



Institut für Biologische Informationsverarbeitung

Molekulare Grundlagen der Modulation von HCN-Kanälen durch Protonen

Andreas Neef

Herausgeber und Vertrieb: Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek
D-52425 Jülich
Telefon (02461) 615368 - Telefax (02461) 61-6103
e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de
Internet: <http://www.fz-juelich.de/zb>

Redaktion: Institut für Biologische Informationsverarbeitung
D 38 (Diss., Köln, Univ., 2004)

Vollständig veröffentlicht im Internet

Persistent Identifier: [urn:nbn:de:0001-00190](http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn:nbn:de:0001-00190)
<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn:nbn:de:0001-00190>

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2004

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werks darf in irgendeiner Form ohne schriftliche Genehmigung des Verlags reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	III
1 Einleitung	1
1.1 Hyperpolarisationsaktivierte und zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle	1
1.2 Strukturelle Eigenschaften von HCN-Kanälen	4
1.3 Die physiologische Bedeutung von HCN-Kanälen	6
1.4 Zielsetzung	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Elektrophysiologie	11
2.1.1 Lösungen	11
2.1.2 Geräte und Programme	11
2.1.3 Die <i>patch-clamp</i> -Technik	12
2.1.3.1 Messprinzip des <i>patch-clamp</i> -Verstärkers	13
2.1.3.2 Spannungs- und Stromkonventionen	14
2.1.3.3 Praktische Aspekte des Messens	14
2.1.4 Messplatz und Messungen	17
2.1.4.1 Durchführung der Messungen	18
2.2 Markov-Modelle	20
2.2.1 Gleichgewicht und Kinetik am Modell C=O	20
2.2.2 Spannungsabhängigkeit und <i>gating</i> -Ladung	20
2.2.3 Verallgemeinerungen	24
2.2.4 Ein Modell für HCN-Kanäle	25
2.2.5 Bestimmung der Offenwahrscheinlichkeit	28
2.3 Auswertung der Stromspuren	30
2.3.1 Spannungsabhängigkeit der Aktivierung	31
2.3.2 Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik	33
2.4 Zellkultur	37
2.4.1 Lösungen für die HEK293-Kultur und die Transfektion	37
2.4.2 Kulturbedingungen für HEK293-Zellen	37
2.4.3 Transfektion von HEK293-Zellen	38
3 Resultate	39
3.1 Einfluss des extrazellulären pH-Wertes auf HCN1	39
3.1.1 Spannungsabhängigkeit der Aktivierung	40
3.1.2 Aktivierungskinetik	43
3.1.3 Deaktivierungskinetik	48
3.1.4 Reversibilität	48
3.1.5 Amplituden	51
3.1.6 Abschätzung des pK_s der protonierbaren Gruppen	52
3.2 Einfluss von Protonen auf HCN1-Mutanten	55
3.2.1 HCN1-E158Q	59
3.2.2 HCN1-QNQ (E229Q/ D233N/ E235Q)	63
3.2.3 Nicht-funktionelle Mutanten	67
3.2.4 Rettungsmutanten	68

3.2.4.1	D172N + R259Q	68
3.2.4.2	D222N + R259Q	72
3.3	Einführung einer negativen Ladung in S2	74
3.3.1	HCN1-N168D	75
3.3.2	HCN1-N168E	81
3.3.3	Vergleich zwischen HCN1 und den Mutanten HCN1-N168D und HCN1-N168E	87
4	Diskussion	92
5	Zusammenfassung	
6	Abstract.....	
7	Literatur	

Abkürzungen

°C	Temperatur in Grad Celsius
8-Br-cGMP	8-Bromo-guanosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
A	Ampere
BES	N,N-bis(2-Hydroxyethyl)-2-Aminomethansulfonsäure
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
cAMP	Adenosin-3',5'-zyklisches Monophosphat (<i>adenosine 3',5'-cyclic monophosphate</i>)
cGMP	Guanosin-3',5'-zyklisches Monophosphat (<i>guanosine 3',5'-cyclic monophosphate</i>)
C _M	Kapazität der Zellmembran
CNG-Kanal	Zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal (<i>cyclic nucleotide-gated channel</i>)
cNMP	zyklisches Nukleotid-Monophosphat (<i>cyclic nucleotide monophosphate</i>)
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAG-Kanal	“ <i>ether-à-gogo</i> ” Kanal
EC ₅₀	apparente Aktivierungskonstante
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGTA	[Ethylen-bis-(Oxyethylen-Nitrilo)]-Tetraessigsäure
ES2	Extrazelluläre Lösung 2
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
g	Gramm, bzw. Normal-Fallbeschleunigung, bzw. Einzelkanal-Leitwert
GDP (bzw. GTP)	Guanosin-Diphosphat (bzw. Guanosin-Triphosphat)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
h	Stunde(n)
HCN-Kanal	Hyperpolarisationsaktivierter und zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal (<i>hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channel</i>)
HEK293	Zellen der menschlichen embryonalen Nierenzelllinie 293 (<i>human embryonic kidney</i>)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure

I	Stromstärke
KAT1-Kanal	Kalium-Kanal aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
K _v -Kanal	Spannungsabhängiger Kalium-Kanal
l	Liter
M	Mol pro Liter
m	Meter
MEM	Minimalmedium (<i>minimal essential medium</i>)
min	Minute(n)
MOPS	3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure
N	Anzahl der Kanäle
N-Terminus	Amino-Terminus
osm	Osmol
p.A.	pro analysi
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung (in Mol pro Liter)
pK _s	Negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante von Protonen
PLL	Poly-L-Lysin
r	Hill-Koeffizient
R _f	Rückkopplungswiderstand (<i>feedback</i>)
RT	Raumtemperatur
R _Z	Zugangswiderstand
s	Sekunde
S	Siemens
T	Absolute Temperatur in Kelvin
Tris	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-1,3-Propanediol
U	Innere Energie
ü.N.	über Nacht
V	Volt
V _{1/2}	Halbmaximale Aktivierungsspannung
V _{cnd}	Kommandospannung
V _H	Haltespannung
V _M	Membranspannung

Vol	Volumen
V_T	Testspannung
V_U	Umkehrpotential
V_V	Vorpulsspannung
W	Watt
wt	Wildtyp
$z \cdot q_e$	Apparente <i>gating</i> -Ladung des gesamten Aktivierungsprozesses
$z_{\alpha} \cdot q_e$	Apparente <i>gating</i> -Ladung des Aktivierungsschrittes der zur Rate α gehört
τ	Zeitkonstante
Ω	Ohm
ΔW	Energiedifferenz
α (α_0)	Aktivierungsratenkonstante (bei 0 mV)
β (β_0)	Deaktivierungsratenkonstante (bei 0 mV)
γ	Einzelkanalleitwert

Die Aminosäuren sind nach dem Einbuchstabenkode abgekürzt (A: Alanin, C: Cystein, D: Asparaginsäure, E: Glutaminsäure, F: Phenylalanin, G: Glycin, H: Histidin, I: Isoleucin, K: Lysin, L: Leucin, M: Methionin, N: Asparagin, P: Prolin, Q: Glutamin, R: Arginin, S: Serin, T: Threonin, V: Valin, W: Tryptophan, Y: Tyrosin).

1 Einleitung

Ionenkanäle kontrollieren den Fluss von Ionen über die Zellmembran. Sie sind integrale Membranproteine und bilden in der hydrophoben Lipidschicht mikroskopisch kleine Poren, 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^+ -, Ca^{2+} - und Cl^- - 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 Ca^{2+} -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. Dadurch wird das Membranpotential vorübergehend negativer als das Ruhepotential der Zelle. Man spricht von einer "Hyperpolarisation".

1.1 Hyperpolarisationsaktivierte und zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle

Ströme durch 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 und DiFrancesco, 1980; Yanagihara und Irisawa, 1980) und in Photorezeptoren (Fain et al., 1978; Bader et al., 1979;

Attwell und Wilson, 1980; Bader et al., 1982) beschrieben. HCN-Kanäle können in Nervenzellen, sensorischen Zellen, Muskelzellen, aber auch in einigen nicht erregbaren Zellen nachgewiesen werden (Übersicht: DiFrancesco, 1993; Pape, 1996; Gauss und Seifert, 2000; Kaupp und Seifert, 2001; Robinson und Siegelbaum, 2003).

HCN-Kanäle 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. *Spannungsabhängigkeit der Aktivierung.* Im Gegensatz zu den meisten anderen 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.

2. *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 und Korenbrot, 1990; Wollmuth und Hille, 1992; Solomon und 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. Funktionell gehören sie damit zu den einwärtsgleichrichtenden Kanälen.

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

4. *Änderung des Öffnungsverhaltens durch zyklische Nukleotide.* Das spannungsabhängige Öffnen der HCN-Kanäle verändert sich, wenn cAMP oder cGMP an das Kanalprotein gebunden sind. Eine Erhöhung der cAMP-Konzentration verschiebt beispielsweise in

isolierten Schrittmacherzellen des Kaninchenherzens die Aktivierungskurve um ca. 10 mV zu positiveren Spannungen (DiFrancesco und Tortora, 1991). Dadurch öffnen die HCN-Kanäle bereits bei weniger negativen Membranpotentialen. Außerdem wird der Aktivierungsprozess in Gegenwart von sättigenden cAMP-Konzentrationen deutlich schneller.

5. Änderung des Öffnungsverhaltens durch Protonen: Protonen können HCN-Kanäle auf verschiedene Weise beeinflussen, je nachdem auf welcher Seite der Membran sie wirken. Eine erhöhte intrazelluläre Protonenkonzentration verschiebt die Aktivierung der HCN-Kanäle zu negativeren Spannungen. Außerdem wird die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung größer. Der Effekt wird durch die Bindung von Protonen an ein Histidin auf der intrazellulären Seite des Transmembransegmentes S4 vermittelt. Der apparente pK_S -Wert liegt bei 7,6 (Zong et al., 2001).

Wird die extrazelluläre Protonenkonzentration erhöht, treten entgegengesetzte Veränderungen auf. Die Aktivierung wird zu positiveren Spannungen hin verschoben, ihre Spannungsabhängigkeit nimmt ab. Außerdem aktivieren die HCN-Kanäle deutlich schneller. Der apparente pK_S -Wert ist kleiner als 6,0 (Stevens et al., 2001). Die Bindestelle für extrazelluläre Protonen ist nicht bekannt. Die Veränderung des Öffnungsverhaltens spielt in Geschmackszellen eine Rolle. Ein Teil von Geschmackszellen exprimiert HCN-Kanäle. Die Kanäle tragen zur elektrischen Antwort der Zelle auf saure Reize bei.

Es gibt einige Hinweise darauf, dass die Aktivität der HCN-Kanäle auch durch andere Mechanismen moduliert wird. Dazu zählen die Phosphorylierung des Kanalproteins, sowie die Wechselwirkungen mit Ca^{2+} -Ionen oder mit 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 Wirbellosen und Wirbeltieren zu klonieren. Während in den Wirbellosen *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 den bisher untersuchten Säugetieren 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 und Seifert 2001). In einer Fischart, *Oncorhynchus mykiss*, konnten Homologe zu dreien dieser vier Gene gefunden werden (Cho et al., 2003). Die vier 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 Komplex mit charakteristischen elektrophysiologischen Eigenschaften zu bilden.

