron in Schicht III. Die Balken entsprechen 200 µm in A, 40 µm in B und 20 µm in C.

Expressionsmuster von HCN3:

Die Expression von HCN3 ist auf einzelne Neuronen mittlerer Größe in den Schichten IV und V beschränkt (Abb. 3.30 A, kurze Pfeile). Abb. 3.30 B zeigt die HCN3-positiven Neuronen bei stärkerer Vergrößerung. Während die Zellkörper (lange Pfeile) und primären Dendriten (Pfeilspitzen) angefärbt werden, sind keine Färbungen der sekundären Dendriten oder Axone zu beobachten. Im Gegensatz zu HCN1 und HCN2 wird HCN3 nicht in Pyramidenzellen exprimiert.

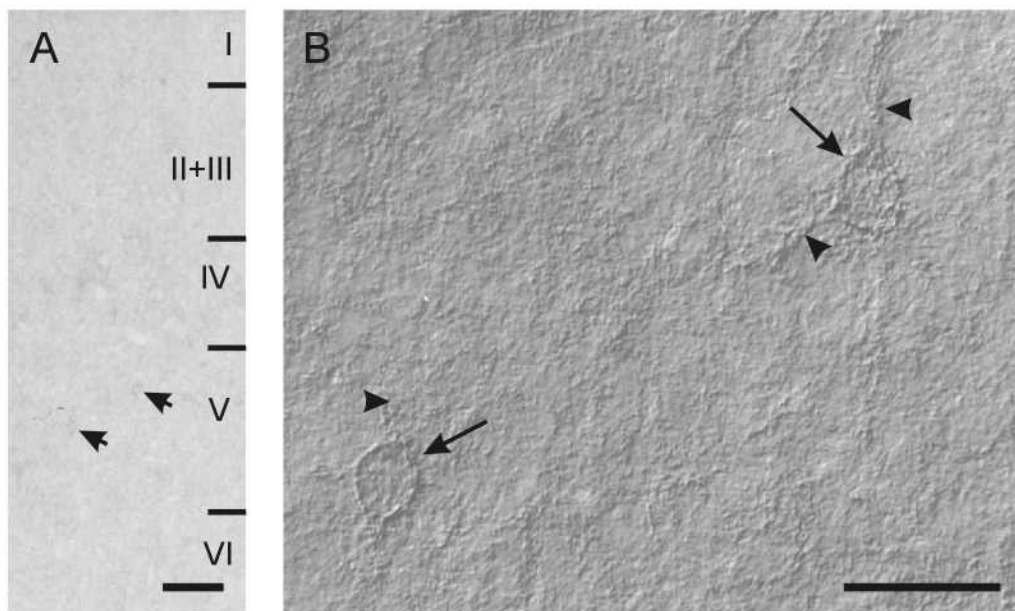


Abb. 3.30: Lokalisation von HCN3 im Parietalen Cortex. Dargestellt sind die immunhistochemischen Färbungen von Coronschnitten des Rattencortex durch den Antikörper TLL-6C5 (1:20-Verd.). **A):** Übersicht über die corticalen Schichten I-VI. Einige der nur schlecht erkennbaren HCN3-positiven Neuronen sind durch kurze Pfeile markiert. **B):** Nahaufnahme von HCN3-positiven mittelgroßen Neuronen in Schicht V. Die gefärbten Zellkörper (lange Pfeile) und primären Dendriten (Pfeilspitzen) sind markiert. Die Balken entsprechen 100 μm in A und 50 μm in B.

Expressionsmuster von HCN4:

HCN4-positive Zellen (Pfeile) lassen sich vor allem in den Schichten II und III nachweisen (Abb. 3.31 A). Die Zelldichte nimmt in den Schichten IV bis VI deutlich ab. Bei den angefärbten Zellen handelt es sich um sehr kleine Neuronen. Abb. 3.31 B zeigt eine Gruppe dieser HCN4-positiven Neuronen in einer stärkeren Vergrößerung. Ähnlich wie HCN3 wird HCN4 nicht in Pyramidenzellen exprimiert.

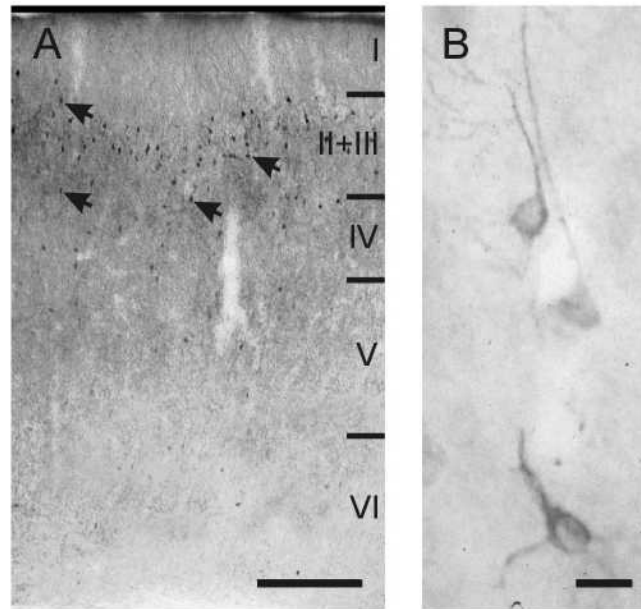


Abb. 3.31: Lokalisation von HCN4 im Parietalen Cortex. Dargestellt sind die immunhistochemischen Färbungen von Coronalen Schnitten des Rattencortex durch den Antikörper SHG-1E5 (1:20-Verd.). **A):** Übersicht über die corticalen Schichten I-VI. Kurze Pfeile markieren einige der sehr kleinen HCN4-positiven Neuronen, die hauptsächlich in den Schichten II und III vorkommen, aber auch in den Schichten IV bis VI zu finden sind. **B):** Nahaufnahme von kleinen HCN4-positiven Neuronen in Schicht III. Die Balken entsprechen 200 μm in A und 20 μm in B.

Die Untersuchungen am Parietalen Rattencortex zeigen, daß sich auch in diesem Abschnitt des ZNS die vier HCN-Kanaltypen deutlich in ihrer zellulären und subzellulären Lokalisation voneinander unterscheiden. In zukünftigen Experimenten wird die Expression der HCN-Kanäle in anderen Gehirnnarealen untersucht werden. Besondere Aufmerksamkeit sollte dabei Arealen mit spontaner Rhythmogenese zukommen, in denen die HCN-Kanäle von entscheidender Bedeutung sind.

4 Diskussion

HCN-Kanäle sind von großem medizinischem Interesse, da sie beispielsweise in den Schrittmacherzentren des Herzens und in den Neuronen des Thalamus an der Erzeugung und Regulation rhythmischer Aktivierungsmuster beteiligt sind. Im Genom der Säugetiere wurden vier verschiedene Gene für HCN-Kanäle identifiziert (Übersicht: z.B. Kaupp & Seifert, 2001). Alle vier Typen wurden bereits in heterologen Expressionssystemen elektrophysiologisch untersucht (Ludwig et al., 1998; Santoro et al., 1998; Ludwig et al., 1999; Seifert et al., 1999; Moosmang et al., 2001) und waren in der Lage, funktionelle homooligomere Kanalkomplexe zu bilden. Untersuchungen an Froschoozyten, in denen HCN1 und HCN2 ko-exprimiert wurden, deuten darauf hin, daß sie auch heterooligomere Komplexe bilden können (Chen et al., 2001; Ulens & Tytgat, 2001). Die Kanaleigenschaften der heterooligomeren Komplexe unterscheiden sich von denen der homooligomeren Kanäle. Unklar war bislang, ob die HCN-Kanäle *in vivo* homo- oder heterooligomere Kanalkomplexe bilden. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Expressionsmuster der vier HCN-Kanaltypen mit Hilfe von molekularbiologischen, biochemischen und immunhistochemischen Methoden untersucht. Durch Ko-Immunpräzipitation sollten heterooligomere HCN-Kanäle sowohl in heterologen Expressionssystemen, als auch in nativem Gewebe nachgewiesen werden.

4.1 Gewebespezifische Expression der HCN-Kanäle

Nachdem die cDNA-Sequenzen der HCN-Kanalgene bekannt waren, haben mehrere Arbeitsgruppen damit begonnen, das Expressionsmuster der vier Typen in verschiedenen Säugetierspezies (Maus, Ratte, Kaninchen, Mensch) mit Hilfe molekularbiologischer und biochemischer Methoden zu untersuchen. Die Untersuchungen lieferten z.T. widersprüchliche Ergebnisse. Um einen besseren Überblick zu bekommen, sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und anderer Arbeitsgruppen in Tab. 4.1 zusammengefaßt.

Gewebe	HCN1	HCN2	HCN3	HCN4
Gehirn	+	+	+	+/-
Amygdala	+	+	+	+
Bulbus Olfactorius	+	+	+	+
Cerebellum	+	+	+	+
Cerebraler Cortex	+/-	+	+	+
Hippocampus	+	+	+	+
Hirnstamm	+/-	+	+	+
Thalamus	+/-	+	+	+
Herz	+/-	+	-	+
Retina	+	+	+	+/-
Bauchspeicheldrüse	+	-	nicht untersucht	-
Hoden	+/-	-	-	+/-
Leber	-	-	+/-	-
Lunge	-	-	+/-	+/-
Niere	-	-	+/-	-
Skelettmuskel	+/-	-	-	+/-

Tab. 4.1: Ergebnisse zur Untersuchung der Expression der HCN-Gene. Die Tabelle faßt zusammen, in welchen untersuchten Geweben, bzw. Teilarealen der jeweilige HCN-Kanaltyp nachgewiesen (+) bzw. nicht nachgewiesen (-) werden konnte. Die hochgestellten Zahlen geben die Referenzen an: ⁽¹⁾ diese Arbeit; ⁽²⁾ Santoro et al., 1997; ⁽³⁾ Ludwig et al., 1998; ⁽⁴⁾ Santoro et al., 1998; ⁽⁵⁾ Ishii et al., 1999; ⁽⁶⁾ Ludwig et al., 1999; ⁽⁷⁾ Moosmang et al., 1999; ⁽⁸⁾ Shi et al., 1999; ⁽⁹⁾ Monteggia et al., 2000; ⁽¹⁰⁾ Santoro et al., 2000; ⁽¹¹⁾ Moosmang et al., 2001; ⁽¹²⁾ Moroni et al., 2001.

Besonders intensiv wurden die Expressionsmuster der HCN-Kanäle im Gehirn und im Herzen untersucht. Für alle anderen untersuchten Gewebe - mit Ausnahme der Retina - existieren lediglich Ergebnisse aus Northernblot-Experimenten. Im folgenden werden die Ergebnisse für Gehirn und Herz näher besprochen. Das Expressionsmuster der HCN-Kanäle in der Retina wird im Abschnitt 4.3 genauer diskutiert.

HCN-Kanäle im Gehirn:

Alle vier HCN-Kanaltypen lassen sich im Säugetiergehirn nachweisen. HCN2 wird in fast allen Hirnarealen exprimiert. Die stärksten Signale im Maus- und Rattengehirn lassen sich im Bulbus Olfactorius, im Thalamus, im Cerebralen Cortex, im Hippocampus und im Cerebellum beobachten (Moosmang et al., 1999; Monteggia et al., 2000; Santoro et al., 2000).

Transkripte von HCN1 lassen sich ebenfalls in fast allen Hirnarealen nachweisen. Die Regionen mit der stärksten HCN1-Expression sind die corticalen Schichten II und V, der Hippocampus und das Cerebellum (Santoro et al., 1997; Moosmang et al., 1999; Monteggia et al., 2000; Santoro et al., 2000). Im Gegensatz dazu finden Moroni et al. (2001) im Kaninchengehirn zwar HCN1-Transkripte im Cerebellum und im Hippocampus, nicht aber im Cortex und im Thalamus. Im Vergleich zu HCN1 und HCN2, ist die Expression von HCN4 auf bestimmte Hirnregionen beschränkt (Moosmang et al., 1999; Seifert et al., 1999; Monteggia et al., 2000; Santoro et al., 2000). Eine besonders starke Expression läßt sich im Thalamus, im Bulbus Olfactorius und in der Habenula beobachten. In anderen Regionen des Gehirns ist die Expression auf einzelne Nuclei beschränkt. Moosmang et al. (1999) können HCN3-Transkripte in geringem Ausmaß im gesamten Mausgehirn nachweisen. Die einzige Region mit einer erhöhten HCN3-Expression ist der Bulbus Olfactorius. Dagegen berichten Monteggia et al. (2000) von einer erhöhten HCN3-Expression im Hippocampus, sowie einzelnen Nuclei im Thalamus, im Hypothalamus und im motorischen bzw. im auditorischen System des Rattengehirns.