1.2 Strukturelle Eigenschaften von HCN-Kanälen

Die HCN-Kanäle sind sowohl mit den spannungsabhängigen K^+ -Kanälen aus den "Shaker"- und „EAG“-Familien, als auch mit den zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen (*cyclic nucleotide-gated channels*; CNG-Kanäle) phylogenetisch verwandt. Abbildung 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 und Jan, 1992; Pongs, 1992) und der CNG-Kanäle (Henn et al., 1995) anlehnt. Eine HCN-Untereinheit weist vermutlich sechs Transmembransegmente (S1-S6) auf. Der N- und der C-Terminus liegen intrazellulär. Der Spannungssensor besteht mindestens aus den Segmenten S2, S3 und S4. Die Porendomäne setzt sich aus S5 und S6 zusammen. Zwischen diesen beiden Segmenten befindet sich die porenbildende Region, die maßgeblich die Selektivitäts- und Leitfähigkeitseigenschaften der Ionenkanäle bestimmt (MacKinnon und Yellen, 1990; Yellen et al., 1991; Yool und Schwarz, 1991; Backx et al., 1992; Eismann et al., 1994; MacKinnon, 1995).

Den eigentlichen Spannungsfühler bilden acht bis neun positiv geladene Aminosäuren im Transmembransegment S4 (Männikkö et al., 2002; Bell et al., 2004). Dieses Motiv ist von den spannungsabhängigen Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Kanälen bekannt (Übersicht: Stühmer, 1991; Jan und Jan, 1992; Pongs, 1992). Einige der Aminosäuren in S4 stehen bei positiven Spannungen in Kontakt mit dem extrazellulären Medium, bei negativen Spannungen aber in Kontakt mit dem intrazellulären Medium. Die Konformation des Kanals ist in der Umgebung von S4 spannungsabhängig (Männikkö et al., 2002; Bell et al., 2004; Vemana et al., 2004). Bei verwandten Kanälen der „Shaker“ und „EAG“-Familien kommt es während der Konformationsänderungen zu Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Aminosäuren in S4 und negativ geladenen Aminosäuren in S2 und S3 (Silvermann et al., 2003). In HCN-Kanälen befinden sich negativ geladene Aminosäuren an homologen Positionen in S2 und S3. Vermutlich wird die Konformation des Spannungssensors durch Salzbrücken stabilisiert. Die

Kristallstruktur eines spannungsabhängigen Kanals aus dem Bakterium *Aeropyrum pernix* zeigt Salzbrücken zwischen entsprechenden Aminosäuren in S2 und S4 (Jiang et al. 2003).

Es ist nicht bekannt, welcher Mechanismus die Konformationsänderung des Spannungssensors auf die Porenregion überträgt. Erste Experimente lassen vermuten, dass die intrazelluläre Verbindung zwischen S4 und S5 den Spannungssensor mit der Pore koppelt (Chen et al., 2001).

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).

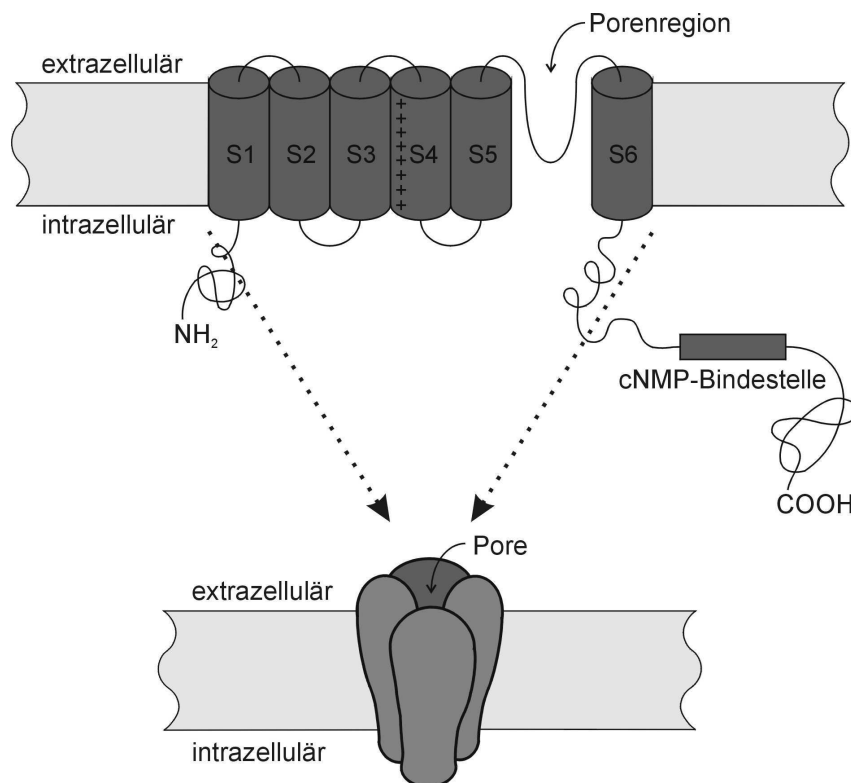


Abbildung 1-1: Modell der transmembranalen Topologie der HCN-Kanäle. Im oberen Teil ist die transmembranale Topologie einer Untereinheit des HCN-Kanals mit den sechs transmembranalen Segmenten (S1-S6), der porenbildenden Region (Porenregion) und der Bindestelle für zyklische Nukleotide (cNMP-Bindestelle) 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 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.

Vermutlich lagern sich wie bei den K^+ -Kanälen (MacKinnon, 1991) und den CNG-Kanälen (Kaupp, 1995; Liu et al., 1996) auch bei den HCN-Kanälen vier Untereinheiten zu einem funktionellen Kanal zusammen. Es wurde gezeigt, dass solche Kanalkomplexe aus verschiedenen Untereinheiten bestehen können. In verschiedenen heterologen Expressionssystemen bilden Untereinheiten von HCN1 und HCN2 sowie von HCN2 und HCN4 funktionelle Kanäle. Erste Experimente deuten darauf hin, dass auch im Hirn Kanalkomplexe aus HCN1- und HCN2-Untereinheiten existieren (Much et al., 2003).

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 selbständig 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):

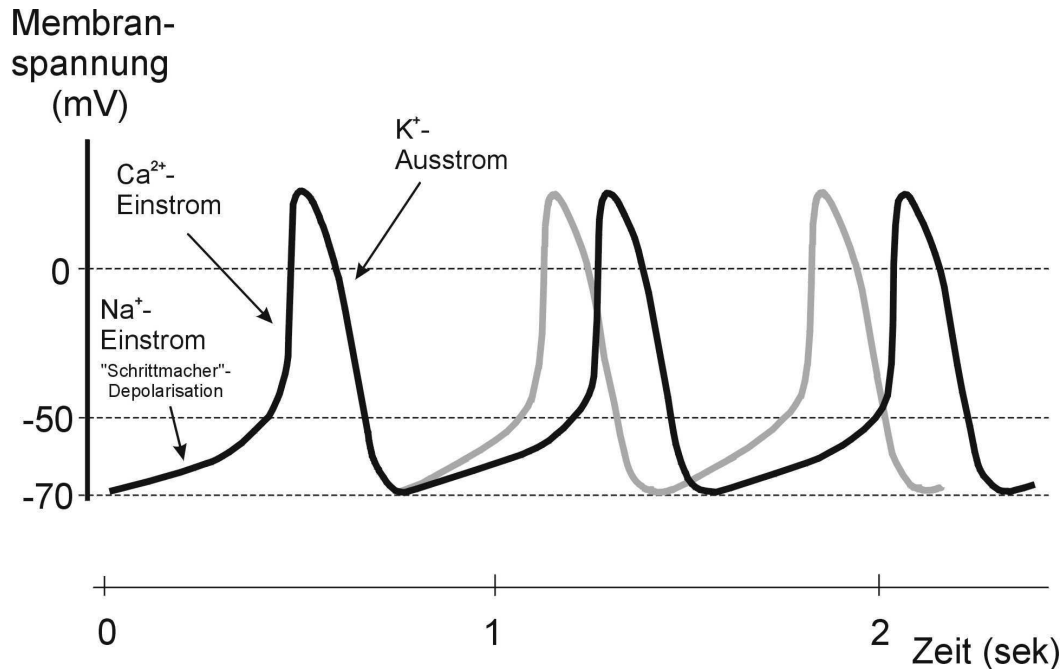


Abbildung 1-2: Erzeugung von rhythmischen Aktionspotentialen in Schrittmacherzellen des Herzens. Dargestellt ist die zeitliche Änderung des Membranpotentials bei spontaner Aktivität in Schrittmacherzellen des Herzens. Drei unterschiedliche Ionenströme sind an der Entstehung der Aktionspotentiale (schwarze Kurve) beteiligt. Die Ausschüttung von Adrenalin durch postganglionäre Neuronen des Sympathikus bewirkt eine Beschleunigung 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 Ca^{2+} -Kanäle des T-Typs aktiviert. Diese leiten dann einen transienten Ca^{2+} -Einstrom, der die Membran weiter depolarisiert. Bei einem Membranpotential von etwa -30 mV werden Ca^{2+} -Kanäle des L-Typs aktiviert, die dann ein Ca^{2+} -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 wird 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 Verlangsamung 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.

HCN-Kanäle in zentralen Neuronen:

Auch in zahlreichen Regionen des Gehirns erfüllen HCN-Kanäle die Funktion von Schrittmacher-Kanälen. Ein besonders gut untersuchtes Beispiel sind dabei bestimmte Neuronen im Thalamus, die für die Regulation des Schlaf-Wachrhythmus von entscheidender Bedeutung sind (Pape und McCormick, 1989; McCormick und Bal, 1997; Lüthi und McCormick, 1999). HCN-Kanäle beeinflussen dabei nicht nur die Rhythmogenese in einzelnen Zellen, sondern auch die Aktivitätsmuster, die sich aus dem Zusammenspiel verschiedener Zelltypen ergeben. Für sensorische Information auf dem Weg zur Großhirnrinde ist der Thalamus eine wichtige Schaltstelle. Hier wird die Weiterleitung reguliert. Während einiger Schlafphasen treten rhythmische Oszillationen der elektrischen Aktivität auf. Sie erstrecken sich auf ein Netzwerk aus thalamischen und kortikalen Zellen. Die physiologische Bedeutung dieser Oszillationen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Vermutlich regulieren sie den Informationsfluss durch den Thalamus. In den ersten Phasen des Schlafes treten sogenannte *spindle waves* auf. Innerhalb von eins bis drei Sekunden wächst zunächst die elektrische Aktivität im Frequenzband zwischen sieben und vierzehn Hertz zunächst, um anschließend wieder auf den Ausgangswert zu sinken. Dieses Anwachsen und Schwinden wiederholt sich alle drei bis zwanzig Sekunden. Dieser Rhythmus entsteht durch eine Rückkopplung durch GABAerge und erregende Nervenzellen, die sich in zwei

unterschiedlichen Regionen des Thalamus befinden. Erregte GABAerge Nervenzellen verursachen Salven von inhibitorischen postsynaptischen Potentialen in den erregenden Zellen. Die transiente Hyperpolarisation ermöglicht die Aktivierung von T-Typ Ca^{2+} -Kanälen. Diese lösen weitere Aktionspotentiale aus, die wiederum die GABAergen Nervenzellen erregen. Diese feuern: die Rückkopplungsschleife ist geschlossen. Der Ca^{2+} -Einstrom durch die T-Type Ca^{2+} -Kanäle erhöht die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Vermutlich wird eine Ca^{2+} -abhängige Adenylatzyklase aktiviert und erhöht die cAMP-Konzentration. Als Folge davon aktivieren HCN-Kanäle schon bei weniger negativen Spannungen. Der Na^+ -Einstrom verschiebt das Ruhepotential zu positiveren Spannungen, wodurch die T-Typ Ca^{2+} -Kanäle inaktiviert werden. Die Rückkopplungsschleife wird unterbrochen. Sie kann erneut beginnen, wenn die cAMP-Konzentration wieder gesunken ist, ein Teil der HCN-Kanäle wieder deaktiviert ist und das Ruhepotential der Zelle die Schwelle erreicht hat, unterhalb dessen T-Typ Ca^{2+} -Kanäle aktiviert werden können. Der Zeitverlauf dieser Prozesse bestimmt die Dauer der Ruhephase zwischen zwei Phasen erhöhter Aktivität (*spindles*). HCN-Kanäle sind also am Abschalten der Oszillationen beteiligt und sind mitbestimmend für die Dauer der Pause zwischen zwei *spindles*.

In späteren Phasen des Schlafes treten andere Oszillationen an die Stelle der *spindle waves*. Es handelt sich um eine Aktivität im Frequenzbereich zwischen 0,5 und 4 Hertz. Diese Rhythmen können auch an isolierten Zellen beobachtet werden. Sie entstehen durch ein Wechselspiel von HCN-Kanäle und T-Type Ca^{2+} -Kanälen.

In vielen Klassen von 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. Wie die Rhythmogenese im Thalamus zeigt, kann die Beteiligung des I_h -Stroms am Ruhepotential einen großen Einfluss auf die Integration synaptischer Signale haben. Beaumont und Zucker (2000) haben Hinweise darauf gefunden, dass präsynaptische I_h -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-aktivierter 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 und Wilson, 1980; Bader et al., 1982), als auch von Zapfen (Attwell et al., 1982; Barnes und Hille, 1989; Maricq und Korenbrot, 1990) nachgewiesen werden.

Das Membranpotential der Photorezeptoren wird negativer, wenn sie durch Licht gereizt werden. Dadurch wird am synaptischen Endglied der Sehzelle weniger Glutamat ausgeschüttet (Überblick: Stryer, 1991; Yau, 1994; Müller und Kaupp, 1998). Ein starker Lichtreiz hyperpolarisiert die Membran so stark, dass 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 Lichtreizes entgegen und sind somit an der Lichtadaptation in Photorezeptoren beteiligt.

1.4 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die molekularen Grundlagen für den Einfluss extrazellulären pH-Wertes auf HCN-Kanäle untersucht. Extrazelluläre Protonen verändern das Öffnungsverhalten sehr stark. Wenn es gelingt, die Mechanismen aufzuklären, welche die Geschwindigkeit und die Spannungsabhängigkeit der Kanalöffnung so deutlich beeinflussen, kann möglicherweise der Öffnungsvorgang selbst besser verstanden werden.

Ziel der Arbeit war es, am Kanal rHCN1 den Sensor für extrazelluläre Protonen zu identifizieren. Weiterhin galt es, den Mechanismus und die Wechselwirkung der Protonen mit dem Kanal zu charakterisieren. Der Austausch einzelner Aminosäuren und die elektrophysiologische Charakterisierung der entsprechenden Kanal-Mutanten sollte klären, welche Aminosäuren an der Bindung von extrazellulären Protonen beteiligt sind. Aus den Aktivierungseigenschaften der Mutanten sollten Schlüsse über den Mechanismus der Wechselwirkung von Protonen und Kanal gezogen werden.

2 Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien wurden in p.A.-Qualität von den Firmen Amersham Bioscience, Invitrogen, Merck, Molecular Probes und Sigma-Aldrich bezogen. Chemikalien und Fertiglösungen für die Zellkultur wurden von der Firma GIBCO/Invitrogen bezogen.

2.1 Elektrophysiologie

2.1.1 Lösungen

Alle Experimente wurden mit den folgenden Medien durchgeführt:

Extrazelluläre Lösung:

ES2

135	mM	NaCl
5	mM	KCl
3	mM	MgCl ₂
2	mM	CaCl ₂
10	mM	HEPES
10	mM	Glucose
4	mM	NaOH
	pH	7,3
292-298	mosm	

Intrazelluläre Lösung:

SIS

100	mM	KCl
10	mM	HEPES
10	mM	EGTA
27	mM	KOH
	pH	7,4
215-217	mosm	

Extrazelluläre Lösungen mit pH-Werten kleiner als pH 7,3 wurden hergestellt, indem ES2 mit HCl titriert wurde. Die Konzentration der permeierenden Ionen K⁺ und Na⁺ blieb dabei praktisch konstant. Die Lösung mit pH 8,1 wurde aus ES2 hergestellt, indem 0,4 Vol% 10 M NaOH zugegeben wurde. Die Konzentration von K⁺ änderte sich wiederum nur minimal, die Konzentration von Na⁺ stieg von 139 auf 143 mM.

2.1.2 Geräte und Programme

Geräte:

Schwingungsgedämpfter Tisch (Newport Corporation, Irvine, Ca, USA)

Mikroskoptisch Gibraltar (Burleigh, Victor, NY, USA)

Aufrechtes Mikroskop Nikon Eclipse E600FN (Nikon, Düsseldorf)

Optische Filter und Spiegel (Chroma, Rockingham, VT, USA)

Quecksilberdampf Lampe (100W, Nikon)

Elektro-mechanischer Mikromanipulator SM 1 (Luigs und Neumann, Ratingen)

Mechanischer Mikromanipulator (Narishige International, London, Großbritannien)

patch-clamp-Verstärker L/M EPC-7 (List-electronic, Darmstadt)

A/D-D/A-Wandler Digidata 1200 (Axon Instruments, Union City, CA, USA)

IBM-compatibler PC P3-900 MHz

Schwinganker-Saugpumpe SP 203S (Rockingham, VT, USA)

Programme:

Softwarepaket für Elektrophysiologie pClamp 8.0 (Axon Instruments, Union City, CA, USA)

IGOR Pro 4.09A (Wavemetrics Inc., Lake Oswego, OR, USA)

2.1.3 Die *patch-clamp*-Technik

Alle Experimente wurden mit der *patch-clamp*-Technik durchgeführt (Membranflecken-Klemme) (Hamill et al., 1981). Die Technik wurde erstmals von Neher und Sakmann (1976) beschrieben. Entworfen wurde sie ursprünglich für die Messung von Strömen durch einzelne Ionenkanäle – diese betragen teilweise weniger als 1 pA. Dazu wird ein Flecken (*patch*) der Membran durch engen Kontakt mit der Pipette elektrisch vom extrazellulären Medium isoliert (siehe Abbildung 2-1 A). Für die Messung der sehr kleinen Ströme ist es nötig, das Grundrauschen zu reduzieren. Es entsteht durch Schwankungen des Leckstromes, der vor allem durch den Spalt zwischen Pipette und Zellmembran fließt. Einen wesentlichen Beitrag zu den Schwankungen liefert das thermische Rauschen. Seine Varianz ist umgekehrt proportional zum Widerstand, über den der Strom fließt. Die Oberfläche sauberer Glaspipetten und die Zellmembran wechselwirken über Wasserstoffbrücken, Salzbrücken und Van der Waals-Kräfte (Corey und Stevens, 1983; Ophasi und Webb, 1994). Die Oberflächen nähern sich dadurch bis auf etwa 1 nm (Corey und Stevens, 1983). Dabei steigt der Widerstand, über den der Leckstrom fließt, auf mehrere Gigaohm. Das Rauschen ist dann so gering, dass der Strom durch einzelne Ionenkanäle aufgelöst werden kann.

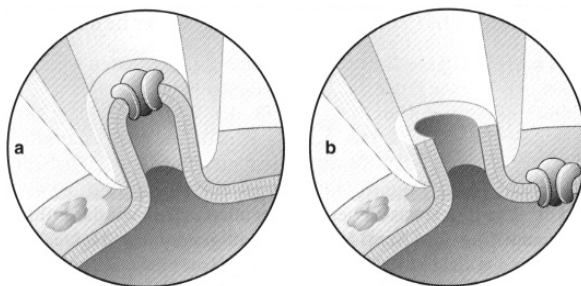


Abbildung 2-1: Schematische Zeichnung von *patch-clamp*-Konfigurationen (aus: Numberger und Draguhn, 1996). (A) Der Strom durch die Ionenkanäle eines Fleckens der intakten Zellmembran kann gemessen werden (*on-cell*). (B) In der Ganzzell-Konfiguration kann der Strom durch die gesamte Zellmembran gemessen werden (*whole-cell*).

Die Ganzzell-Konfiguration

In dieser Arbeit wurde eine Variante der *patch-clamp*-Technik verwendet, die Ganzzell-Konfiguration. Sie erlaubt es Ströme über die gesamte Zellmembran zu messen. Dazu wird der Membranfleck innerhalb der Pipettenspitze durch Unterdruck oder durch einen 5 ms langen Spannungspuls beschädigt, ohne dabei den engen Kontakt zwischen Pipette und Membran zu zerstören. Es entsteht eine Verbindung zwischen dem Inneren der Pipette und dem Zytosol (siehe Abbildung 2-1 B). Man nimmt an, dass die Lösung im Inneren einer Zelle nach relativ kurzer Zeit mit der Pipettenlösung ausgetauscht wurde. Der Zugangswiderstand R_z zwischen Pipette und Zellinnerem beträgt noch etwa 6 bis 20 M Ω . In der Ganzzellkonfiguration kann der Leckstrom stark variieren, selbst wenn der eigentliche Glas-Membrankontakt noch intakt ist. Ein Grund hierfür sind bestimmte Leitfähigkeiten der Zelle, die sich bei verschiedenen Zellen zum Teil stark unterscheiden. So kann der Widerstand, über den der Leckstrom fließt, nach wie vor größer als 1 G Ω sein. Stromableitungen sind auch möglich, wenn er nur einige hundert Megaohm beträgt. Wichtig ist, dass sein Wert über mehrere Minuten stabil ist. Die Aktivierung der Ionenkanäle, die man untersuchen will, muss den Widerstand der Zellmembran auf einen Bruchteil des Ausgangswertes senken, um ein akzeptables Signal-zu-Rauschverhältnis zu haben. Ein Beispiel dafür zeigt Abbildung 3-15 C in Kapitel 3.2.1. Hier beträgt der Widerstand der Ganzzell-Konfiguration bei geschlossenen Kanälen (bei -30 mV) etwa 300 M Ω . Bei -100 mV fließt ein Strom von -1 nA. Das entspricht einem Widerstand von 0,1 M Ω , 3000fach weniger als mit geschlossenen Kanälen.