HCN-Kanäle im Herzen:

HCN2 und HCN4 lassen sich durch Northernblot-Experimente im Herzen nachweisen (HCN2: Ludwig et al., 1998; Santoro et al., 1999. HCN4: Santoro et al., 1998; Ludwig et al., 1999; Moosmang et al., 1999; Seifert et al., 1999). Ähnlich wie im Gehirn wird HCN2 im Herzen gleichmäßig in verschiedenen Abschnitten exprimiert (Ludwig et al., 1999; Shi et al., 1999; Moosmang et al., 2001). HCN4 kann ebenfalls in verschiedenen Herzarealen nachgewiesen werden. Allerdings ist die Expression im Sinusknoten wesentlich stärker als in den anderen Arealen (Ishii et al., 1999; Ludwig et al., 1999; Shi et al., 1999; Moosmang et al., 2001). Widersprüchliche Ergebnisse existieren für HCN1. Während Santoro et al. (1997, 1998) und Ludwig et al. (1998) in Northernblot-Experimenten kein HCN1-Transkript im Mausherzen nachweisen können, zeigen Moosmang et al. (2001) mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung eine geringe HCN1-Expression. Shi et al. (1999) detektieren HCN1-Transkripte im Sinusknoten und Ventrikel des Kaninchens, nicht aber im Ventrikel der Ratte. Die Ergebnisse für das Kaninchenherz werden auch von Moroni et al. (2001) bestätigt, die die HCN1-Expression mit Hilfe von molekularbiologischen und biochemischen Methoden untersuchten. Die Northernblot-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (Abschnitt 3.1.1) deuten darauf hin, daß HCN1 in sehr geringen Mengen auch im menschlichen Herzen exprimiert wird. Die widersprüchlichen Ergebnisse lassen sich sowohl mit speziesbedingten

Unterschieden, als auch mit den unterschiedlichen Sensitivitäten der angewandten Nachweistechiken begründen. Transkripte von HCN3 konnten bisher nicht im Herzen nachgewiesen werden (Ludwig et al., 1998; Santoro et al., 1998; Shi et al., 1999; Moosmang et al., 2001).

In anderen Geweben wurden HCN-Transkripte bisher nur durch Northernblot-Experimente nachgewiesen. Die Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen sind jedoch sehr widersprüchlich. Einige dieser Widersprüche könnten damit erklärt werden, daß die Poly(A)⁺-RNA-Proben durch genomische DNA verunreinigt waren. Da HCN-Ströme in zahlreichen Neuronen des Peripheren und Zentralen Nervensystems gemessen werden können (Übersicht: Pape, 1996), könnten einige der schwachen Northernblot-Signale auch von Poly(A)⁺-RNA aus Neuronen stammen, die die untersuchten Gewebe durchziehen. Welche Zelltypen in den Geweben tatsächlich HCN-Kanalproteine exprimieren, kann nur durch immunhistochemische Färbungen geklärt werden. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Antikörper gegen die vier HCN-Kanaltypen hergestellt.

4.2 Biochemische Charakterisierung der HCN-Kanalproteine

In Westernblot-Analysen kann untersucht werden, in welchen Geweben ein bestimmtes Protein exprimiert wird, und ob dieses Protein gewebespezifische Modifikationen erfährt. Mit Hilfe der in dieser Arbeit hergestellten Antikörper wurde die Expression der HCN-Kanäle in der Rattenretina, im Ratten- und Mausgehirn, sowie in transfizierten HEK 293-Zellen untersucht.

In der Rattenretina können alle vier HCN-Kanaltypen nachgewiesen werden (3.3.1). Die Größen der detektierten Proteine liegen jeweils ca. 5-10 kDa über den anhand der Aminosäuresequenzen errechneten Molekulargewichten der HCN-Kanalproteine. Wurden die Membranproteine mit der Deglykosidase PNGase F behandelt, so verringert sich das Molekulargewicht der Proteine. Die Deglykosylierungsstudien zeigen also, daß alle vier HCN-Kanaltypen in der Rattenretina in einer glykosylierten Form vorliegen.

Deglykosylierungsstudien an heterolog exprimierten HCN-Kanalproteinen ergaben, daß auch in den HEK 293-Zellen alle vier HCN-Kanalproteine glykosyliert sind. In Westernblot-Analysen unterscheidet sich das Laufverhalten der glykosylierten HCN4-Kanalproteine aus der stabilen Zelllinie HEK 293-Flp-hHCN4 von denen aus transient transfizierten HEK 293-

Zellen (nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, daß die Kanalproteine in den verschiedenen Zellen unterschiedlich glykosyliert werden. Da sich die HCN4-Kanäle in den beiden Zelllinien auch in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften geringfügig voneinander unterscheiden (Dr. R. Seifert, persönliche Mitteilung), kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Glykosylierung die physiologischen Eigenschaften der Kanäle beeinflusst. Da alle vier HCN-Kanaltypen im nativen Gewebe (Rattenretina) anders glykosyliert sind als im heterologen Expressionssystem (HEK 293-Zellen), könnte sich ein Vergleich der elektrophysiologischen Eigenschaften von nativen HCN-Kanälen und heterolog exprimierten HCN-Kanälen als schwierig erweisen.

Zwischen den deglykosylierten HCN-Kanalproteinen aus Rattenretina und HEK 293-Zellen existieren keine Größenunterschiede. Die Größen der im Westernblot detektierten Proteine entsprachen in beiden Fällen dem errechneten Molekulargewicht. In der Rattenretina erfahren HCN-Kanäle also keine anderen posttranslationalen Modifikationen, die zu einem deutlich veränderten Laufverhalten in Westernblot-Experimenten führen. Dies steht im Gegensatz zu dem homologen HCN-Kanalprotein der Seeigelart *S.purpuratus* (SPIH), für das gezeigt werden konnte, daß es in den Flagellen von Spermien phosphoryliert vorliegt (Gauss et al., 1998). Elektrophysiologische Untersuchungen gaben aber Hinweise darauf, daß die Kanaleigenschaften der Säugetier-HCN-Kanäle durch Phosphorylierung moduliert werden können (Yu et al., 1993; Accili et al., 1997; Cathala & Paupardin-Tritsch, 1997; Wu & Cohen, 1997). Tatsächlich enthalten die Aminosäuresequenzen der HCN-Kanäle Konsensussequenzen für die Phosphorylierung durch verschiedene Proteinkinasen (Santoro et al., 1998; Scholten, 1998; Monteggia et al., 2000). Eine interessante Frage für zukünftige Experimente ist daher, in welchen Geweben bzw. Zelltypen die Phosphorylierung der HCN-Kanäle physiologisch bedeutsam ist.

HCN3 ist der einzige HCN-Kanaltyp, der in transfizierten HEK 293-Zellen nicht nur glykosyliert, sondern noch auf eine andere Weise posttranslational modifiziert ist. Die modifizierte Form des Kanalproteins besitzt ein um ca. 5 kDa größeres Molekulargewicht als die "einfache" Form des Kanalproteins. Die Art der Modifizierung konnte nicht geklärt werden. Da das Molekulargewicht von HCN3 nicht verringert wird, wenn die Membranproteine vor der SDS-Gelelektrophorese mit Phosphatasen behandelt werden (nicht gezeigt), handelt es sich vermutlich nicht um eine Phosphorylierung.

Mit Hilfe der Westernblot-Technik wurde nicht nur die Expression der HCN-Kanäle in der Rattenretina, sondern auch im Ratten- und Mausgehirn untersucht. In beiden Spezies konnten die Kanalproteine HCN1, HCN2 und HCN4 nachgewiesen werden. Die detektierten

Bandenmuster entsprechen denen in der Rattenretina und deuten nicht darauf hin, daß die Kanalproteine in den verschiedenen Geweben oder Spezies unterschiedlich glykosyliert sind. Die Untersuchung der gewebespezifischen Expression der HCN-Kanäle (diese Arbeit; Santoro et al., 1997; Moosmang et al., 1999; Monteggia et al., 2000; Santoro et al., 2000) zeigen, daß im Gegensatz zu HCN1 und HCN2 das HCN4-Kanalprotein nicht gleichmäßig im gesamten Gehirn exprimiert wird, sondern auf bestimmte Gehirnareale beschränkt ist. Tatsächlich kann das HCN4-Signal verstärkt werden, indem für die Westernblot-Analysen Membranproteine aus solchen Gehirnarealen angereichert werden. Im Gegensatz zu HCN1, HCN2 und HCN4 konnte das HCN3-Kanalprotein im Ratten- und Mausgehirn bislang nicht nachgewiesen werden. Obwohl Moosmang et al. (1999) durch *in situ*-Hybridisierungen eine leicht erhöhte HCN3-Expression im Bulbus Olfactorius nachweisen, konnten auch in diesem Gewebe keine HCN3-Signale im Westernblot detektiert werden. Die Expressionsrate des Kanalproteins ist anscheinend so gering, daß sich das spezifische HCN3-Signal nicht von den unspezifischen Hintergrundsignalen, die beispielsweise vom sekundären Antikörper stammen, abhebt. In zukünftigen Experimenten könnte der Nachweis von HCN3 im Ratten- und Mausgehirn gelingen, wenn das spezifische Signal beispielsweise durch einen tertiären Antikörper verstärkt wird; diese Methode wurde bei den Färbungen von Rattenretina-Schnitten (2.15.2; 3.3.2) erfolgreich angewandt.

In Northernblot-Experimenten wurden bei allen vier HCN-Kanaltypen mehrere Gentranskripte unterschiedlicher Größe nachgewiesen (diese Arbeit; Santoro et al., 1997; Ludwig et al., 1998; Santoro et al., 1998; Ishii et al., 1999; Ludwig et al., 1999; Moosmang et al., 1999; Seifert et al., 1999). Diese unterschiedlich großen Gentranskripte könnten auf Spleißvarianten der Gene hindeuten. Wenn tatsächlich Spleißvarianten der HCN-Kanäle existieren, handelt es sich wahrscheinlich um Kanalproteine mit unterschiedlichen N- oder C-Termini. In den Westernblot-Analysen der vorliegenden Arbeit konnten allerdings weder in der Rattenretina, noch im Ratten- und Mausgehirn Spleißvarianten der vier Gene nachgewiesen werden. N-terminale Spleißvarianten müßten von den Antikörpern erkannt werden, da die Epitope im C-terminalen Abschnitt liegen. Um ausschließen zu können, daß die Epitope der Antikörper durch alternatives Spleißen aus dem Kanalprotein entfernt werden, wurden menschliche, genomische Klone, die das hHCN4-Kanalgen enthalten, isoliert und sequenziert (nicht gezeigt). Im Bereich des Antikörper-Epitops (zwischen cNMP-Bindestelle und C-Terminus) befinden sich keine Exon/Intron-Grenzen. Andere Arbeitsgruppen haben die genomische Struktur des hHCN2-Kanalgens untersucht und konnten ebenfalls keine

Exon/Intron-Grenzen im entsprechenden Abschnitt finden (Ludwig et al., 1999; Vaccari et al., 1999). Ein Vergleich der cDNA-Sequenz von hHCN1 mit genomischen Sequenzen (GeneBank Zugangsnummern AC023113.3 und AC026621.2) zeigt, daß auch dieser HCN-Kanaltyp im Bereich des Antikörper-Epitops nicht gespleißt wird. Die vorhandenen Spleißgrenzen sind in den drei HCN-Kanälen hoch konserviert. Dies läßt vermuten, daß ebenfalls keine C-terminalen Spleißvarianten des hHCN3-Kanalgens existieren. Ebenso wenig gibt es Hinweise darauf, daß die HCN-Kanäle in anderen Spezies C-terminal gespleißt werden.

4.3 Lokalisation der HCN-Kanäle in der Rattenretina

Die zelluläre und subzelluläre Lokalisation der HCN-Kanäle in der Rattenretina wurde mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen untersucht. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Expression der HCN-Kanäle in den Photorezeptoren und den nachgeschalteten Bipolarzellen. In Tab. 4.2 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefaßt.

Zelltyp	HCN1	HCN2	HCN3	HCN4
Stäbchen	(+)			
Zapfen		+	+	
Zapfenbipolarzelle Typ1				
Zapfenbipolarzelle Typ 2				
Zapfenbipolarzelle Typ 3				+
Zapfenbipolarzelle Typ 4				
Zapfenbipolarzelle Typ 5	+			+
Zapfenbipolarzelle Typ 6			?	
Zapfenbipolarzelle Typ 7		?		
Zapfenbipolarzelle Typ 8		+		
Zapfenbipolarzelle Typ 9		?		
Stäbchenbipolarzelle		+		

Tab. 4.2: Lokalisation der HCN-Kanäle in Photorezeptoren und Bipolarzellen der Rattenretina. In der Tabelle sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen aus dieser Arbeit zusammengefaßt. Einige Zelltypen ließen sich noch nicht eindeutig als HCN-positiv identifizieren. Diese Zelltypen sind in der Tabelle mit einem Fragezeichen markiert. In der vorliegenden Arbeit konnten keine starken HCN1-spezifischen Färbungen von Stäbchen gezeigt werden. Daher ist das Plus in der Tabelle eingeklammert. Andere Untersuchungen (siehe Text) zeigen aber eindeutig, daß HCN1 in Stäbchen exprimiert wird.