2.1.3.1 Messprinzip des *patch-clamp*-Verstärkers.

Die Referenzelektrode in der extrazellulären Lösung und die Messelektrode in der Pipette sind mit den Eingängen des Vorverstärkers verbunden (siehe Abbildung 2-2). Die Spannung zwischen den Elektroden wird an einem Operationsverstärker ständig mit der Kommandospannung V_{cmd} verglichen. Besteht eine Differenz, so wird per Rückkopplung durch den Widerstand R_f ein Strom in die Pipette injiziert, der diese Differenz verringert. Durch das sehr schnelle Ansprechen des Operationsverstärkers werden Änderungen der Pipettenspannung während eines Experimentes innerhalb weniger μ s ausgeglichen. Deutlich mehr Zeit wird benötigt, während einer Ganzzell-Messung die Spannung über der Zellmembran zu ändern (siehe „Zugangswiderstand“ im Kapitel 2.1.3.3).

Durch die Eingänge eines Operationsverstärkers fließt kein Strom. Der gesamte Strom I , der zwischen Pipette und Referenzelektrode fließt, wird also über den Widerstand R_f in die Pipette injiziert. Dabei fällt eine Spannung $V = R_f \cdot I$ ab. Sie wird an einem weiteren

Operationsverstärker stromfrei gemessen. Der Widerstand R_f ist bekannt und damit auch $I = V_{cmd}/R_f$. Beim EPC-7 beträgt R_f 500 M Ω .

Der Rückkopplungsprozess findet im Vorverstärker statt, die Spannung $V = R_f I$ wird im Hauptverstärker bestimmt. Hier wird das Signal auch weiter verstärkt und über einen Tiefpass gefiltert (3 kHz 3-pole Bessel-Filter). Im A/D-Wandler wird das Signal mit einer Abtastfrequenz von 5 bis 10 kHz digitalisiert.

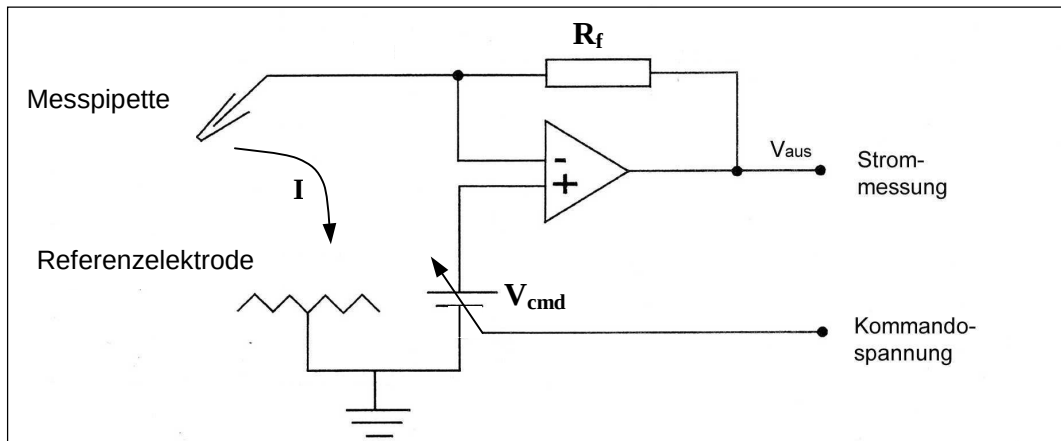


Abbildung 2-2: Aufbau des *patch-clamp*-Vorverstärkers

2.1.3.2 Spannungs- und Stromkonventionen

Der Referenzelektrode wird das Potential 0 mV zugeschrieben. Spannungen werden relativ zur Referenzelektrode angegeben. Positive Spannungen bedeuten, dass das Zellinnere gegenüber dem Bad positiv geladen ist. Bei negativen Spannungen ist das Zellinnere gegenüber dem Bad negativ geladen. Kationen, die die Membran von innen nach außen überqueren, erzeugen positive Ströme (Auswärtsströme), Kationen, die die Membran von außen nach innen überqueren, erzeugen negative Ströme (Einwärtsströme).

2.1.3.3 Praktische Aspekte des Messens

Der Zugangswiderstand

In Abbildung 2-3 werden die elektrischen Verhältnisse beim *patch-clamp*-Experiment in einem Ersatzschaltbild verdeutlicht. Zwischen Pipettenelektrode und Zytosol besteht ein Zugangswiderstand R_Z . Die Zellmembran hat eine Kapazität C_M und einen Widerstand R_M . Die Elektronik des Verstärkers sorgt dafür, dass die Spannung zwischen Pipette und Referenzelektrode der Kommandospannung V_{cmd} entspricht, indem sie einen Strom I injiziert. Die Spannung V_{cmd} fällt zum Teil an R_M und zum Teil an R_Z ab. Es gilt $V_M = V_{cmd} - I \cdot R_Z$. Die Membranspannung weicht also von der Kommandospannung ab. Und zwar um so mehr, je größer der Strom I und der Zugangswiderstand R_Z sind.

Die Größe des Zugangswiderstand R_Z ist auch entscheidend dafür, wie schnell die Membranspannung V_M geändert werden kann. Ändert man die Kommandospannung sprunghaft, ändert sich V_M exponentiell (siehe Abbildung 2-3). Die entsprechende Zeitkonstante wächst mit wachsendem R_Z : $\tau = C_M \cdot R_Z \cdot R_M / (R_Z + R_M)$. Wenn keine Ionenkanäle aktiviert sind, ist der Membranwiderstand wesentlich größer, als der Zugangswiderstand. In diesem Fall gilt $\tau \approx C_M \cdot R_Z$.

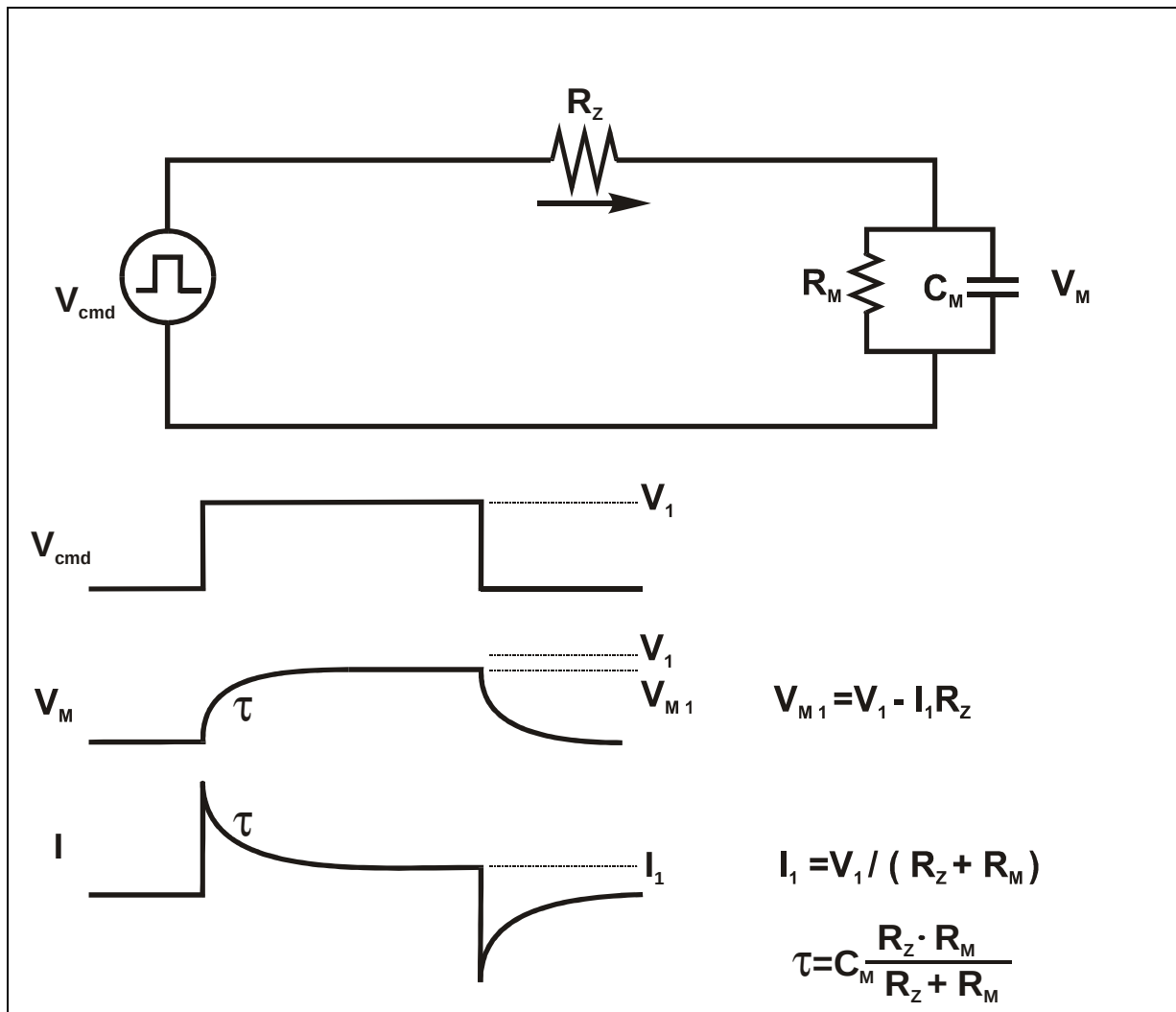


Abbildung 2-3: Spannungsfehler und Verzögerung der Spannungsklemme durch R_Z (nach „The Axon Guide“, Axon Instruments). Ersatzschaltbild einer *patch-clamp*-Messanordnung. Der Zugangswiderstand R_Z und die Membran (R_M und C_M) sind in Reihe geschaltet. Der Verstärker stellt sicher, dass der gesamte Spannungsabfall der Kommandospannung V_{cmd} entspricht. Bei einer konstanten Spannung V fließt ein konstanter Strom I . Springt V_{cmd} auf einen neuen Wert V_1 , stellen sich die neuen Werte der Membranspannung V_{M1} und des Stromes I_1 mit einem einfach exponentiellen Zeitverlauf ein. Die Zeitkonstante beträgt $\tau = C_M \cdot R_Z \cdot R_M / (R_Z + R_M)$.

Bei großem R_Z stellt sich die Membranspannung V_M nach einem Sprung der Kommandospannung weniger genau und langsamer ein. Beide Effekte können über die Serienwiderstandskompensation des *patch-clamp*-Verstärkers teilweise ausgeglichen werden. In der Regel

wurde eine Kompensation k von 0,5 – 0,6 erreicht. Bei höheren Werten begann das Rückkopplungssystem oft zu schwingen. Unter diesen Bedingungen ist die angelegte Spannung völlig undefiniert. Diese Situation führt oft zur Beschädigung der Zelle. Bei Werten für k von 0,5 bis 0,6 ist die verbleibende Spannungsdifferenz zwischen Kommando- und Membranspannung normalerweise kleiner als 10 mV. In einzelnen Fällen wuchs der Zugangswiderstand bei sauren extrazellulären Lösungen auf bis zu 40 MΩ. In einem Fall kam es dadurch zu einem Spannungsfehler von 30 mV.

Der Widerstand R_Z wurde während eines jeden Experimentes mehrere Male bestimmt. Bei der Analyse der Stromableitungen wurde die tatsächliche Membranspannung berechnet:

$$V_M = V_{cmd} - (1-k) \cdot I \cdot R_Z \quad \text{Gleichung 1}$$

Alle angegebenen Spannungen wurden so korrigiert. Aus diesem Grunde wird der Index „M“ nicht weiter benutzt. Spannungen V stehen im weiteren für die Membranspannung. Bei der Darstellung von Spannungsprotokollen wird allerdings immer die Kommandospannung angegeben.