Die immunhistochemischen Färbungen ergaben, daß sich die verschiedenen HCN-Kanaltypen deutlich in ihren zellulären und subzellulären Expressionsmustern voneinander unterscheiden. In den meisten Zelltypen wird jeweils nur ein einzelner HCN-Kanaltyp exprimiert. Damit konnte zum ersten Mal nach der Klonierung der HCN-Kanalgene gezeigt werden, daß in den meisten nativen Zellen keine heterooligomeren Komplexe aus HCN1 bis HCN4 vorliegen.

Nur in Zapfen und Typ 5-Zapfenbipolarzellen können jeweils zwei verschiedene Typen von HCN-Kanälen nachgewiesen werden. In Zapfen scheinen sich die beiden HCN-Kanäle allerdings in ihrer subzellulären Lokalisation voneinander zu unterscheiden: während HCN2-spezifische Antikörper die Zellkörper anfärben, können HCN3-Kanalproteine ausschließlich im synaptischen Endfuß nachgewiesen werden. Da alle verfügbaren Antikörper gegen HCN2 und HCN3 in der gleichen Spezies (Ratte) hergestellt wurden, konnten noch keine direkten Ko-Lokalisationsexperimente durchgeführt werden. Für zukünftige Experimente ist daher die Herstellung weiterer Antikörper gegen die beiden HCN-Kanaltypen in einer anderen Spezies geplant.

Eine andere Situation ergibt sich für Typ 5-Zapfenbipolarzellen. In diesen Zellen werden HCN1- und HCN4-Kanalproteine ko-exprimiert. Durch Doppelfärbungen konnte gezeigt werden, daß beide Kanalproteine sowohl im Axonterminalsystem, als auch im Bereich der Zellkörper ko-lokalisiert sind. In diesem Zelltyp könnten daher die HCN-Kanäle als heterooligomere Komplexe aus HCN1 und HCN4 vorliegen. Mit Hilfe von biochemischen Methoden konnten bisher aber noch keine heterooligomeren Komplexe nachgewiesen werden (siehe dazu auch Abschnitt 4.4). Außerdem wird HCN4 auch in Typ 3-Zapfenbipolarzellen exprimiert, in denen jedoch kein HCN1-Kanalprotein nachgewiesen werden kann. Die beiden HCN-Kanäle werden also nicht grundsätzlich in einer Zelle ko-exprimiert.

Im Laufe der vorliegenden Arbeit veröffentlichten Moosmang et al. (2001) eine Studie zur Lokalisation von HCN-Kanälen in der Mausretina mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung (ISH). In Tab. 4.3 werden die Ergebnisse der beiden Arbeiten miteinander verglichen. Dabei ist zu beachten, daß durch *in situ*-Hybridisierungen Nukleinsäuren nachgewiesen werden und daher keine Aussagen über die subzelluläre Lokalisation der Proteine möglich ist. Zudem sind die gezeigten Färbungen in Moosmang et al. (2001) so diffus, daß keine einzelnen Zellen identifiziert werden können. Um diesen Umstand zu berücksichtigen, ist in der Spalte "Zellschicht" für jede nukleäre Schicht angegeben, welche Neuronentypen darin vorkommen. Ferner ist für die Immunhistochemie (IHC) nur der jeweils identifizierte Zelltyp, nicht aber die genaue subzelluläre Lokalisation angegeben.

	HCN1		HCN2		HCN3		HCN4	
Zellschicht	ISH	IHC	ISH	IHC	ISH	IHC	ISH	IHC
ONL: Photorezeptoren	+	(Stäbchen)	-	Zapfen	-	Zapfen	-	-
INL: Bipolar-, Horizontal- und Amakrinzellen	+	Bipolar- und Amakrinzellen	+	Bipolar- und Amakrinzellen	+	Bipolar- oder Amakrinzellen ?	-	Bipolar- und Amakrinzellen
GCL: Ganglien- und versetzte Amakrinzellen	+	Ganglienzellen	+	Ganglienzellen	+	Ganglienzellen ?	-	Ganglienzellen

Tab. 4.3: Lokalisation der HCN-Kanäle in der Ratten- und Mausretina. In der Tabelle werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen (IHC) aus der vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen der *in situ*-Hybridisierungen (ISH) aus Moosmang et al., 1999 verglichen. Da durch *in situ*-Hybridisierungen keine zelluläre oder subzelluläre Lokalisation möglich ist, wird in der Spalte "Zellschicht" für jede nukleäre Schicht (*outer nuclear layer*, ONL; *inner nuclear layer*, INL; *ganglion cell layer*, GCL) angegeben, welche Neuronentypen darin vorkommen. In den Spalten "IHC" sind die Neuronentypen angegeben, die in der jeweiligen Schicht identifiziert wurden. Da noch nicht alle HCN3-positiven Neuronentypen eindeutig identifiziert werden konnten, sind einige Neuronentypen durch ein Fragezeichen markiert. Die Färbung von Stäbchen durch HCN1-spezifische Antikörper war nicht eindeutig, weshalb dieser Zelltyp eingeklammert ist.

Die meisten Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen an der Rattenretina werden durch die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung bestätigt. Es sind aber auch einige Abweichungen zu beobachten. Im folgenden werden die Ergebnisse der beiden Untersuchungen miteinander verglichen. Es wird diskutiert, aus welchen Gründen die abweichenden Ergebnisse zustande kommen könnten, und welche immunhistochemischen Ergebnisse bereits durch andere Experimente bestätigt werden konnten. Gleichzeitig wird darüber spekuliert, welche Funktionen der jeweilige Typ von HCN-Kanal in den Zellen übernehmen könnte. Als Grundlage für diese Spekulationen dienen die Expressionsmuster der HCN-Kanäle in der Rattenretina und die biophysikalischen Eigenschaften der heterolog exprimierten Kanäle.

HCN1:

Das stärkste Signal bei der *in situ*-Hybridisierung stammt aus der Innensegmentschicht der Photorezeptoren. Durch den Antikörper RTQ-7C3 kann bestenfalls eine schwache Färbung von Stäbchen beobachtet werden. Der gleiche Antikörper ergibt in der Mausretina eine eindeutige Färbung der Stäbchen (Dr. F. Müller, persönliche Mitteilung). Der Antikörper IHR-2G4 färbt Stäbchen in beiden Spezies mit vergleichbarer Intensität. Da dieser Antikörper in Westernblot-Analysen noch mit anderen Proteinen kreuzreagiert, sind die Färbungen mit

IHR-2G4 jedoch vorsichtig zu interpretieren. Gegen Ende der vorliegenden Arbeit stand ein Antikörper (Alomone Labs; Jerusalem, Israel) zur Verfügung, der einen N-terminalen Abschnitt des HCN1-Kanalproteins erkennt. Erste Untersuchungen an der Rattenretina zeigen, daß dieser Antikörper in der IPL die gleichen Strukturen färbt wie RTQ-7C3. Stäbchen werden durch den Alomone-Antikörper jedoch wesentlich stärker gefärbt als durch RTQ-7C3 (Dr. F. Müller, persönliche Mitteilung). Möglicherweise liegt das Kanalprotein in Rattenphotorezeptoren in einer Form vor, in der das Epitop für den Antikörper maskiert ist. In elektrophysiologischen Untersuchungen an Stäbchen der Ratte können HCN-Ströme gemessen werden, die denen aus rHCN1-exprimierenden HEK 293-Zellen ähneln (E. Ivanova, persönliche Mitteilung). In Abschnitt 1.3 wurde beschrieben, wie ein HCN-Strom der lichtinduzierten Hyperpolarisation in Photorezeptoren entgegenwirkt. Es kann daher vermutet werden, daß HCN1 genau diese Funktion im Stäbchen übernimmt. Dafür spricht auch die Kinetik des heterolog exprimierten HCN1-Kanals, die deutlich schneller ist, als die der anderen drei HCN-Kanaltypen (Moosmang et al., 2001; zur Übersicht: Kaupp & Seifert, 2001).

Das HCN1-Kanalprotein läßt sich mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen der Rattenretina in Bipolar-, Amakrin- und Ganglienzellen nachweisen. Entsprechend werden bei der *in situ*-Hybridisierung an der Mausretina die INL und die GCL angefärbt. HCN1-spezifische Antikörper färben sowohl Zellkörper, als auch Axonterminalsysteme dieser Zellen. Möglicherweise stabilisiert HCN1 das Ruhepotential dieser Zellen. In den Zelltypen, in denen HCN1 mit HCN4 ko-exprimiert wird, könnte aber auch ein heterooligomerer HCN-Kanal mit vollkommen neuen Eigenschaften vorliegen.

HCN2:

HCN2-Transkripte können durch *in situ*-Hybridisierung in der INL und der GCL nachgewiesen werden, was den immunhistochemischen Färbungen von Bipolar-, Amakrin- und Ganglienzellen entspricht. Bei genauerer Betrachtung des Expressionsmusters in Bipolarzellen fällt auf, daß HCN2 ausschließlich in ON-Bipolarzellen, nicht aber in OFF-Bipolarzellen exprimiert wird. ON-Bipolarzellen sind im Dunkeln inaktiv, da sie aufgrund der Glutamat-Freisetzung am Photorezeptorendfuß hyperpolarisieren. HCN-Kanäle könnten der Hyperpolarisation durch einen Na⁺-Einstrom entgegenwirken. Interessanterweise läßt sich das HCN2-Kanalprotein vor allem in den axonterminalen Endigungen der ON-Bipolarzellen nachweisen, wo HCN2-Kanäle möglicherweise die Transmitterfreisetzung modulieren. Beaumont & Zucker (2000) fanden Hinweise darauf, daß präsynaptische HCN-Ströme direkt

an der Kontrolle der synaptischen Transmission beteiligt sind und durch die Serotonin-induzierte Änderung der cAMP-Konzentration moduliert werden. HCN2 könnte diese Funktion erfüllen, da er im Gegensatz zu HCN1 deutlich durch cAMP moduliert wird (die Aktivierungskurve des heterolog exprimierten Kanals wird um 12-14 mV zu positiveren Spannungen verschoben; Ludwig et. al, 1998 und 1999).

Während durch HCN2-spezifische Antikörper auch die Zellkörper von Zapfen gefärbt werden, können Moosmang et al. (2001) keine Färbungen in der Innensegmentschicht beobachten. Die immunhistochemischen Signale in der IPL sind wesentlich stärker als die Signale in den Zapfen. Es ist daher möglich, daß die *in situ*-Signale in den Photorezeptoren zu schwach sind, um detektiert werden zu können. Erste immunhistochemische Untersuchungen zeigen zudem, daß HCN2 in Maus und Ratte teilweise in verschiedenen Zelltypen exprimiert wird (Dr. F. Müller, persönliche Mitteilung).

HCN3:

HCN3-Transkripte können durch *in situ*-Hybridisierung in der INL und der GCL nachgewiesen werden. Die immunhistochemischen Färbungen zeigen, daß HCN3-Kanalproteine ausschließlich in neuronalen Fortsätzen lokalisiert sind. Welche Zelltypen in der INL und GCL HCN3 exprimieren, konnte noch nicht genau geklärt werden. Die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung und der immunhistochemischen Färbungen scheinen sich aber nicht zu widersprechen. Ähnlich wie bei den Ergebnissen für HCN2 gibt es Widersprüche, was die Expression in Zapfen betrifft. Während HCN3-Kanalprotein eindeutig im Zapfenendfuß lokalisiert werden kann, können Moosmang et al. (2001) keine HCN3-Transkripte in der Innensegmentschicht nachweisen. Ähnlich wie bei HCN2 könnten auch hier schwache *in situ*-Signale übersehen worden sein und zu den unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben.

Die subzelluläre Lokalisation des Kanalproteins läßt vermuten, daß HCN3 an der Kontrolle der präsynaptischen Transmission beteiligt ist, wie es bereits für HCN2 vermutet wurde (s.o.). Da der heterologe HCN3-Kanal elektrophysiologisch noch nicht intensiv untersucht worden ist, sind genauere Aussagen über seine Funktion nicht möglich. Bislang wurde beispielsweise noch nicht untersucht, ob das Öffnungsverhalten des heterologen Kanals durch die Bindung von cAMP moduliert wird.

HCN4:

HCN4-Kanalproteine können mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen in Bipolar-, Amakrin- und Ganglienzellen nachgewiesen werden. Dies steht im klaren Gegensatz zu den Ergebnissen von Moosmang et al. (2001), die keine HCN4-Transkripte in der Mausretina nachweisen können. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen konnten bereits durch elektrophysiologische Untersuchungen bestätigt werden: In Zelltypen, die in der Immunhistochemie als HCN4-positiv identifiziert worden waren, kann ein HCN-Strom gemessen werden, der dem aus HCN4-transfizierten HEK 293-Zellen ähnelt (E. Ivanova, persönliche Mitteilung). Außerdem ist es möglich, cDNA-Fragmente von HCN4 durch PCR über Exon/Intron-Grenzen hinweg aus der Rattenretina zu amplifizieren (Dr. W. Bönigk, persönliche Mitteilung). Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen konnte schließlich gezeigt werden, daß auch in der Mausretina HCN4 exprimiert wird (Dr. F. Müller, persönliche Mitteilung).

HCN4 ist im Gegensatz zu HCN2 oder HCN3 nicht auf neuronale Fortsätze beschränkt, sondern gleichmäßig über die gesamte Bipolarzelle (Typ 3 und 5) verteilt. HCN4 könnte möglicherweise die Lage des Membranpotentials mitbestimmen und somit auf die Erregbarkeit der Zellen einwirken. Der heterolog exprimierte HCN4-Kanal ist außerdem über cAMP modulierbar (Ishii et al., 1999; Ludwig et al., 1999; Seifert et al., 1999). In Typ 5-Zapfenbipolarzellen konnte HCN4 mit dem Dopamin-Rezeptor vom D1-Typ ko-lokalisiert werden (nicht gezeigt). Die Bindung von Dopamin an den Rezeptor führt über eine G-Proteingekoppelte Signalkaskade zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration und könnte auf diese Weise die HCN4-Aktivität modulieren.

4.4 Bilden HCN-Kanäle homo- oder heterooligomere Kanalkomplexe?

Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß in den meisten Bipolarzellen der Rattenretina entweder keine HCN-Kanäle oder nur ein HCN-Kanaltyp exprimiert werden. Nur in Typ 5-Zapfenbipolarzellen und einigen Ganglienzellen sind die Kanalproteine HCN1 und HCN4 ko-lokalisiert. In diesen Zellen besteht die Möglichkeit, daß die beiden HCN-Kanaltypen als heterooligomere Komplexe vorliegen. Elektrophysiologische Untersuchungen an Froschoozyten, in denen HCN1 und HCN2 ko-exprimiert werden, deuten darauf hin, daß die beiden Kanaltypen heterooligomere Komplexe bilden, die andere Kanaleigenschaften besitzen als die homooligomeren Komplexe (Chen et

al., 2001; Ulens & Tytgat, 2001). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Immunpräzipitation untersucht, ob sich heterooligomere Komplexe aus HCN1 und HCN4 nachweisen lassen. Die Untersuchungen wurden sowohl mit solubilisierten Membranproteinen aus transfizierten HEK 293-Zellen, als auch mit solubilisierten Membranproteinen aus der Rattenretina durchgeführt.

Die ersten Experimente wurden mit Membranproteinen aus transfizierten HEK 293-Zellen durchgeführt, da in diesem Zellsystem bestimmt werden kann, welcher HCN-Kanaltyp exprimiert wird. Experimente mit einzel-transfizierten HEK 293-Zellen ergaben, daß der HCN4-spezifische Antikörper SHG-1E5 für die Immunpräzipitation geeignet ist: Aus Membranpräparationen von HEK 293-Zellen, die ausschließlich HCN4 exprimieren, wird das Kanalprotein quantitativ präzipitiert. In einem entsprechenden Ansatz, der nur HCN1 enthält, wird das Kanalprotein nicht vom HCN4-spezifischen Antikörper erkannt und daher auch nicht präzipitiert.

Im nächsten Schritt wurden HEK 293-Zellen mit HCN1 und HCN4 ko-transfiziert und untersucht, ob sich heterooligomere Komplexe aus den Kanalproteinen HCN1 und HCN4 bilden. Auch in diesem Versuchsansatz wird HCN1 nicht durch die SHG-1E5/Säulenmatrix präzipitiert, obwohl durch immunzytochemische Doppelfärbung von ko-transfizierten HEK 293-Zellen gezeigt werden konnte, daß 50 % der HCN4-positiven Zellen auch HCN1 exprimierten. Dieses Ergebnis muß zunächst so interpretiert werden, daß HCN1 nicht in einem Komplex mit HCN4 vorliegt. Allerdings wird anscheinend die Affinität des HCN4-Kanalproteins zum Antikörper herabgesetzt, so daß die Immunpräzipitation von HCN4 nicht mehr quantitativ erfolgt. Eine mögliche Erklärung für die abgeschwächte Wechselwirkung zwischen HCN4-Kanalprotein und HCN4-Antikörper wäre, daß das HCN1-Kanalprotein in geringem Umfang mit dem HCN4-Antikörper kreuzreagiert. In diesem Fall könnten auch homooligomere Komplexe von HCN1 die Immunpräzipitation von HCN4-Kanalprotein durch den HCN4-Antikörper stören. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden Membranproteine aus HCN4-exprimierenden HEK 293-Zellen mit Membranproteinen aus HCN1-exprimierenden Zellen gemischt und zur Immunpräzipitation eingesetzt. In diesem Versuchsansatz kann man davon ausgehen, daß ausschließlich homooligomere Komplexe von HCN4 bzw. HCN1 vorliegen. Das Ergebnis entsprach den Experimenten mit einzel-transfizierten HEK 293-Zellen: Das HCN4-Kanalprotein wird durch die SHG-1E5/Säulenmatrix quantitativ präzipitiert, während das HCN1-Kanalprotein nicht präzipitiert wird. Das HCN1-Kanalprotein zeigt also keine Kreuzreaktion mit dem HCN4-Antikörper.

Die verminderte Wechselwirkung zwischen HCN4-Kanalprotein und HCN4-Antikörper scheint daher eine Folge der Ko-Expression von HCN4 und HCN1 zu sein.

Warum sich heterooligomere Komplexe aus HCN4 und HCN1 nicht nachweisen lassen, ist nicht klar. Möglicherweise wird die Wechselwirkung zwischen den beiden Kanalproteinen durch das Detergenz Triton X-100 gestört. Damit die integralen Membranproteine für eine Immunpräzipitation eingesetzt werden können, müssen sie zunächst mit Hilfe von Detergenzien solubilisiert werden. Obwohl in dieser Arbeit nur nicht-denaturierende Detergenzien zur Solubilisierung verwendet wurden, wird dadurch die native Konformation der Proteine verändert. Dadurch könnte die Wechselwirkung zwischen den Kanaluntereinheiten so weit abgeschwächt werden, daß sich im Verlauf der Immunpräzipitation der vermutlich tetramere Komplex auflöst und zumindest teilweise von der Säule gewaschen wird. Als Alternative zum Detergenz Triton X-100 könnten andere Detergenzien zur Solubilisierung verwendet werden. Die Wahl des geeigneten Detergenz ist jedoch nicht einfach: Tests mit Digitonin ergaben beispielsweise, daß sich die Kanalproteine mit diesem Detergenz solubilisieren lassen (3.3.3.1). Allerdings werden durch Digitonin unspezifische Wechselwirkungen von HCN1 mit der Protein G-Sepharose nicht so effektiv unterdrückt wie mit Triton X-100. Dies führt bei der Auswertung der Immunpräzipitation zu einer stärkeren Hintergrundfärbungen der Westernblot-Membran (nicht gezeigt). Diese Hintergrundfärbung könnte wahrscheinlich unterdrückt werden, indem beispielsweise die Ionenbedingungen in den Waschpuffern geändert werden. Es ist jedoch unklar, welche Auswirkungen diese Änderungen auf die Wechselwirkungen zwischen den HCN-Kanaluntereinheiten hätten. Eine bessere Möglichkeit, heterooligomere Komplexe aus HCN1 und HCN4 nachzuweisen, ist daher der Einsatz von bifunktionellen, quervernetzenden Chemikalien (sogenannte "*Crosslinker*"; Wong, 1993). Diese Crosslinker besitzen zwei reaktive Gruppen, die zwei Proteine z.B. über Lysinreste miteinander vernetzen können. Einige Crosslinker sind unter bestimmten Bedingungen wieder spaltbar. Solche Crosslinker könnten vor der Solubilisierung eingesetzt werden, um die HCN-Kanaluntereinheiten untereinander zu vernetzen. Nach der Immunpräzipitation könnten die Proteine wieder voneinander getrennt und separat im Westernblot nachgewiesen werden. Dabei ist allerdings zu beachten, daß unter Umständen auch Proteine vernetzt werden, die zwar nicht miteinander wechselwirken, aber räumlich eng benachbart vorliegen. Sollte es durch den Einsatz von Crosslinkern gelingen, heterooligomere Komplexe aus HCN1 und HCN4 biochemisch nachzuweisen, müssen diese Ergebnisse auf jeden Fall durch andere - beispielsweise elektrophysiologische - Experimente bestätigt werden.

Auch in der Rattenretina sollten heterooligomere Komplexe aus HCN1 und HCN4 mit Hilfe der Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Die immunhistochemischen Färbungen zeigen, daß nicht alle Zellen in der Rattenretina, die HCN4 exprimieren, auch HCN1-positiv sind. Somit kann nur ein Bruchteil der in der Retina nachweisbaren Menge von HCN4 überhaupt in einem heterooligomeren Komplex mit HCN1 vorliegen. Dieser Bruchteil wurde genauer quantifiziert, indem die HCN4-Immunfluoreszenz von gefärbten Rattenretina-Schnitten mit Hilfe eines Konfokalen Mikroskops gemessen wurde. Die Fluoreszenzintensität in dem Bereich der IPL, in dem HCN4 und HCN1 ko-lokalisiert sind, wurde zur Fluoreszenzintensität des gesamten Schnittes ins Verhältnis gesetzt. Dies ergab, daß maximal 10 % der HCN4-Immunfluoreszenz in der Rattenretina mit der HCN1-Immunfluoreszenz in der IPL übereinstimmt. Dieses Verhältnis ist wesentlich geringer als bei den Experimenten mit ko-transfizierten HEK 293-Zellen. Tatsächlich waren bei den Versuchen mit Membranproteinen aus der Rattenretina die Hintergrundsignale durch den "blutenden" Antikörper so hoch, daß nicht zwischen spezifischen und unspezifischen Signalen unterschieden werden konnte. Sollten HCN1 und HCN4 in der Rattenretina tatsächlich heterooligomere Komplexe bilden, ist deren Menge so gering, daß sie nicht durch Ko-Immunpräzipitation nachgewiesen werden können.

Um heterooligomere HCN-Kanalkomplexe nachzuweisen, können aber andere Methoden angewandt werden: Nachdem die zelluläre Lokalisation der HCN-Kanäle in der Rattenretina bekannt ist, können nun gezieltere elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt werden. So wird bereits untersucht, wie die immunhistochemischen Färbungen mit elektrophysiologischen Messungen an Photorezeptoren und Bipolarzellen übereinstimmen. In den Zelltypen, in denen nur ein HCN-Kanaltyp immunhistochemisch nachgewiesen wurde, können HCN-Ströme gemessen werden, die dem heterolog exprimierten HCN-Kanaltyp ähneln (E. Ivanova, persönliche Mitteilung). Von besonderem Interesse werden die zukünftigen elektrophysiologischen Messungen von Typ 5-Zapfenbipolarzellen sein, in denen HCN1 und HCN4 ko-exprimiert werden. Liegen in diesem Zelltyp zwei Populationen von homooligomeren Komplexen mit bekannten Kanaleigenschaften vor? Oder bilden HCN1 und HCN4 heterooligomere Komplexe mit neuen Kanaleigenschaften?

Einen ähnlichen Ansatz verfolgten auch Chen et al. (2001), die HCN1 und HCN2 in Froschoozyten ko-exprimierten und die gemessenen HCN-Ströme mit denen aus CA1-Pyramidenzellen des Hippocampus verglichen. Sie fanden dabei erste Hinweise darauf, daß sich die beiden HCN-Kanaltypen tatsächlich zu heterooligomeren Kanalkomplexen zusammenlagern. Die Eigenschaften des heterooligomeren Komplexes sind mit denen aus

CA1-Pyramidenzellen, die HCN1 und HCN2 exprimieren (Franz et al., 2000), vergleichbar. Allerdings wurden diese Messungen z.T. durch die relativ hohe cAMP-Konzentration in intakten Oozyten beeinflusst. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch Ulens & Tytgat (2001), die ein Tandemkonstrukt aus HCN1 und HCN2 herstellten, indem sie die vollständigen cDNA-Sequenzen der beiden Kanaltypen aneinanderhängend in einen Expressionsvektor klonierten. Das Tandemkonstrukt wurde ebenfalls in Froschoozyten exprimiert und elektrophysiologisch untersucht. Die Eigenschaften des daraus resultierenden HCN-Kanals sind ebenfalls mit denen aus CA1-Pyramidenzellen vergleichbar. Es muß jedoch angemerkt werden, daß die Verknüpfung der beiden Peptidketten erheblichen Einfluß auf die Konformation der Kanalproteine und damit natürlich auch auf deren elektrophysiologischen Eigenschaften haben kann.