Kontaktpotentiale

Überall, wo sich unterschiedliche elektrische Leitermaterialien berühren, entstehen Kontaktpotentiale. Sie verursachen zum Beispiel das unangenehme Gefühl, das Träger von Amalgamfüllungen beim Ablecken eines Aluminiumlöffels verspüren. Beim *patch-clamp*-Experiment berühren sich unterschiedliche Leitermaterialien an verschiedenen Stellen des Aufbaus. So zum Beispiel am Kontakt der Elektroden mit den Lösungen, aber auch an der Pipettenspitze, wo die Lösungen SIS und ES2 in Kontakt kommen. Es entsteht eine Potentialdifferenz, die, wie alle anderen Kontaktpotentiale, vor der Messung kompensiert wird. Bevor die Pipette die Zelle berührt, wird die Spannung V auf 0 mV abgeglichen. Ist der hochohmige Membran-Glaskontakt aber hergestellt, so stehen Bad- und Pipettenlösung nicht mehr miteinander in Kontakt. Sie sind durch die Zellmembran getrennt. Das vormals kompensierte Kontaktpotential existiert nicht mehr. Dadurch entsteht eine Differenz ΔV zwischen der tatsächlichen Spannung und der gemessenen Spannung zwischen Referenz- und Messelektrode. Die Größe der Differenz hängt von der Zusammensetzung der Lösungen ab. Sie kann berechnet werden. Für die Lösungen ES2 und SIS ergibt sich $\Delta V = -7,8$ mV. Durch das Titrieren der Lösungen mit HCl ändert sich die Differenz nur wenig. Für die sauerste Lösung (pH 4,0) beträgt sie $-8,1$ mV. Wenn der Einfluss des Zugangswiderstandes berücksichtigt wird (siehe letzter Abschnitt), ist die wahre Membranspannung stets etwa

8 mV negativer als die gemessene Spannung. Dieser Unterschied wurde bei den angegebenen Spannungen nicht berücksichtigt.

2.1.4 Messplatz und Messungen

Abbildung 2-4 stellt den Messstand und die elektrische Verschaltung der einzelnen Komponenten schematisch dar. Die Komponenten sind in der Abbildung nummeriert und entsprechen im Text den Ziffern in eckigen Klammern. Die meisten Komponenten sind auf dem Mikroskoptisch befestigt [1] (Burleigh, Victor, NY, USA). In der Mitte der oberen Platte befindet sich eine Plexiglasscheibe mit einer runden Aussparung, der Messkammer. Ihr Durchmesser betrug 1,8 cm. Als Boden wurde ein Deckgläschen mit Fixogum eingeklebt. In die Messkammer ragen die Ag/AgCl-Referenzelektrode [2] (World Precision Instruments, Berlin), der kontinuierliche Zufluss [3] (0,3 ml/min), die Perfusionspipette [4] (Öffnung ca. 0,6 mm, Durchfluss 0,8 – 1 ml/min), ein Abfluss [5] und die Messpipette [6].

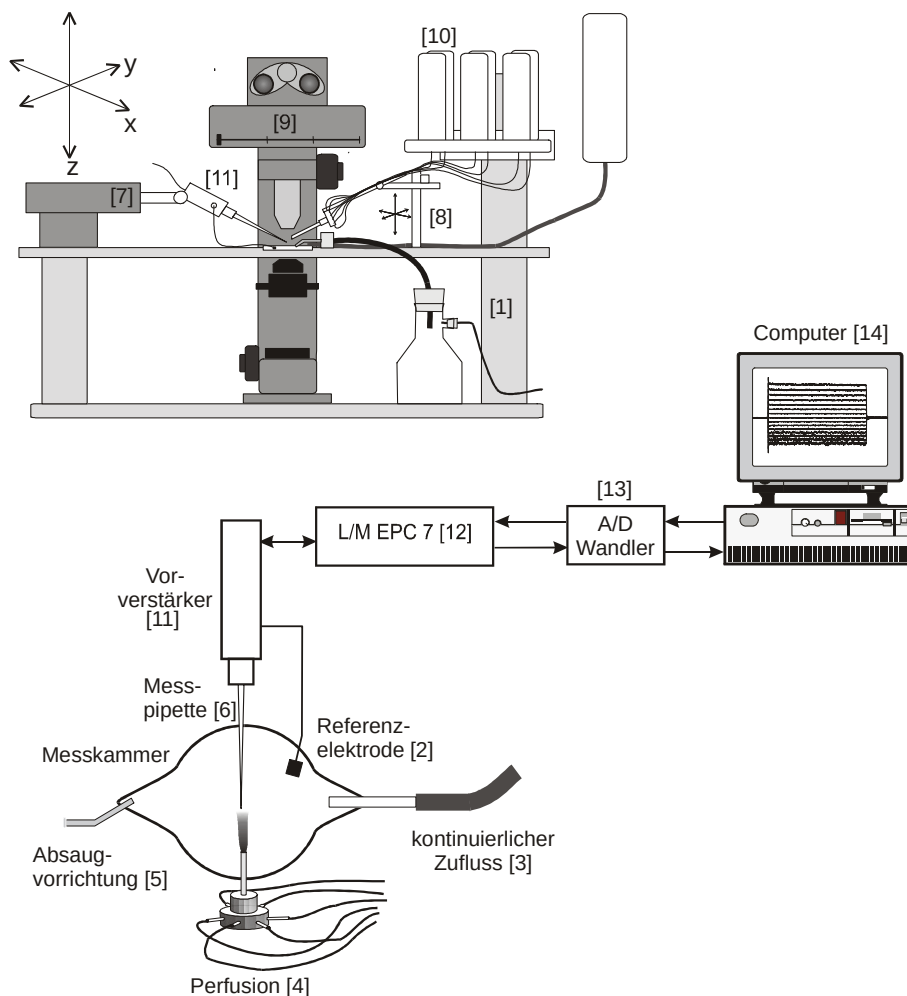


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung des *patch-clamp*-Messplatzes und die Verschaltung seiner Komponenten. Erläuterungen im Text.

Die Messpipette wurde mit einem elektromechanischen Manipulator [7] (Luigs und Neumann, Ratingen) positioniert, die Perfusionspipette mit einem mechanischen Manipulator [8] (Narishige International, London, Großbritannien). Die Position der Pipettenspitzen und die Zellen in der Kammer wurden durch das aufrechte Mikroskop [9] (Nikon, Düsseldorf) beobachtet. Um die Zelle mit verschiedenen Messlösungen zu umspülen, wurde ein Perfusionssystem eingesetzt. Von sechs Vorratsgefäßen führte je ein Silikonschlauch zu einer Perfusionsmischbatterie, die als Ausgang eine einzelne Perfusionspipette besaß. Jedes Vorratsgefäß war mit einem separaten Hahn ausgestattet, mit dem der Zulauf der jeweiligen Lösung manuell geöffnet oder geschlossen werden konnte. Der Flüssigkeitsspiegel in der Messkammer wurde durch eine Absaugvorrichtung [5] konstant gehalten. In die Pipettenlösung tauchte ein chlorierter Silberdraht ein, der mit dem Vorverstärker [11] verbunden war. Er diente als Messelektrode. Über die Pipettenhalterung am Vorverstärker konnte ein Über- oder Unterdruck im Inneren der Glaspipette angelegt werden. Die Druckdifferenzen wurden durch eine kleine Spritze (1 ml) oder mit dem Mund erzeugt. Der Vorverstärker ist mit dem Hauptverstärker (L/M-EPC 7, List-electronic, Darmstadt) verbunden [12]. Von dort wurde das Signal zu einem A/D-Wandler (Digidata 1200, Axon Instruments) [13] übertragen und nach dem Digitalisieren direkt auf der Festplatte eines Personalcomputers [14] gespeichert. Das Programm PCLAMP (Version 8.1, Axon Instruments) wurde zur Datenaufnahme und Auswertung verwendet. Alle elektrischen Geräte, die mit Wechselspannung betrieben wurden, befanden sich außerhalb des Faradayschen Käfigs. Zur Anregung von GFP wurde Licht einer Quecksilberdampf Lampe (100 W, Nikon) über einen Epifluoreszenz-Eingang in die Mikroskopoptik eingekoppelt. Das Fluoreszenzlicht konnte im Okular beobachtet werden. Dazu wurde ein Filtersatz aus einem Anregungsfilter ($HQ\ 480 \pm 20\text{ nm}$), einem dichroischen Spiegel (Q505 LP) und einem Emissionsfilter ($HQ\ 535 \pm 25\text{ nm}$) benutzt. Die optischen Elemente wurden von Chroma (Rockingham, VT, USA) bezogen.

2.1.4.1 Durchführung der Messungen

Für die Messung wurden Glaspipetten aus filamentierten Borosilikatglaskapillaren (Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 0,87 mm; Hilgenberg) verwendet. Die Pipetten wurden nach dem Ziehen (DMZ Universal-Puller, Zeitz-Instrumente) feuerpoliert. Wenn sie mit SIS gefüllt waren und in ES2 eintauchten, betrug ihr Widerstand 3 - 7 M Ω . Erfolgreich transfizierte Zellen wurden durch ihre GFP-Fluoreszenz identifiziert. Die Öffnung der Perfusionspipette wurde knapp einen Millimeter vor einer Zelle positioniert. Um zu

überprüfen, ob die Perfusion funktioniert, ließ ich ES2 ausströmen und beobachtete die Verschiebung von Zelltrümmern auf dem Boden der Messkammer. Vor dem Eintauchen der *patch-clamp*-Pipette wurde der Druck im Inneren leicht erhöht. Der Überdruck verhinderte, dass die Pipettenspitze im Bad verstopfte. Spannungsdifferenzen zwischen Mess- und Referenzelektrode wurden vor dem Zellkontakt abgeglichen. Nachdem die Glaspipette auf die Zellen aufgesetzt worden war, wurde der Druck ausgeglichen. Anschließend wurde etwas Luft angesaugt, um einen leichten Unterdruck herzustellen. Um zu verfolgen, wie sich der enge Kontakt zwischen der Membran und dem Glas bildet, wurde ein Rechteck-Testpuls von + 5 mV gegeben. Die Stromantwort konnte auf einem Bildschirm beobachtet werden. Die Abdichtwiderstände lagen zwischen 1 und 10 G Ω .

Durch schwaches, langanhaltendes oder kurzes, starkes Ansaugen wurde die Ganzzell-Konfiguration hergestellt. Anschließend wurde die transiente Stromantwort auf einen Rechteck-Spannungspuls verwendet, um Zugangswiderstand R_Z , Membranwiderstand R_M und Kapazität C_M der Zellmembran zu bestimmen. Diese Funktion bietet das Modul Clampex des pCLAMP-Programmpakets. Die Ströme wurden im Verstärker durch einen 3-Pol Besselfilter mit einer Kantenfrequenz von 3 kHz gefiltert und mit 10 kHz digitalisiert.