Die beste biochemische Methode, um heterooligomere HCN-Kanalkomplexe in nativem Gewebe nachweisen zu können, ist trotz der oben beschriebenen Schwierigkeiten die Ko-Immunpräzipitation. Allerdings wird es wahrscheinlich nicht gelingen, einen HCN1/HCN4-Komplex in der Rattenretina nachzuweisen, da nur ein Bruchteil der retinalen Zellen diese beiden Kanalproteine ko-exprimieren. Möglicherweise lassen sich aber bei der Lokalisation der HCN-Kanäle im Säugetiergehirn Areale identifizieren, in denen ein größerer Prozentsatz von Zellen HCN1 und HCN4 ko-exprimieren. Diese Areale könnten dann isoliert und die daraus präparierten Membranproteine zur Immunpräzipitation eingesetzt werden. Sollten sich dabei tatsächlich heterooligomere Komplexe nachweisen lassen, könnten die HCN-Ströme aus diesen Hirnzellen mit denen aus Typ 5-Zapfenbipolarzellen verglichen werden, was wiederum ein indirekter Nachweis von HCN1/HCN4-Kanalkomplexen in der Rattenretina wäre. Sollte die zelluläre Lokalisation der HCN-Kanäle im Säugetiergehirn zeigen, daß auch andere Kombinationen von HCN-Kanaltypen in einer Zelle ko-exprimiert werden, könnten möglicherweise auch diese heterooligomeren Komplexe durch Ko-Immunpräzipitation nachgewiesen werden.

4.5 Ausblick

In der Retina werden die vier HCN-Kanaltypen in einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen exprimiert. Die weite Verbreitung der HCN-Kanäle gibt Hinweise darauf, wie wichtig diese Ionenkanalfamilie im neuronalen Netzwerk der Retina ist. Um die Bedeutung der HCN-Kanäle in anderen Regionen des ZNS aufzuklären, wurde bereits mit der zellulären und

subzellulären Lokalisation der HCN-Kanäle im Gehirn begonnen (siehe Abschnitt 3.4). Andere Gewebe - beispielsweise das Herz – sollen ebenfalls untersucht werden. Ein Vergleich der immunhistochemischen und elektrophysiologischen Untersuchungen können möglicherweise mehrere aktuelle Fragen beantworten: Erfüllt ein HCN-Kanaltyp jeweils nur eine einzige zelluläre Funktion, beispielsweise die Stabilisierung des Ruhepotentials? Oder erfüllen die vier HCN-Kanaltypen in verschiedenen Zellen z.T. gleiche Funktionen? Existieren heterooligomere HCN-Kanäle mit besonderen Eigenschaften? Wenn es gelingt, bestimmte physiologische Funktionen einem Typ von HCN-Kanal zuzuordnen, könnte dies neue Möglichkeiten eröffnen, um gezielt neue nebenwirkungsarme Medikamente zu entwickeln.

Eine andere Aufgabe, die in Zukunft sehr interessant werden dürfte, ist die Suche nach modulatorischen Untereinheiten, die mit den HCN-Kanalproteinen assoziiert sein könnten. Yu et al. (2001) berichten beispielsweise, daß MiRP1 (*MinK-related peptid 1*) im heterologen Expressionssystem mit HCN1 bzw. HCN2 wechselwirkt und deren Kanaleigenschaften moduliert. MiRP1 ist ein kleines Protein mit einer transmembranalen Region, das als β -Untereinheit des K^+ -Kanals HERG (*human eag-related gene*) an der Entstehung des I_{Kr} -Stroms am Herzen beteiligt ist (Abbott et al., 1999). Über die Expressionsmuster von MiRP1 und den homologen Genen MinK, MiRP2 und MiRP3 ist bislang nicht viel bekannt. Eine interessante Aufgabe dürfte daher die Lokalisation der MiRP/MinK-Proteine in HCN-exprimierenden Geweben - beispielsweise der Rattenretina - sein.

Ungeachtet der Tatsache, ob HCN-Kanäle homo- oder heterooligomere Komplexe bilden, erfüllen sie ihre Funktion stets im Zusammenspiel mit anderen Ionenkanälen und Rezeptoren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ermöglichen genaue Untersuchungen, mit welchen anderen Proteinen die HCN-Kanäle in den verschiedenen Zelltypen ko-lokalisiert sind. Dies könnte ein entscheidender Schritt sein, um die HCN-Kanäle als Teil einer Signalkaskade oder anderer zellulärer Prozesse zu begreifen.

5 Zusammenfassung

Hyperpolarisationsaktivierte und zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle (HCN-Kanäle) wurden elektrophysiologisch in zahlreichen Geweben lokalisiert und charakterisiert. Sie sind beteiligt an der Erzeugung und Regulation zellulärer rhythmischer Aktivierungsmuster, an der Stabilisierung des Membranpotentials und an der Verarbeitung synaptischer Signale. Mittlerweile konnten in allen untersuchten Säugetierspezies vier verschiedene HCN-Kanalgene identifiziert und in heterologen Expressionssystemen elektrophysiologisch untersucht werden. Bislang war unklar, in welchen Zellen die verschiedenen HCN-Kanaltypen exprimiert werden, ob sie heterooligomere Komplexe bilden und welche Funktionen sie in den einzelnen Zellen erfüllen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal spezifische Antikörper gegen alle vier HCN-Kanaltypen hergestellt und charakterisiert. Biochemische Analysen ergaben, daß alle vier HCN-Kanaltypen in der Rattenretina, sowie im Ratten- und Mausgehirn in glykosylierter Form vorliegen. Andere posttranskriptionale oder posttranslationale Modifikationen, die das Laufverhalten der Kanalproteine in Westernblot-Experimenten verändern, wurden nicht beobachtet. Immunhistochemische Färbungen von Rattenretinaschnitten zeigten, daß sich die Expressionsmuster der vier HCN-Kanaltypen deutlich voneinander unterscheiden: In den meisten Bipolarzelltypen wurde jeweils nur ein HCN-Kanaltyp nachgewiesen. Nur in Typ 5-Zapfenbipolarzellen und einigen Ganglienzellen konnten HCN1 und HCN4 ko-lokalisiert werden. Durch Immunpräzipitation wurde untersucht, ob sich in ko-transfizierten HEK 293-Zellen oder in der Rattenretina heterooligomere HCN1/HCN4-Komplexe nachweisen lassen. Ein eindeutiger Nachweis gelang jedoch nicht. Um die Funktion der HCN-Kanäle in den verschiedenen Neuronen des Gehirns aufzuklären, wurde auch damit begonnen, die Lokalisation der HCN-Kanäle im Rattengehirn aufzuklären. Erste Färbungen von Gehirnschnitten zeigten, daß sich auch hier, ähnlich wie in der Rattenretina, die Expressionsmuster der HCN-Kanaltypen deutlich voneinander unterscheiden.

Sowohl die funktionellen Eigenschaften der verschiedenen HCN-Kanaltypen, als auch deren zelluläre und subzelluläre Lokalisation geben erste Hinweise auf die physiologische Funktion der HCN-Kanäle in den einzelnen Zelltypen. In den Zellen, in denen HCN-Kanäle exprimiert werden, kann nun gezielt nach anderen Ionenkanälen und Rezeptoren gesucht werden, die mit den HCN-Kanälen zusammenwirken könnten. Dieses Wissen würde helfen, die Funktion der HCN-Kanäle als Teil einer Signalkaskade oder anderer zellulärer Prozesse besser zu verstehen.

6 Abstract

Hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels (HCN-channels) have been characterized electrophysiologically in numerous tissues. They play a fundamental role in shaping the autonomous rhythmic activity of pacemaker-cells. In many neurons, HCN-channels co-determine resting potential and membrane conductance and thereby play an important role in the integrative behavior of neurons and the sensitivity to synaptic input. Recently, four different genes for HCN-channels have been identified in all mammalian species investigated. But little is known about the cellular expression pattern of HCN-channel subtypes, and their function in these cells. Moreover, it is not clear, whether or not the different subtypes form heteromeric channels.

In the present study specific antibodies against all four HCN-channel subtypes were raised. Biochemical studies revealed, that all four HCN-channel subtypes are expressed in the rat retina, and in the rat and mouse brain in glycosylated form. The sizes of deglycosylated channel proteins are in good agreement with the estimated molecular weights of the HCN-channels. Other posttranscriptional or posttranslational modifications, that would change the sizes of the proteins in westernblot experiments, were not detected. Immunohistochemical stainings of the rat retina showed different expression patterns for the four HCN-channel subtypes: In most bipolar celltypes only one HCN-channel subtype was detected. Only in type 5 bipolar cells and some ganglion cells HCN1 and HCN4 are co-localized and might form heteromeric channels. Immunoprecipitation experiments were performed to detect heteromeric HCN1/HCN4-complexes in co-transfected HEK 293-cells and in the rat retina. But the results were not unequivocal. To reveal the function of HCN-channels in different brain neurons, first investigation on the cellular expression pattern of the HCN-channels in the rat brain were started. As in the retina the HCN-channel subtypes are differentially expressed. The electrophysiological properties of the HCN-channel subtypes, as well as their cellular and subcellular localization indicate some of the physiological functions of HCN-channels in different cell types. We can now search for other ion channels or receptors, that interact with the HCN-channels. This knowledge will help to elucidate the role of HCN-channels in signal cascades or other cellular processes.

7 Literaturverzeichnis

- Abbott, G.W., Sesti, F., Splawski, I., Buck, M.E., Lehmann, M.H., Timothy, K.W., Keatin, M.T. & Goldstein, S.A.N. (1999): MiRP1 forms I_{Kr} potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* **97**, 175-187.
- Accili, E.A., Redaelli, G. & DiFrancesco, D. (1997): Differential control of the hyperpolarization-activated current (i_f) by cAMP gating and phosphatase inhibition in rabbit sino-atrial node myocytes. *J. Physiol.* **500**, 643-651.
- Akopian, A. & Witkovsky, P. (1996): D2 Dopamine receptor-mediated inhibition of a hyperpolarization activated current in rod photoreceptors. *J. Neurophysiol.* **76**, 1828-1835.
- Arbib, M.A., Erdi, P. & Szentagothai, J. (1997): Neuronal organization. Structure, function, and dynamics. A Bradford Book, MIT Press.
- Attwell, D. & Wilson, M. (1980): Behaviour of the rod network in the tiger salamander retina mediated by membrane properties of individual rods. *J. Physiol.* **309**, 287-315.
- Attwell, D., Werblin, F.S. & Wilson, M. (1982): The properties of single cones isolated from tiger salamander retina. *J. Physiol.* **328**, 259-283.
- Backx, P.H., Yue, D.T., Lawrence, J.H., Marban, E. & Tomaselli, G.F. (1992): Molecular localization of an ion-binding site within the pore of mammalian sodium channels. *Science* **257**, 248-251.
- Bader, C.R., MacLeish, P.R. & Schwartz, E.A. (1979): A voltage-clamp study of the light response in solitary rods of the tiger salamander. *J. Physiol.* **296**, 1-26.
- Bader, C.R., Bertrand, D. & Schwartz, E.A. (1982): Voltage-activated and calcium-activated currents studied in solitary rod inner segments from the salamander retina. *J. Physiol.* **331**, 253-284.
- Barnes, S. & Hille, B. (1989): Ionic channels of the inner segment of tiger salamander cone photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* **94**, 719-743.
- Beaumont, V. & Zucker, R.S. (2000): Enhancement of synaptic transmission by cyclic AMP modulation of presynaptic I_h channels. *Nat. Neurosci.* **3**, 133-141.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Bönigk, W., Bradley, J., Müller, F., Sesti, F., Boekhoff, I., Ronnet, G., Kaupp, U.B. & Frings, S. (1999): The native rat olfactory cyclic nucleotide-gated channel is composed of three distinct subunits. *J. Neurosci.* **19**, 5332-5347.
- Bonifacino, J.S., Dell'Angelica, E.C. & Springer, T.A. (1999): Immunoprecipitation. In *Current Protocols in Protein Science* (Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L. et al., eds.), John Wiley & Sons, Inc., pp. 9.8.1-9.8.28.

- Boycott, B.B. & Hopkins, J.M. (1981): Mikroglia in the retina of monkey and other mammals: its distinction from other types of glia and horizontal cells. *Neurosci.* **6**, 679-688.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brown, H.F., DiFrancesco, D. & Noble, S.J. (1979): How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* **280**, 235-236.
- Brown, H.F. & DiFrancesco, D. (1980): Voltage clamp investigations of currents underlying pacemaker activity in rabbit sino-atrial node. *J. Physiol.* **308**, 331-351.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M. (1987): XL1-blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-378.
- Campbell, D.H., Leuscher, E. & Lerman, L.S. (1951): Immunologic absorbents. I. Isolation of antibody by means of a cellulose-protein antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **37**, 575-578.
- Cathala, L. & Paupardin-Tritsch, D. (1997): Neurotensin inhibition of the hyperpolarization-activated cation current (I_h) in the rat substantia nigra pars compacta implicates the protein kinase C pathway. *J. Physiol.* **503**, 87-97.
- Chen, C. & Okayama, H. (1987): High-efficiency transformation of mammalian cells by DNA. *Molec. Cell. Biol.* **7**, 2745-2752.
- Chen, S., Wang, J. & Siegelbaum, S.A. (2001): Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J. Gen. Physiol.* **117**, 491-503.
- Clapham, D.E. (1998): Not so funny anymore: Pacing channels are cloned. *Neuron* **21**, 5-7.
- Corpet, F. (1988): Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* **16**, 10881-10890.
- Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M. & Orcutt, B.C. (1978): Atlas of protein sequence and structure. Vol. 5 (Dayhoff, M.O., ed.), Nat. Biomed. Fdn.
- DiFrancesco, D. (1985): The cardiac hyperpolarizing-activated current, i_f . Origins and developments. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **46**, 163-183.
- DiFrancesco, D. (1993): Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu. Rev. Physiol.* **55**, 455-472.
- DiFrancesco, D. & Tortora, P. (1991): Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* **351**, 145-147.

- Edman, A., Gestrelus, S. & Grampp, W. (1987): Current activation by membrane hyperpolarization in the slowly adapting lobster stretch receptor neuron. *J. Physiol.* **384**, 671-690.
- Eismann, E., Müller, F., Heinemann, S.H. & Kaupp, U.B. (1994): A single negative charge within the pore region of a cGMP-gated channel controls rectification, Ca²⁺ blockage and ionic selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1109-1113.
- Elion, E.A. (1999): Detection of protein-protein interactions by Coprecipitation. In *Current Protocols in Protein Science* (Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L. et al., eds.), John Wiley & Sons, Inc., pp. 19.4.1-19.4.9.
- Euler, T. & Wässle, H. (1995): Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. *J. Comp. Neurol.* **361**, 461-478.
- Euler, T., Schneider, H. & Wässle, H. (1996): Glutamate responses of bipolar cells in a slice preparation of the rat retina. *J. Neurosci.* **16**, 2934-2944.
- Fain, G.L., Quandt, F.N. & Bastian, B.L. (1978): Contribution of a caesium-sensitive conductance increase to the rod photoresponse. *Nature* **272**, 467-469.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analyt. Biochem.* **132**, 6-13.
- Franz, O., Liss, B., Neu, A. & Roeper, J. (2000): Single-cell mRNA expression of HCN1 correlates with a fast gating phenotype of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channels (Ih) in central neurons. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 2685-2693.
- Gauss, R., Seifert, R. & Kaupp, U.B. (1998): Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* **393**, 583-587.
- Gauss, R. & Seifert, R. (2000): Pacemaker oscillations in heart and brain: a key role for hyperpolarization-activated cation channels. *Chronobiol. Int.* **17**, 453-469.
- Grant, G.A. (1997): Synthetic peptides for production of antibodies that recognize intact proteins. In *Current Protocols in Protein Science* (Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L. et al., eds.), John Wiley & Sons, Inc., pp. 18.3.8-18.3.11.
- Greferath, U., Grünert, U. & Wässle, H. (1990): Rod bipolar cells in the mammalian retina show protein kinase C-like immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* **301**, 433-442.
- Haverkamp, S., Grünert, U. & Wässle, H. (2000): The cone pedicle, a complex synapse in the retina. *Neuron* **27**, 85-95.
- Heery, D.M., Gannon, F. & Powell, R. (1990): A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices. *Trends in Genetics* **6**, 173.
- Henn, D.K., Baumann, A. & Kaupp, U.B. (1995): Probing the transmembrane topology of cyclic nucleotide-gated ion channels with a gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7425-7429.

- Hestrin, S. (1987): The properties and function of inward rectification in rod photoreceptors of the tiger salamander. *J. Physiol.* **390**, 319-333.
- Hille, B. (1992): Ionic channels of excitable membranes. Vol. 2, Sinauer Associates, Inc.
- Hsu, S.M., Raine, L. & Fanger, H. (1981): Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques – a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* **29**, 577-580.
- Hubel, D.H. (1988): Eye, Brain and Vision. Scientific American Library Series.
- Ishii, T.M., Takano, M., Xie, L.-H., Noma, A. & Ohmori, H. (1999): Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J. Biol. Chem.* **274**, 12835-12839.
- Jan, L.Y. & Jan, Y.N. (1992): Structural elements involved in specific K⁺ channel functions. *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 537-555.
- Kaneko, A., Pinto, L.H. & Tachibana, M. (1989): Transient calcium current of retinal bipolar cells of the mouse. *J. Physiol.* **410**, 613-629.
- Karschin, A. & Wässle, H. (1990): Voltage- and transmitter-gated currents in isolated rod bipolar cells of rat retina. *J. Neurophysiol.* **63**, 860-876.
- Kaupp, U.B. (1995): Family of cyclic nucleotide gated ion channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**, 434-442.
- Kaupp, U.B., Niidome, T., Tanabe, T., Terada, S., Bönigk, W., Stühmer, W., Cook, N.J., Kangawa, K., Matsuo, H., Hirose, T., Miyata, T. & Numa, S. (1989): Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature* **342**, 762-766.
- Kaupp, U.B. & Seifert, R. (2001): Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 235-257.
- Kellerman, O.K. & Ferenci, T. (1982): Maltose binding protein from *E.coli*. *Methods in Enzymology* **90**, 459-463.
- Kozak, M. (1984): Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucl. Acids Res.* **12**, 857-872.
- Krieger, J., Strobel, J., Vogl, A., Hanke, W. & Breer, H. (1999): Identification of a cyclic nucleotide- and voltage-activated ion channel from insect antennae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **29**, 255-267.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Ludwig, A., Xiangang, Z., Jeglitsch, M., Hofmann, F. & Biel, M. (1998): A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* **393**, 587-591.

- Ludwig, A., Zong, X., Stieber, J., Hullin, R., Hofmann, F. & Biel, M. (1999): Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J.* **18**, 2323-2329.
- Lüthi, A. & McCormick, D.A. (1999): Modulation of a pacemaker current through Ca^{2+} -induced stimulation of cAMP production. *Nat. Neurosci.* **2**, 634-641.
- MacKinnon, R. (1991): Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* **350**, 232-235.
- MacKinnon, R. (1995): Pore loops: An emerging theme in ion channel structure. *Neuron* **14**, 889-892.
- MacKinnon, R. & Yellen, G. (1990): Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K^+ channels. *Science* **250**, 232-235.
- Magee, J.C. (1998): Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* **18**, 7613-7624.
- Magee, J.C. (1999): Dendritic I_h normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons. *Nature Neurosci.* **6**, 508-514.
- Mandel, M. & Higa, A. (1970): Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159-162.
- Maricq, A.V. & Korenbrot, J.I. (1990): Potassium currents in the inner segment of single retinal cone photoreceptors. *J. Neurophysiol.* **64**, 1929-1940.
- Marx, T., Gisselmann, G., Stoertkuhl, K.F., Hovemann, B.T., & Hatt, H. (1999): Molecular cloning of a putative voltage- and cyclic nucleotide-gated ion channel present in the antennae and eyes of *Drosophila melanogaster*. *Invert. Neurosci.* **4**, 55-63.
- McCormick, D.A. & Bal, T. (1997): Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. *Annu. Rev. Neurosci.* **20**, 185-215.
- Meyer, T.S. & Lamberts, B.L. (1965): Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of *parotid saliva* proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim. Biophys. Acta* **107**, 144-145.
- Miller, C. (1991): 1990: Annus mirabilis of potassium channels. *Science* **252**, 1092-1096.
- Monteggia, L.M., Eisch, A.J., Tang, M.D., Kaczmarek, L.K. & Nestler, E.J. (2000): Cloning and localization of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel family in rat brain. *Mol. Brain. Res.* **81**, 129-139.
- Moosmang, S., Biel, M., Hofmann, F. & Ludwig, A. (1999): Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol. Chem.* **380**, 975-980.
- Moosmang, S., Stieber, J., Zong, X., Biel, M., Hofmann, F. & Ludwig, A. (2001): Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur. J. Biochem.* **268**, 1646-1652.

- Moroni, A., Gorza, L., Beltrame, M., Gravante, B., Vaccari, T., Bianchi, M.E., Altomare, C., Longhi, R., Heurteaux, C., Vitadello, M., Malgaroli, A. & DiFrancesco, D. (2001): Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current I_f . *J. Biol. Chem.* **276**, 29233-29241.
- Müller, F. & Kaupp, U.B. (1998): Signaltransduktion in Sehzellen. *Naturwissenschaften* **85**, 49-61.
- Mullis, K.B., Faron, F.A., Schar, S., Saiki, R., Horn, G. & Ehrlich, H. (1986): Specific amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-273.
- Noma, A., Morad, M. & Irisawa, H. (1983): Does the "pacemaker current" generate the diastolic depolarization in the rabbit SA node cells? *Pflügers Arch.* **397**, 190-194.
- Ogden, T. (1978): Astrocytes in neurofibrillar layer. Golgi studies. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **17**, 499-510.
- Pape, H.-C. (1996): Queer current and pacemaker: The hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu. Rev. Physiol.* **58**, 299-327.
- Pape, H.-C. & McCormick, D.A. (1989): Noradrenaline and serotonin selectively modulate thalamic burst firing by enhancing a hyperpolarization-activated cation current. *Nature* **340**, 715-718.
- Peichl, L. (1990): Prinzipien der Bildverarbeitung in der Retina. *Optometrie* **3**, 3-12.
- Pongs, O. (1992): Structural basis of voltage-gated K^+ channel pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**, 359-365.
- Riggs, P. (1994): Expression and purification of maltose-binding protein fusions. In *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E. et al., eds.), John Wiley & Sons, Inc., pp. 16.6.1-16.6.14.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989): Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Santoro, B., Grant, S.G.N., Bartsch, D. & Kandel, E.R. (1997): Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to Eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proc Natl Acad Sci USA*. **94**, 14815-14820.
- Santoro, B., Liu, D.T., Yao, H., Bartsch, D., Kandel, E.R., Siegelbaum, S.A. & Tibbs, G.R. (1998): Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* **93**, 717-729.
- Santoro, B. & Tibbs, G.R. (1999): The HCN gene family: Molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann. NY Acad. Sci.* **868**, 741-764.

- Santoro, B., Chen, S., Lüthi, A., Pavlidis, P., Shumyatsky, G.P., Tibbs, G.R. & Siegelbaum, S.A. (2000): Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J. Neurosci.* **20**, 5264-5275.
- Schiller, P.H. (1992): The ON and OFF channels of the visual system. *Trends in Neurosci.* **15**, 86-92.
- Scholten, A. (1998): Klonierung von hyperpolarisationsaktivierten Ionenkanälen (I_h -Kanäle) aus menschlichen Geweben. Diplomarbeit, Universität Köln.
- Seifert, R., Scholten, A., Gauss, R., Mincheva, A., Lichter, P. & Kaupp, U.B. (1999): Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 9391-9396.
- Shi, W., Wymore, R., Yu, H., Wu, J., Wymore, R.T., Pan, Z., Robinson, R.B., Dixon, J.E., McKinnon, D. & Cohen, I.S. (1999): Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ. Res.* **85**, e1-e6.
- Short, J.M., Fernandez, J.M., Sorge, J.A. & Huse, W.D. (1988): λ ZAP: a bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucl. Acids Res.* **16**, 7583-7600.
- Solomon, J.S. & Nerbonne, J.M. (1993): Hyperpolarization-activated currents in isolated superior colliculus-projecting neurons from rat visual cortex. *J. Physiol.* **462**, 393-420.
- Stryer, L. (1991): Visual excitation and recovery. *J. Biol. Chem.* **266**, 10711-10714.
- Stühmer, W. (1991): Structure-function studies of voltage-gated ion channels. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **20**, 65-78.
- Takio, K., Wade, R.D., Smith, S.B., Krebs, E.G., Walsh, K.A. & Titani, K. (1984): Guanosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase, a chimeric protein homologous with two separate protein families. *Biochemistry* **23**, 4207-4218.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Ulens, C. & Tytgat, J. (2001): Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels. *J. Biol. Chem.* **276**, 6069-6072.
- Vaccari, T., Moroni, A., Rocchi, M., Gorza, L., Bianchi, M.E., Beltrame, M. & DiFrancesco, D. (1999): The human gene coding for HCN2, a pacemaker channel of the heart. *Biocim. Biophys. Acta* **1446**, 419-425.
- Wässle, H. & Boycott, B.B. (1991): Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol. Rev.* **71**, 447-480.