Die Messungen fanden bei Raumtemperatur statt. Sie lag zwischen 21 und 27°C. Sie wurde mit einem elektrischen Thermometer gemessen und notiert.

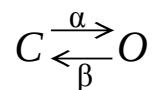
2.2 Markov-Modelle

Zur Auswertung der Ergebnisse stütze ich mich auf Modellvorstellungen. Im folgenden Abschnitt stelle ich mehrere physikalische Modelle zum Schaltverhalten von Ionenkanälen vor. Die Funktion eines Ionenkanals wird dabei auf wenige diskrete Zustände reduziert.

Stromableitungen von ganzen Zellen messen häufig Ströme, die durch viele Kanäle fließen (Makroskopische Ströme). Sie sind graduell und kontinuierlich. Doch die zugrundeliegenden mikroskopischen Ströme durch einzelne Kanäle zeigen meist nur wenige diskrete Stromniveaus. In Analogie zu chemischen Reaktionen wird dieses Schaltverhalten durch Zustandsdiagramme beschrieben. Die Übergänge zwischen den verschiedenen Zuständen werden durch Ratenkonstanten beschrieben. Für die Beschreibung von Ionenkanälen sind oft komplexe Modelle mit vielen Zuständen notwendig. Sie werden mathematisch als Markov-Ketten behandelt. In vielen Fällen kann man die Besetzung eines Zustandes nicht direkt beobachten, weil die Observable, der Leitwert des Kanals, für verschiedene Zustände gleich ist. So haben alle geschlossenen Zustände den Leitwert 0. Diese Zustände sind deshalb für den Experimentator verdeckt. Die entsprechenden Modelle werden als „Verdeckte-Markov-Modelle“ bezeichnet. Statistische Analysen von Einzelkanalableitungen sprechen dafür, dass sich viele Aspekte der Ionenkanäle mit Markov-Modellen erster Ordnung beschreiben lassen. Der Term „erster Ordnung“ drückt aus, dass die Übergangsraten nicht von vorangegangenen Übergängen abhängen - das System hat kein Gedächtnis. Die Größen, die das Verhalten des Kanals bestimmen, zum Beispiel die Spannung oder die Konzentration eines Liganden, beeinflussen im Modell die Übergangsraten.

2.2.1 Gleichgewicht und Kinetik am Modell $C \rightleftharpoons O$

Das einfachste Diagramm, das ein Schaltverhalten beschreibt ist:



Gleichung 2

Dabei steht C (*closed*) für den geschlossenen, O (*opened*) für den offenen Zustand des Kanals. Die Parameter α und β sind Ratenkonstanten, sie beschreiben die Übergangswahrscheinlichkeiten.

Betrachten wir Gleichung 2 für die Beschreibung eines einzelnen Ionenkanals. Dieser Kanal ist für eine bestimmte Zeit offen (O), dann folgt eine Periode, in der er keine Ionen leitet (C). Anschließend ist er wieder offen (O), und so fort. Die genaue Verweildauer im offenen und

geschlossenen Zustand kann nicht vorhergesagt werden, da es sich um einen stochastischen Vorgang handelt. Die Verweildauer folgt einer Exponentialverteilung. Der Erwartungswert der Verteilung beträgt $1/\alpha$ für den geschlossenen und $1/\beta$ für den offenen Zustand. Bei der Messung von Einzelkanalströmen können die mittleren Offen- und Geschlossenzeiten und damit die Parameter α und β separat bestimmt werden. Die Wahrscheinlichkeit P_O , dass der Kanal offen ist, ist:

$$P_O = \frac{\alpha}{\alpha + \beta} \quad \text{Gleichung 3}$$

Gleichung 2 kann auch ein Ensemble von N Ionenkanälen beschreiben, wie es in einer Ganzzellableitung beobachtet wird. Durch die Addition vieler Einzelkanalströme ist der Ionenstrom im Gleichgewicht praktisch konstant. Trotzdem öffnen und schließen ständig Kanäle. Das Symbol C steht jetzt für den Anteil der Kanäle, die im geschlossenen Zustand vorliegen und $O = 1 - C$ für den Anteil offener Kanäle. Ist das System im Gleichgewicht, ergibt sich für die Zustände C und O :

$$O_\infty = \frac{\alpha}{\alpha + \beta} \quad \text{Gleichung 4.1}$$

$$C_\infty = \frac{\beta}{\alpha + \beta} \quad \text{Gleichung 4.2}$$

Der Index ∞ deutet an, dass das Gleichgewicht nur asymptotisch erreicht wird. Der Anteil O der offenen Kanäle entspricht dem Ensemblemittel der Offenwahrscheinlichkeit P_O . Da die einzelnen Kanäle unabhängig voneinander öffnen, haben O und P_O denselben Wert.

Betrachten wir nun, mit welcher Zeitabhängigkeit sich das oben angegebene Gleichgewicht einstellt. Das Massenwirkungsgesetz verlangt, dass die Rate der Übergänge $C \rightarrow O$ proportional zu C ist. Der Proportionalitätsfaktor ist die Ratenkonstante α :

$$\frac{dC}{dt} = -\alpha C + \beta O$$

und wegen $C + O = 1$ gilt

$$\frac{dC}{dt} = \beta - (\alpha + \beta)C \quad \text{Gleichung 5.1}$$

Für die zeitliche Änderung von O erhält man analog:

$$\frac{dO}{dt} = \alpha - (\alpha + \beta)O \quad \text{Gleichung 5.2}$$

Wenn die Parameter α und β geändert werden – zum Beispiel durch einen Spannungssprung, verschiebt sich das Gleichgewicht, C und O nehmen neue Werte an. Durch Integration von Gleichung 5.1 und Gleichung 5.2 erhält man:

$$C(t) = C_{\infty} + (C_0 - C_{\infty}) \exp(-t/\tau) \quad \text{Gleichung 6.1}$$

$$O(t) = O_{\infty} + (O_0 - O_{\infty}) \exp(-t/\tau) \quad \text{Gleichung 6.2}$$

$$\tau = \frac{1}{\alpha + \beta} \quad \text{Gleichung 7}$$

Die makroskopisch messbare Zeitkonstante τ hängt also sowohl von α als auch von β ab. Ihr Wert ist unabhängig von den Besetzungszahlen C und O und damit unabhängig vom Zustand vor der Zustandsänderung. Unter bestimmten Bedingungen ist es möglich, α und β aus makroskopischen Messungen zu gewinnen, und zwar genau dann, wenn eine der Übergangsraten die Reaktion dominiert. Das ist zum Beispiel der Fall, wenn die Offenwahrscheinlichkeit nach einer Zustandsänderung den Wert 1 anstrebt. Für diesen Fall ergibt sich aus Gleichung 4.1 und Gleichung 7:

$$\begin{aligned} O_{\infty} &= \frac{\alpha}{\alpha + \beta} \approx 1 \\ \text{also} \\ \alpha + \beta &\approx \alpha \\ \text{und damit} \\ \tau &= \frac{1}{\alpha + \beta} \approx \frac{1}{\alpha} \end{aligned} \quad \text{Gleichung 8.1}$$

Ganz analog verläuft der andere Extremfall, in dem nach der Zustandsänderung alle Kanäle schließen. Es ergibt sich:

$$\begin{aligned} C_{\infty} &= \frac{\beta}{\alpha + \beta} \approx 1 \\ \text{also} \\ \alpha + \beta &\approx \beta \\ \text{und damit} \\ \tau &= \frac{1}{\alpha + \beta} \approx \frac{1}{\beta} \end{aligned} \quad \text{Gleichung 8.2}$$

2.2.2 Spannungsabhängigkeit und *gating*-Ladung

Die Besetzung der Zustände C und O kann auch mit deren Energie in Zusammenhang gebracht werden, genauer mit der Differenz ΔW der Energien. Im thermodynamischen

Gleichgewicht bestimmt die Boltzmann-Verteilung, welcher Bruchteil der Kanäle geöffnet ist:

$$\frac{O_{\infty}}{C_{\infty}} = \exp\left(\frac{\Delta W}{kT}\right) \quad \text{Gleichung 9}$$

ΔW ist die Differenz der inneren Energien $U_C - U_O$. Bei einem spannungsabhängigen System muss ΔW von der Spannung abhängen. In diesem Fall leistet das elektrische Feld Arbeit, die zu einer Zustandsänderung des Systems führt. Das kann nur durch eine Umverteilung von Ladungen geschehen. Dabei kann es sich um die Bewegung von Ladung relativ zum Feld oder um die Änderung der Orientierung eines Dipols handeln. Die entsprechende Ladung ist der sogenannte „Spannungssensor“ des Kanals, sie wird auch Schaltladung (*gating charge*) genannt. Man stellt sie als ein Vielfaches der Elementarladung q_e dar. Wird eine Ladung $z \cdot q_e$ über die gesamte Membran bewegt, leistet das elektrische Feld die Arbeit $V \cdot z \cdot q_e$. Mutationsstudien haben ergeben, dass während der Aktivierung von spannungsabhängigen Ionenkanälen einige Ladungen tatsächlich über den gesamten Spannungsabfall verschoben werden. Im Allgemeinen kann aber nicht unterschieden werden, ob die Ladung $z \cdot q_e$ über die gesamte Spannung verschoben wird, oder ob ein Vielfaches $m \cdot z \cdot q_e$ lediglich über einen Bruchteil V/m der Spannung verschoben wird. Aufgrund dieser Uneindeutigkeit entspricht $z \cdot q_e$ nicht unbedingt einer physikalischen Ladung. Die Größe $z \cdot q_e$ wird apparente Schaltladung genannt, sie kann – im Gegensatz zu einer realen Ladung – gebrochene Werte z annehmen. Die Spannungsabhängigkeit von ΔW wird mathematisch so formuliert:

$$\Delta W = \Delta W_0 - Vzq_e \quad \text{Gleichung 10}$$

Dabei ist V die Spannung über der Membran und ΔW_0 die Energiedifferenz bei $V = 0$. Für den Spezialfall $O_{\infty} = C_{\infty} = 0,5$ folgt aus Gleichung 9 $\Delta W = 0$. Gleichung 10 vereinfacht sich damit zu:

$$\begin{aligned} 0 &= \Delta W_0 - zq_e V (O_{\infty} = 0,5) \\ \text{und damit} \\ \frac{\Delta W_0}{zq_e} &= V(O_{\infty} = 0,5) = V_{1/2} \end{aligned} \quad \text{Gleichung 11}$$

$V_{1/2}$ bezeichnet man auch als „halbmaximale Aktivierungsspannung“. Setzt man Gleichung 10 in Gleichung 9 ein, so erhält man:

$$\frac{O_{\infty}}{C_{\infty}} = \exp\left(\frac{\Delta W_0 - Vzq_e}{kT}\right) \quad \text{Gleichung 12}$$

mit $C + O = 1$ folgt

$$\frac{O_{\infty}}{C_{\infty} + O_{\infty}} = O_{\infty} = \frac{1}{1 + \exp[(\Delta W_0 - Vzq_e)/kT]} \quad \text{Gleichung 13}$$

Einsetzen von Gleichung 4.1 und Gleichung 4.2 in Gleichung 12 liefert:

$$\frac{O_{\infty}}{C_{\infty}} = \exp\left(\frac{\Delta W_0 - Vzq_e}{kT}\right) = \frac{\alpha}{\beta} \quad \text{Gleichung 14}$$

Aus Gleichung 14 wird deutlich, dass ein spannungsabhängiger Kanal auch spannungsabhängige Raten haben muss.