- Weber, I.T., Steitz, T.A., Bubis, J. & Taylor, S.S. (1987): Predicted structures of cAMP binding domains of type I and II regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* **26**, 343-351.
- Wollmuth, L.P. & Hille, B. (1992): Ionic selectivity of I_h channels of rod photoreceptors in tiger salamanders. *J. Gen. Physiol.* **100**, 749-765.
- Wong, S.S. (1993): Chemistry of protein conjugation and cross-linking. CRC Press, Inc.
- Wu, J.Y. & Cohen, I.S. (1997): A possible role of tyrosine kinases in the regulation of I_F in rabbit SA node myocytes. *Biophys. J.* **72**, A476.
- Yau, K.-W. (1994): Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**, 9-32.
- Yanagihara, K. & Irisawa, H. (1980): Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sino atrial node cell. *Pflügers Arch.* **385**, 11-19.
- Yellen, G., Jurman, M.E., Abramson, T. & MacKinnon, R. (1991): Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K^+ channel. *Science* **251**, 939-942.
- Yool, A.J. & Schwarz, T.L. (1991): Alteration of ionic selectivity of a K^+ channel by mutation of the H5 region. *Nature* **349**, 700-704.
- Yu, H., Chang, F. & Cohen, I.S. (1993): Phosphatase inhibition by calyculin A increases i_f in canine Purkinje fibers and myocytes. *Pflügers Arch.* **422**, 614-616.
- Yu, H., Wu, J., Potapova, I., Wymore, R.T., Holmes, B., Zuckerman, J., Pan, Z., Wang, H., Shi, W., Robinson, R.B., El-Maghrabi, M.R., Benjamin, W., Dixon, J., McKinnon, D., Cohen, I.S. & Wymore, R. (2001): MinK-related peptide 1. A β subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ. Res.* **88**, e84-e87.

8 Anhang

8.1 Aminosäuresequenzvergleich der HCN-Kanäle HCN1 bis HCN4 aus der Ratte

Der Sequenzvergleich wurde zunächst mit dem Programm MULTALIN (Corpet, 1988) anhand der Dayhoff-Matrix durchgeführt und anschließend optimiert. Optimierende Lücken sind durch Bindestriche, gleiche Aminosäuren durch Punkte markiert. Die transmembranalen Segmente (S1-S6), die Pore und die Bindestelle für zyklische Nukleotide (cNMP-Bindestelle) sind durch Linien über der Sequenz gekennzeichnet.

rHCN1	ME-----GGGKP---NSASNSRDDGNSVY-----PSKAPATGPAAADKR---LGTPPGGGA	45
rHCN2	MD-----ARG···R··-GD·PGATPAP·PP-----·PPP·PAP·QPQPPAPPNPPTPSHP	50
rHCN3	M·-----EE·RPAVG··EA-----ATP·RE·P···PAQ-----	28
rHCN4	MDKLPPSMRKRLYSLPQQV·A·AWIMDEEEDGEEE·AGGLQDPSRRSIRLRPL··PS·SVAAGCSES·GAA··AADSE·P	80
rHCN1	---AGKEHGNSVC--FKV-----DGGGGEEPAGSFEDAEGPRR-----	78
rHCN2	ESADEPGPRSRL·SRDSSCTPG-AAKGGANGEC·RG··QC·P·GPARGPKV-----	100
rHCN3	-----ARAASG·VP·S·PE·K·-----	45
rHCN4	GRS···SST·GD·RR·RGSLASLGSRRGGSG·A··GSSL·HLH·SAEE··LIAAEGDASPGEDRTPPGATEPERPGAAA	160
rHCN1	-----QYGFMRQFTSMLQPGVNKFSRLRMFGSQKAV	109
rHCN2	-----SFSCRGAASGPAAAEAGSEEAG---PAGEPRGS·AS·L···GAL·····	162
rHCN3	-----LGTLL···T·····V···H···	70
rHCN4	QPAASPPPQQPPQPASASCEQPSADTAIKVEGGAAASDQILPEAEVRLG·S·····GA·····	240
	-----S1-----S2-----	
rHCN1	EKEQERVKTAGFWIIHPYSDFRFYWDLIMLIMMVGNLVIIIPVGITFFTEQTTTPWIIFNVASDTVFLDLIMNFRTGTVN	189
rHCN2	·R·····S···A·····FT···LF·····I·····KDE···A···V···V···F···M···VL·····I·I	242
rHCN3	·I·····S···A·····LL·····IVL·····K·ENSP···V···L···F·····VL·····I·V	150
rHCN4	·R·····S·······T···LL·····I·····KDEN·····V···V···F···I···VL·····I·V	320
	-----S3-----S4-----	
rHCN1	EDSSEIILDPKVIKMYLKSFWVDFISSIPVDYIFLIVE--KGMDSEVYKTARALRIVRFTKILSLRLRLRLIRLYI	267
rHCN2	··NT·····EK···KK···RT·····V·······I·····	320
rHCN3	·EGA···L·A·RA·RTR···RT···L···L·····V···LEPRL·A·····M	230
rHCN4	··NT·····QR···K·······TRI·····	398
	-----S5-----Pore-----	
rHCN1	HQWEEIFHMTYDLASAVVRIFNLIQMMLLLCHWDGCLQFLVPLLQDFPPDCWVSLNEMVNDSWGKQYSYALFKAMSHMLC	347
rHCN2	·····M···C···S·····M····S·····I·N···H···SEL···F·····	400
rHCN3	·····M····S···G··SE·····I···T···G···H···S····V·T·····LVV···S···R·····	310
rHCN4	·····V·······M····H·····I·G···N·····	478
	-----S6-----	
rHCN1	IGYGAQAPVSMSDLWITMLSMIVGATCYAMFVGHATALIQSLDSSRRQYQEKYQVEQYMSFHKLPADMRQKIHDYYEHR	427
rHCN2	···R···E···T·I·L·····I·····F·····	480
rHCN3	···Q···G··P·V·L·····I·····T···R···E·····	390
rHCN4	···R···G···V·L·····I·····P·T···R·····	558
	-----cNMP-Bindestelle-----	
rHCN1	YQGKIFDEENILSELNDPLREEIVNFNCRKLVATMPLFANADPNFVTAMLSKLRFEVFQPGDYIIREGAVGKKMYFIQHG	507
rHCN2	···M···DS···G···G·····T···K·····TI·····	560
rHCN3	···M····S···G··SE·····I···T···G···H···S····V·T·····LVV···S···R·····	470
rHCN4	···M····S···G··SE·····I·····S·····S···T·····TI·····	638

rHCN1	VAGVITKSSKEMKLTGDSYFGEICLLTKGRRTASVRADTYCRLYSLSVDNFEVLEEYPMRRRAFETVAIDRLDRIGKKN	587
rHCN2	·VS·L·GN·····S·····R·····	640
rHCN3	LLS·LARGARDTR·····R·····H···A····F·····M···R·····	550
rHCN4	·VS·L·GN···T·A·····R·····L·····	718

rHCN1	SILLQKFQKDLNTGVFNNQENEILKQIVKHDREMVQ-----AIP---PINYPQM--TALNCTSSSTTTPTSRMRTQ	652
rHCN2	...H·V·H·SS·····A·IQE···Y·····-----QAE LGQR	683
rHCN3	...QR·-RSEFSP--SSSGGVMEQHL·Q··D·AR-----GIRGLAPGTGA·LSGK	599
rHCN4	...H·V·H·S····Y·····IQ···R·····AHCAHRVQAAAS·T·TPT·VIWTPLIQAP·QAAAA·SVAIALTHH	798
rHCN1	S---PPVYTAT-----SLSHSNLHSPSPST-----QTPQPSAI-----LSP-----	685
rHCN2	---VGLFPPP-----PPPQVT·AIATL-----QAVAMSF-----	710
rHCN3	---VLWEP-----V·AP·QAAAVTS-----NVAIALT-----	625
rHCN4	PRLPAAIFRPPPGPLGNLGAGQTPRHPRRLQ·IP·A·G·A·ASSPSQVD·SS·SFHIQQLAGFSAPPG··LLPSS	878
rHCN1	-CSYTTAVCS-PPIQSP----LATRTF-HYASPTASQLS----LMQQPQPQLQQSQVQQTQPQ-----	737
rHCN2	-----P-----QV·R·LVGP·ALGSPR·VRRAP·GPLPPAASPGP·-----	747
rHCN3	-----·QRG·LPLSPDSPATL·ARSARRSAGSPASPLVPVR-----	661
rHCN4	SS·PPPGA·S·APT·STSTAAT·TG·G·FHKALGGS·SSDSP·LTPL·GARSP·AA·PP·PLPGARGGLGLEHFL	958
rHCN1	-PQPQPQPQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPQTPG-----	772
rHCN2	-AASP·AA·SSPRAPRTSPYGVPG-----	770
rHCN3	AGPLLARG·WASTSRLPAPPARTLHASL-----	689
rHCN4	P·P·SSRS·SSSPG·LG·PPGELSPGLAAGP·S·PETPPRPERPSFMAGASGGASPVAFTPRGGLSPFGHSPGPPRTFPS	1038
rHCN1	-----SSTPKNEV--HKSTQALHNTLNTREVRPLSASQPSLPHEVSTMISRPHP-TVGESLASIP--	829
rHCN2	-----S·ATR·-----GP·PARR·S·AS·····GAPAPSPAASARPASS·TPRL----	822
rHCN3	-----R·GRSQ·SLLGPPPGGGRR·GPRG·····QRATGDG·PRRKGSGS·R·PP----	747
rHCN4	APPRASGSHGSLLLPPA·P·PPQ·PQRRG·PP·TPGR·QDLKLI·····A·QDGAQTLR·AS·HSS···M·AFSLYP	1118
rHCN1	-QP VATVHSTGLQAGSRS--TVP-QRVTLFRQMSSGAIPPNR--GVPPAPPPPAAVQRESPSVLNKDPDAEKPRFASNL	902
rHCN2	--GP·PTTR·AAPSPD-----DSA-----G·ASGLDPL-----SARS·LS···	863
rHCN3	--SGLLAKPP·TVQP·-----SSV·EP·-----TPRG·QISA·M	780
rHCN4	RAGGGSGS·G·GPPG·PYGAI·G·H···P·KT···SL·PLSLF·ARA·SSGGPPLTAAPQREPGARSEPVRSKLP···	1198

8.2 Zusammenfassung der Westernblot-Analysen mit Membranproteinen der Rattenretina

Die Tabelle gibt an, in welcher Verdünnung die Antikörper eingesetzt wurden und wieviel Membranprotein aus der Rattenretina auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen werden mußte, um ein spezifisches Signal zu erhalten. In den Fällen, in denen kein spezifisches Signal nachgewiesen werden konnte, sind die niedrigste Verdünnung und die höchste Proteinmenge angegeben, die zum Test verwendet wurden.

Antikörper	Verdünnung	Proteinmenge	spezifische Signale	Anmerkungen
HCN1-Antikörper				
PPc63K	1:100	50 µg	nein	
IHR-2G4	1:250	50 µg	ja	mehrere Zusatzbanden kleiner 70 kDa
IHR-6C10	1:20	50 µg	ja	mehrere Zusatzbanden kleiner 70 kDa
RTQ-7C3	1:250-1:500	50 µg	ja	
RTQ-8D12	1:2	50 µg	nein	
HCN2-Antikörper				
QQA-1A6	1:2	50 µg	nein	
QQA-3G7	1:5-1:10	50 µg	ja	
QQA-4A6	1:5-1:20	50 µg	ja	
HCN3-Antikörper				
TLL-4D9	1:5	50 µg	ja	
TLL-4F6	1:2	50 µg	nein	
TLL-6C5	1:5-1:20	25 µg	ja	
TLL-7H7	1:5-1:20	25 µg	ja	
HCN4-Antikörper				
PPc73K	1:400	200 µg	ja	Zusatzbande bei ca. 50 kDa
SHG-1E5	1:5-1:10	50 µg	ja	
SHG-1E7	1:5-1:10	50 µg	ja	Zusatzbande bei ca. 110 kDa
SHG-2B12	1:2	50 µg	ja	
SHG-4A8	1:2	50 µg	ja	Zusatzbande bei ca. 110 kDa

8.3 Zusammenfassung der Westernblot-Analysen mit Membranproteinen des Rattengehirns

Die Tabelle gibt an, in welcher Verdünnung die Antikörper eingesetzt wurden und wieviel Membranprotein aus dem Rattengehirn auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen werden mußte, um ein spezifisches Signal zu erhalten. In den Fällen, in denen kein spezifisches Signal nachgewiesen werden konnte, sind die niedrigste Verdünnung und die höchste Proteinmenge angegeben, die zum Test verwendet wurden. "n.t." bedeutet, daß diese Antikörper nicht im Westernblot getestet wurden.

Antikörper	Verdünnung	Proteinmenge	spezifische Signale	Anmerkungen
HCN1-Antikörper				
PPc63K	1:100	25 µg	nein	
IHR-2G4	1:250	25 µg	ja	
IHR-6C10	1:20	25 µg	ja	
RTQ-7C3	1:250-1:500	25 µg	ja	
RTQ-8D12	1:2	25 µg	nein	
HCN2-Antikörper				
QQA-1A6	1:2	25 µg	ja	
QQA-3G7	1:10	25 µg	ja	
QQA-4A6	1:5-1:20	25 µg	ja	
HCN3-Antikörper				
TLL-4D9	n.t.	n.t.	n.t.	
TLL-4F6	n.t.	n.t.	n.t.	
TLL-6C5	1:5	150 µg	nein	Hintergrund durch den 2.Antikörper ist zu hoch; keine Aussage über spezifische Signale möglich
TLL-7H7	n.t.	n.t.	n.t.	
HCN4-Antikörper				
PPc73K	n.t.	n.t.	n.t.	
SHG-1E5	1:5	75 µg	ja	
SHG-1E7	n.t.	n.t.	n.t.	
SHG-2B12	n.t.	n.t.	n.t.	
SHG-4A8	n.t.	n.t.	n.t.	

8.4 Zusammenfassung der Westernblot-Analysen mit Membranproteinen des Mausgehirns

Die Tabelle gibt an, in welcher Verdünnung die Antikörper eingesetzt wurden und wieviel Membranprotein aus dem Mausgehirn auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen werden mußte, um ein spezifisches Signal zu erhalten. In den Fällen, in denen kein spezifisches Signal nachgewiesen werden konnte, sind die niedrigste Verdünnung und die höchste Proteinmenge angegeben, die zum Test verwendet wurden. "n.t." bedeutet, daß diese Antikörper nicht im Westernblot getestet wurden.

Antikörper	Verdünnung	Proteinmenge	spezifische Signale	Anmerkungen
HCN1-Antikörper				
PPc63K	1:100	25 µg	nein	
IHR-2G4	1:250	25 µg	ja	
IHR-6C10	1:20	25 µg	ja	
RTQ-7C3	1:250-1:500	25 µg	ja	
RTQ-8D12	1:5	25 µg	ja	
HCN2-Antikörper				
QQA-1A6	1:2	50 µg	nein	
QQA-3G7	1:10	25 µg	ja	
QQA-4A6	1:5-1:20	25 µg	ja	
HCN3-Antikörper				
TLL-4D9	n.t.	n.t.	n.t.	
TLL-4F6	n.t.	n.t.	n.t.	
TLL-6C5	n.t.	n.t.	n.t.	
TLL-7H7	n.t.	n.t.	n.t.	
HCN4-Antikörper				
PPc73K	n.t.	n.t.	n.t.	
SHG-1E5	1:5	75 µg	ja	
SHG-1E7	n.t.	n.t.	n.t.	
SHG-2B12	n.t.	n.t.	n.t.	
SHG-4A8	n.t.	n.t.	n.t.	

8.5 Zur Transfektion verwendete cDNA-Klone von HCN-Kanälen

Alle hier aufgeführten Klone von HCN-Kanälen wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet, um HEK 293-Zellen transient zu transfizieren (2.9.2). Es handelt sich um Derivate des Plasmidvektors pcDNA I Amp (Invitrogen; 2.2.1), in die jeweils die vollständige cDNA-Sequenz eines HCN-Kanals eingefügt wurde. Vor dem Startkodon ATG wurde jeweils eine ideale ribosomale Bindestelle CCACC ("Kozak-Sequenz"; Kozak, 1984) eingeführt. Das HA-Epitop, mit dem einige Klone versehen wurden, besteht aus neun Aminosäuren (YPYDVPDYA) und ermöglicht den immunologischen Nachweis durch den Antikörper rat- α HA High Affinity (Roche, Mannheim). Die Klone wurden hergestellt von Frau Dr. R. Gauss (RG), Dr. W. Bönigk (WB) und A. Scholten (AS).

Klonbezeichnung	Spezies	kloniert durch	Modifikation
pcA-hHCN1	Mensch	RG	keine
pcA-hHCN1-HA	Mensch	RG	HA-Epitop an den C-Terminus angehängt
pcA-rHCN1	Ratte	WB	keine
pcA-bHCN1	Rind	WB	keine
pcA-bHCN1-HA	Rind	WB	HA-Epitop an den C-Terminus angehängt
pcA-rHCN2	Ratte	WB	keine
pcA-rHCN2-HA	Ratte	WB	HA-Epitop an den C-Terminus angehängt
pcA-rHCN3	Ratte	WB	keine
pcA-rHCN3-HA	Ratte	WB	HA-Epitop an den C-Terminus angehängt
pcA-rHCN3-S3-HA-S4	Ratte	WB	HA-Epitop in die extrazelluläre Schleife zwischen S3 und S4 eingefügt (zwischen Aminosäuren L195 und D196)
pcA-hHCN4	Mensch	AS	keine
pcA-hHCN4-HA	Mensch	AS	HA-Epitop an den C-Terminus angehängt

8.6 Verwendete primäre Antikörper (HCN-unspezifisch)

Aufgeführt sind alle in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper, die nicht gegen HCN-Kanäle gerichtet sind. In der Spalte "Antigen" ist angegeben, welches Protein von dem jeweiligen Antikörper erkannt wird. Die Antikörper wurden im Westernblot (WB), in der Immunzytochemie (IZC) oder in der Immunhistochemie (IHC) eingesetzt.

Bezeichnung (hergestellt in)	Hersteller	Antigen	Verdünnung
rat- α HA High Affinity (Ratte)	Roche, Mannheim	HA-markierte Proteine	1:2.000 im WB 1:200 in der IZC
PKC α (Kaninchen)	Santa Cruz; Santa Cruz, USA	Proteinkinase C, α -Isoform	1:40.000 in der IHC
Recoverin (Kaninchen)	Dr. Koch; IBI-1, Forschungszentrum Jülich	Recoverin	1:40.000 in der IHC
Chat (Ziege)	Chemicon, Temicula, USA	Cholin-Acetyltransferase	1:100 in der IHC
mGluR6 (Kaninchen)	Dr. Nakanishi; Universität Kyoto, Japan	Metabotroper Glutamatrezeptor, Typ 6	1:7.500 in der IHC
GluR1 (Kaninchen)	Chemicon, Temicula, USA	Ionotroper Glutamatrezeptor, Typ 1	1:100 in der IHC
CabP (Maus)	Sigma, Deisenhofen	Calbindin 28 K	1:300 in der IHC

8.7 Verwendete sekundäre und tertiäre Antikörper

Aufgeführt sind alle in dieser Arbeit verwendeten sekundären und tertiären Antikörper. In der Spalte "Bezeichnung (Konjugat)" ist angegeben, ob der Antikörper mit der Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase*; HRPO), mit Biotin oder mit einem Fluorophor konjugiert ist. In der Spalte "Antigen" ist angegeben, welche Immunglobuline von dem jeweiligen Antikörper erkannt werden. Die Antikörper wurden im Westernblot (WB), in der Immunzytochemie (IZC) oder in der Immunhistochemie (IHC) eingesetzt.

Bezeichnung (Konjugat)	Hersteller	Antigen	Verdünnung
Esel-Anti-Kaninchen (Cy3)	Dianova, Hamburg	Kaninchen-Immunglobuline	1:1.000 in der IHC
Esel-Anti-Kaninchen (HRPO)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg	Kaninchen-Immunglobuline	1:5.000 im WB 1:100 in der IZC
Esel-Anti-Maus (Cy5)	Dianova, Hamburg	Maus-Immunglobuline	1:100 in der IHC
Esel-Anti-Ratte (Cy3)	Dianova, Hamburg	Ratten-Immunglobuline	1:500 in der IHC
Esel-Anti-Ziege (FITC)	Dianova, Hamburg	Ziegen-Immunglobuline	1:100 in der IHC
Maus-Anti-Ratte-IgM (HRPO)	BioSource, Camarillo, USA	Ratten-Immunglobuline der Subklasse IgM	1:5.000 im WB
Ziege-Anti-Kaninchen (Alexa488)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande	Kaninchen-Immunglobuline	1:500 in der IHC
Ziege-Anti-Maus (Alexa488)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande	Maus-Immunglobuline	1:500 in der IHC
Ziege-Anti-Ratte (Alexa488)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande	Ratten-Immunglobuline	1:500 in der IHC
Ziege-Anti-Ratte (Alexa568)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande	Ratten-Immunglobuline	1:500 in der IHC
Ziege-Anti-Ratte (Biotin)	Dianova, Hamburg	Ratten-Immunglobuline	1:100 bis 1:500 in der IHC
Ziege-Anti-Ratte-IgG+M (HRPO)	Dianova, Hamburg	Ratten-Immunglobuline der Subklassen IgG und IgM	1:5.000 im WB 1:100 in der IZC

8.8 Sequenzen und Hybridisierungsbereiche aller verwendeter Primer

Die Sequenzen aller in dieser Arbeit verwendeter Primer sind in 5'→3'-Richtung angegeben. Die klein geschriebenen Nukleinsäuren hybridisieren nicht mit der Matrizen-DNA. Für die Primer, die in einer HCN-Kanalsequenz hybridisieren, sind die genauen Positionen im Gen angegeben. Die erste Nukleinsäure des Startkodons ATG ist dabei Position +1.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Hybridisierungsbereich	Verwendung
#2119	CAGgAAttcCCACAGACACCTGG	2317-2339 (rHCN1)	Herstellung des Fusionsproteins MBP-IHR
#2120	agatctAgAgATTCTGAAGCAAAACG	2713-2737 (rHCN1)	
#2228	GACCTCAACTCCGGCGT	2182-2198 (hHCN4)	Herstellung einer hHCN4-spezif. Northernblot-Sonde
#2230	GTTGCCCAGCCCAGATC	2432-2448 (hHCN4)	
#2245	GTGAAGCATGACAGaGAG	1876-1893 (hHCN1)	Herstellung einer hHCN1-spezif. Northernblot-Sonde
#2247	GGCTGaGtCTGCTGTAC	2212-2228 (hHCN1)	
#9003	TAAGTTGGGTAACGCCAGGG	Multiple Klonierungsstelle in pMal c2X	Sequenzierung von pMal c2X-Derivaten
#9007	CGTCAGACTGTCGATGAAGCC	Multiple Klonierungsstelle in pMal c2X	
#9036	AGGCTGTAGAGCCGCTTGCG	25-44 (hHCN4)	Sequenzierung von hHCN4; Aufklärung der Exon/Intron-Grenzen
#9037	AGTCGGCCGGATTTTGGATT	743-762 (hHCN4)	
#9038	CCCACAGGAATGATAATCAG	829-848 (hHCN4)	
#9039	ATGCGCACCACGGCGCTGGC	1234-1253 (hHCN4)	
#9040	AGGACTTCCCTGACGACTGC	1328-1347 (hHCN4)	
#9041	AGCATGTGGCTCATGGCCTT	1411-1430 (hHCN4)	
#9042	CTGCCCTCATCCAGTCCCTG	1541-1560 (hHCN4)	
#9043	TGGATGCGCTGCCGGGTGTC	1636-1655 (hHCN4)	
#9044	TGGCAAACAGTGGCATGGAG	1773-1792 (hHCN4)	
#9045	TGCTACCAAGGGCAACAAG	1925-1944 (hHCN4)	
#9046	GTCGGCCTCACGCTGGCTG	2009-2028 (hHCN4)	
#9047	CCTTCGAGACCGTGGCGCTG	2105-2124 (hHCN4)	
#9048	CGCCGGAGTTGAGGTCGTGC	2178-2197 (hHCN4)	

Danke

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologische Informationsverarbeitung (IBI-1) des Forschungszentrums Jülich angefertigt. Ich bedanke mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere gilt mein Dank:

- Prof. Dr. U.B. Kaupp für die Überlassung des Themas, die engagierte Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit und seine stetige Diskussionsbereitschaft,
- Frau Dr. R. Gauss und Dr. F. Müller, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben,
- Frau Dr. E. Kremmer für die Herstellung der monoklonalen Antikörper und ihre hilfreiche Unterstützung in allen Fragen der Immunologie,
- Dr. F. Müller, Dr. T.J. Görös und Frau Dr. S. Haverkamp für die Anfertigung und Färbung der immunhistochemischen Schnitte,
- Frau M. Bruns, Dr. A. Baumann und Frau Dr. Gauss für die unentbehrliche Hilfe in der Zellkultur,
- Frau A. Eckert und Herrn R. Esser für die freundliche Hilfe bei allen organisatorischen Problemen,
- Frau P. Censarek und Herrn F. Drews für die Hilfe bei der Endkorrektur des Manuskripts,
- Dr. M. Beyermann für die Synthese der Peptide,
- Dr. W. Bönigk und Frau Dr. R. Gauss für die Überlassung der Plasmide,
- Dr. W. Bönigk für die hilfreichen und unterhaltenden Gespräche im Büro.

Prof. Dr. R. Sterner möchte ich für die Übernahme der Beurteilung dieser Arbeit als Gutachter der Universität zu Köln danken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, die gerade in schlechten Zeiten für mich da waren und mich unterstützt haben.