2.2.3 Verallgemeinerungen

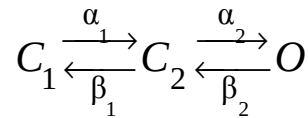
Einige der Aussagen zum einfachsten Modell (Gleichung 2) können so verallgemeinert werden, dass sie auch für komplexere Modelle mit n Zuständen gelten.

1. Nach einer Störung des Gleichgewichtes nimmt die Offenwahrscheinlichkeit einen neuen Gleichgewichtswert an. Der Zeitverlauf dieser Relaxation wird durch $n-1$ einfach exponentielle Funktionen beschrieben. Jede der $n-1$ Zeitkonstanten τ_i ist eine Funktion aller $2(n-1)$ Ratenkonstanten α_i, β_i . Sie sind unabhängig von der Besetzung aller Zustände. Die Besetzungszahlen bestimmen die Koeffizienten $I_1, I_2, \dots$

$$I(t) = I_{\infty} + I_1 \exp(-t/\tau_1) + I_2 \exp(-t/\tau_2) + \dots + I_{n-1} \exp(-t/\tau_{n-1}) \quad \text{Gleichung 15}$$

2. Das Verhältnis der Besetzungszahlen von zwei Zuständen wird durch die Boltzmann-Verteilung bestimmt (Gleichung 12)
3. Ist t die mittlere Verweildauer in einem Zustand und sind $\alpha_1, \dots, \alpha_n$ die Ratenkonstanten der Übergänge, die von diesem Zustand ausgehen, so gilt $t = 1 / (\alpha_1 + \dots + \alpha_n)$

Die Bestimmung einzelner Ratenkonstanten und Koeffizienten ist kompliziert, wenn mehr als zwei Zustände vorliegen. Das soll an einem Beispiel verdeutlicht werden: Nehmen wir an, ein Ionenkanal besitzt 3 Zustände, zwei geschlossene und einen offenen. Das Zustandsdiagramm ist dann:



Gleichung 16

Beim Übergang $C_1 \rightarrow C_2$ soll schon ein Teil der Schaltladung $z \cdot q_e$ bewegt werden. Beobachten wir nun den Übergang in den Offenzustand O, einmal unter Bedingungen, bei denen überwiegend C_1 vorliegt (vollständig deaktivierte Kanäle), und ein anderes Mal unter Bedingungen, bei denen hauptsächlich C_2 bevölkert ist (teilweise deaktivierte Kanäle). Wesentliche Unterschiede werden beobachtet:

1. Wenn anfangs hauptsächlich C_2 bevölkert ist, ist der Wert für z kleiner.
2. Aus dem Zustand C_2 kann der Öffnungsprozess ($C_2 \rightarrow O$) insgesamt schneller ablaufen als aus dem Zustand C_1 ($C_1 \rightarrow C_2 \rightarrow O$)

Die Parameter, die man aus makroskopischen Messungen bestimmt, sind also nicht mehr unabhängig vom Ausgangszustand. Das wird zum Problem, wenn man die Ergebnisse von Messungen unter unterschiedlichen Bedingungen oder an unterschiedlichen Ionenkanälen vergleichen will. Solche Vergleiche setzen voraus, dass der gleiche physikalische Parameter bestimmt wurde. Das muss bei der Planung der Messungen berücksichtigt werden. Beispielsweise lässt sich der Wert für z genauer bestimmen, wenn man ihn bei sehr geringen Werten von P_O (10^{-4} bis 10^{-7}) bestimmt, weil dann wahrscheinlich der Zustand C_1 stärker bevölkert sein wird (Almers, 1978). An spannungsabhängigen Na^+ - und K^+ -Kanälen wurden durch solche Messungen bei extrem kleinen Offenwahrscheinlichkeiten frühere Abschätzungen der *gating*-Ladung von 6 auf etwa 12 Elementarladungen pro Kanal korrigiert (Hille, 2001). Dieser Wert wurde mittlerweile durch direktere Messverfahren bestätigt (Aggarwal und MacKinnon 1996; Seoh et al., 1996)

2.2.4 Ein Modell für HCN-Kanäle

Während der Aktivierung von HCN-Kanälen nach einem Spannungssprung steigt der Strom sigmoid mit der Zeit an. Dieser Zeitverlauf kann nur durch mehrere geschlossene Zustände modelliert werden. Auch der Stromverlauf während der Deaktivierung ist sigmoid. Daher muss ein Modell der HCN-Kanäle mehrere offene Zustände aufweisen. Altomare und Mitarbeiter haben anhand von makroskopischen Ableitungen Zustandsmodelle für HCN1, HCN2 und HCN4 aufgestellt (Altomare et al., 2001). Die Struktur der Modelle für die

verschiedenen Kanäle ist identisch, sie unterscheiden sich nur in den Übergangsraten. Die Modellannahmen sind einfach:

1. Jede der vier Untereinheit kann – je nach Position des Spannungssensors – zwei unterschiedliche Zustände annehmen. Der „nachgiebige“ Zustand begünstigt die Öffnung der Pore, der „zögerliche“ Zustand begünstigt den Geschlossenenzustand.
2. Unabhängig von den Zuständen der Untereinheiten kann der gesamte Kanal offen oder geschlossen sein.

Diese Modelle enthalten 10 Zustände. Durch eine Reihe sinnvoller Annahmen wurde die Anzahl der freien Parameter auf 7 reduziert (siehe Abb. 2-5). Damit konnten Stromspuren beschrieben werden, die die Aktivierung bzw. Deaktivierung von HCN-Kanälen widerspiegeln. Altomare und Mitarbeiter (2001) verwendeten dabei allerdings keine numerischen Anpassungen. Die Werte der Parameter wurden durch probieren ermittelt.

Die Aktivierung von HCN-Kanälen kann nach einem sigmoiden Beginn verhältnismäßig gut durch eine einfache exponentielle Funktion beschrieben werden. Altomare und Mitarbeiter (2001) fanden, dass die entsprechende Zeitkonstante τ_{akt} eine gute Abschätzung der Zeitkonstante des Übergangs $C4 \rightleftharpoons O4$ ist. Es gilt also $\tau_{\text{akt}} \approx 1/(\alpha/a^2 + \beta \cdot a^2)$. Durch die Kooperativität der Untereinheiten öffnet der Kanal meist erst, wenn alle 4 Untereinheiten im „nachgiebigen“ Zustand sind. Die Öffnung des HCN-Kanals könnte also vereinfachend durch ein sequenzielles Modell ($C \rightarrow C1 \rightarrow C2 \rightarrow C3 \rightarrow C4 \rightarrow O4$) beschrieben werden. Entsprechend schließt der Kanal bevorzugt durch die Übergänge $O4 \rightarrow O3 \rightarrow O2 \rightarrow O1 \rightarrow O \rightarrow C$. Es gilt damit: $\tau_{\text{deakt}} \approx 1/(\alpha + \beta)$.

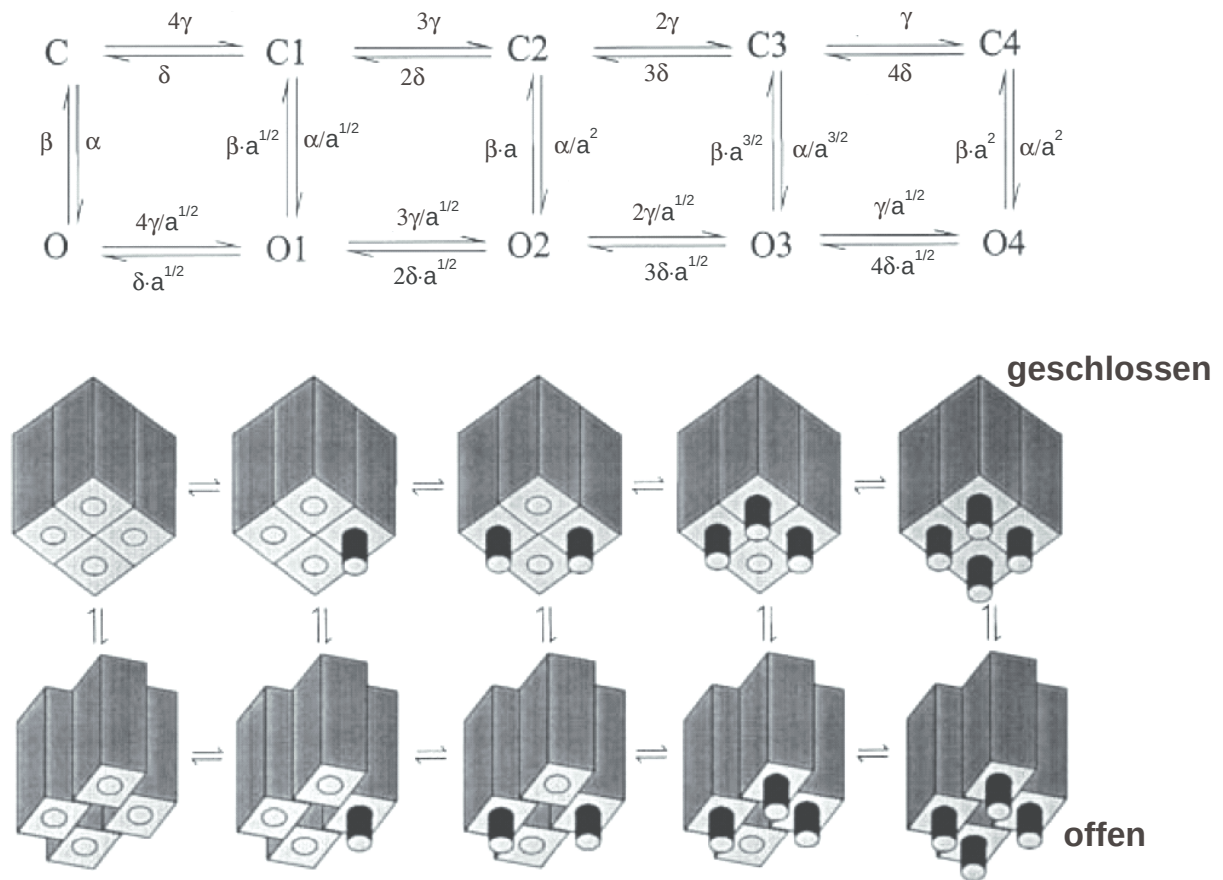


Abbildung 2-5: Ein Markov-Modell für HCN-Kanäle. (Oben) Schema, das die Zustände und die Übergangsraten zeigt. Es ist jeweils nur eine von mehreren möglichen Konformationen mit 1, 2 oder 3 „nachgiebigen“ Sensoren dargestellt. Es wird beispielsweise nicht unterschieden, welcher der vier Spannungssensoren beim Übergang $C \rightarrow C1$ den „nachgiebigen“ Zustand einnimmt. Die vier möglichen Varianten werden zusammengefasst. Dadurch ergibt sich, dass die Ratenkonstante des Übergangs $C \rightarrow C1$ viermal größer ist, als die Ratenkonstante des Übergangs $C3 \rightarrow C4$. Denn für den Übergang $C3 \rightarrow C4$ gibt es nur eine Möglichkeit: nur ein Spannungssensor ist im „zögerlichen“ Zustand und geht zum „nachgiebigen“ Zustand über. Die Ratenkonstanten α , β , δ , γ sind spannungsabhängig. Ihre Spannungsabhängigkeit wird beschrieben als $\alpha = \alpha_0 \cdot \exp(z_\alpha q_e V/kT)$ (analog für β , δ und γ). Das Modell hat die freien Parameter α_0 , β_0 , δ_0 , γ_0 und die *gating*-Ladungen z_α , z_β , z_δ , z_γ . Es wurde weiterhin angenommen: $z_\alpha = -z_\beta$, $z_\delta = -z_\gamma$. Um zu beschreiben, dass sich die Offenwahrscheinlichkeit erhöht, wenn mehr Spannungssensoren im „nachgiebigen“ Zustand sind, wurde ein weiterer Parameter a eingeführt. Jeder weitere Spannungssensor im „nachgiebigen Zustand“ erniedrigt die Geschlossenwahrscheinlichkeit um den Faktor a . Es gilt also $C1/O1 = a \cdot C/O$. (Unten) Mechanistisches Modell. Die vier Spannungssensoren (Zylinder) eines HCN-Kanals können in einem „nachgiebigen“ Zustand sein (Zylinder sichtbar) oder in einem „zögerlichen“ Zustand. Übergänge von links nach rechts erhöhen die Zahl der „nachgiebigen“ Untereinheiten, Übergänge von oben nach unten öffnen die Pore.

2.2.5 Bestimmung der Offenwahrscheinlichkeit

Der Strom durch N Ionenkanäle mit Einzelkanalleitwert γ ist:

$$I(V) = N \cdot \gamma(V) \cdot (V - V_U) \cdot P_O(V) \quad \text{Gleichung 17}$$

dabei ist $P_O(V)$ die Offenwahrscheinlichkeit bei der Spannung V . V_U bezeichnet das Umkehrpotential. Bei dieser Spannung verschwindet der Strom. Aus Gleichung 17 ergibt sich, dass bei einer festen Spannung der Strom proportional zur Offenwahrscheinlichkeit ist. Wenn der Einzelkanalleitwert γ nicht von der Spannung abhängt, kann man verallgemeinern:

$$\frac{I(V)}{V - V_U} \cdot \text{const} = P_O(V) \quad \text{Gleichung 18}$$

Häufig wird das Öffnungsverhalten von Ionenkanälen durch das Modell $C \rightleftharpoons O$ (Gleichung 2) beschrieben (zu Beschränkungen dieses Ansatzes siehe Kapitel 2.2.3). Im Rahmen des Modells $C \rightleftharpoons O$ sind P_O und O identisch (siehe Kapitel 2.2.1). Es ergibt sich aus Gleichung 13 und Gleichung 18:

$$\frac{I(V)}{V - V_U} \cdot \text{const} = \frac{1}{1 + \exp[(\Delta W_0 - zq_e V) / kT]} = P_O(V)$$

und mit Gleichung 11 ergibt sich

$$\frac{I(V)}{V - V_U} \cdot \text{const} = \frac{1}{1 + \exp[zq_e (V_{1/2} - V) / kT]} = P_O(V) \quad \text{Gleichung 19}$$

Für die Gültigkeit von Gleichung 13 wurde vorausgesetzt, dass das System im Gleichgewicht ist. Der Strom I muss also in einem Gleichgewichtszustand gemessen werden. Die Spannungsabhängigkeit von P_O im Gleichgewicht wird durch die *gating*-Ladung z und die halbmaximale Aktivierungsspannung $V_{1/2}$ beschrieben.

Aus der Mathematik der Markov-Modelle ergeben sich zwei Wege, diese Parameter zu bestimmen. Zum einen kann der Gleichgewichtswert des Stromes bei verschiedenen Testspannungen gemessen werden. Aus der gemessenen I - V -Relation können mit Hilfe der Gleichung 19 z und $V_{1/2}$ bestimmt werden. Zum anderen kann die Messung auch bei einer festen Testspannung V_T durchgeführt werden, weil sich die Offenwahrscheinlichkeit nach einem Spannungssprung nicht sofort ändert. Der Strom ändert sich gemäß Gleichung 15. Er ist daher unmittelbar nach dem Sprung zur Spannung V_T proportional zur Offenwahrscheinlichkeit vor dem Sprung. Es ist dadurch möglich, mit unterschiedlichen Vorpulsspannungen V_V unterschiedliche Offenwahrscheinlichkeiten $P_O(V_V)$ einzustellen und diese unmittelbar nach dem Sprung zu einer festen Testspannung V_T zu bestimmen. Die Ströme, die nach dem Sprung zur Testspannung auftreten werden *tail*-Ströme genannt. Für den „instantanen“ (*instantaneous*) *tail*-Strom I_{tail} , der unmittelbar nach dem Spannungssprung

gemessen wird, gilt:

$$I_{tail}(V_T) = N \cdot \gamma(V_T) \cdot (V_T - V_U) \cdot P_O(V_V) + I_{Leck}(V_T) \quad \text{Gleichung 20}$$

Ohne Annahmen über die Spannungsabhängigkeit des Einzelkanalleitwertes γ gilt damit:

$$I_{tail}(V_T) \cdot C_1 + C_2 = \frac{1}{1 + \exp[zq_e(V_{1/2} - V_V)/kT]} = P_O(V_V) \quad \text{Gleichung 21}$$

Durch die Konstante C_2 wird der Leckstroms berücksichtigt. In Abbildung 2-7 ist ein Spannungsprotokoll gezeigt, mit dem solche Messungen durchgeführt werden können. Es ist wichtig, dass die Spannung nach dem Sprung deutlich schneller stabilisiert wird, als sich die Offenwahrscheinlichkeit ändert. Nur dann ist die Amplitude des *tail*-Stromes proportional zur Offenwahrscheinlichkeit am Ende des Vorpulses. HCN-Kanäle weisen eine sigmoide Aktivierung und Deaktivierung auf. Ihre Offenwahrscheinlichkeit ändert sich also nach einem Spannungssprung zunächst langsam. Sie sind deshalb sehr gut für diese Art der Analyse geeignet.

Abbildung 2-6 zeigt, dass für HCN-Kanäle die Analyse der *tail*-Ströme und der Ströme im Gleichgewicht zu den gleichen Ergebnissen führt. Das bedeutet, dass bei HCN-Kanälen der Einzelkanalleitwert im untersuchten Spannungsbereich konstant ist.

Die Analyse der *tail*-Stromes hat gegenüber der direkten Messung von $I(V)$ wesentliche Vorteile:

1. Das Umkehrpotential des Stromes spielt für die Analyse keine Rolle – es muss nicht bestimmt werden.
2. Es müssen keine Annahmen über die Einzelkanalleitfähigkeit gemacht werden.
3. Der Leckstrom bei V_T ist konstant.
4. Die Testspannung ist nahezu beliebig.
 - a. Durch eine große Differenz $V_T - V_U$ entstehen auch für kleine Offenwahrscheinlichkeiten messbare Ströme.
 - b. Ist V_T das Umkehrpotential eines endogenen Stromes, trägt dieser nicht zum Messwert I bei.
5. Spannungsabhängige Störungen, die im Vorpuls auftreten, aber nach dem Sprung zur Testspannung schnell abklingen, haben keinen Einfluss auf die Messung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durchgehend *tail*-Ströme analysiert.

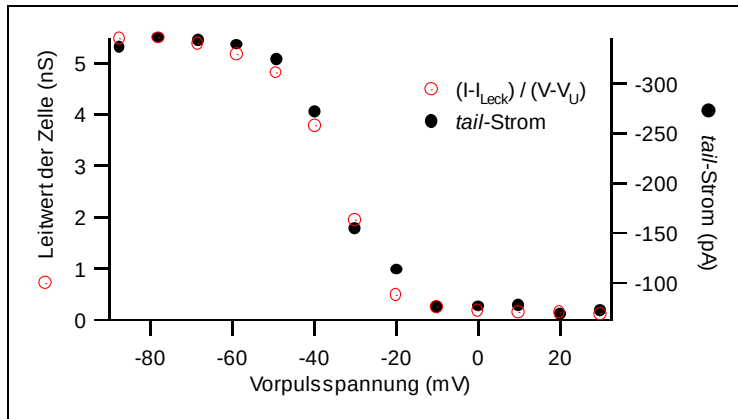


Abbildung 2-6: Aus Stromableitungen in Abbildung 2-7 B wurde die Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit auf zwei Wegen bestimmt. Einmal aus Strömen I im Gleichgewicht (rot), das andere Mal aus *tail*-Strömen (schwarz). Die Bestimmung der Ströme I im Gleichgewicht und die Bestimmung der *tail*-Ströme wird in Kapitel 2.3.1 erklärt. Der Leckstrom I_{Leck} wurde bei Spannungen zwischen 0 und +20 mV bestimmt. Bei diesen Spannungen sind keine HCN-Kanäle aktiviert, alle auftretenden Ströme sind Leckströme. Für alle anderen Spannungen wurde der Leckstrom extrapoliert. Dabei wurde angenommen, dass das Umkehrpotential des Leckstromes 0 mV beträgt.

2.3 Auswertung der Stromspuren

Die Analyse der Stromspuren erfolgte mit dem Programm IGOR Pro 4 (Wavemetrics Inc., Lake Oswego, OR, USA). Zu Beginn der Auswertung wurden die Stromableitungen mit einem Software-Gaußfilter geglättet. Die Kantenfrequenz betrug 500 Hz. Alle Daten in diesem Kapitel stammen von Stromableitungen an einer Zelle, welche die HCN1 Mutante N168D exprimierte.

Abbildung 2-7 A zeigt ein typisches Spannungsprotokoll. Die Kommandospannung V_{cmd} variierte im Vorpuls in Schritten von 10 mV zwischen +30 und -90 mV. Im Testpuls betrug sie -90 mV. Wegen des Zugangswiderstandes betrug die tatsächlich anliegende Membranspannung zwischen -87 und -82 mV.

HEK293 besitzen endogene Kanäle, die bei Spannungen, die negativer als etwa -90 mV sind, aktiviert werden. In einigen Zellen trugen sie in diesem Spannungsbereich einen erheblichen Teil zum Gesamtstrom bei. Es handelt sich dabei um einen K^+ -leitenden Einwärtsgleichrichter. Das K^+ -Umkehrpotential liegt bei etwa -82 mV, wenn mit den Lösungen SIS und ES2 gearbeitet wird. Die Differenz zur Testspannung ist gering, die K^+ -Ströme trugen dadurch kaum zum *tail*-Strom bei.

2.3.1 Spannungsabhängigkeit der Aktivierung

Im folgenden bezeichne ich die Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit als Aktivierung, die Abnahme als Deaktivierung. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung wurde jeweils an Stromantworten auf ein vollständiges Spannungsprotokoll bestimmt. Der Gleichgewichtsstrom wurde bestimmt, indem der Strom in einem Intervall am Ende des Vorpulses gemittelt wurde. Mit diesem Gleichgewichtsstrom, dem Zugangswiderstand R_Z und dem Wert k für die R_Z -Kompensation wurde der tatsächliche Wert V_V der Spannung am Ende des Vorpulses bestimmt (Gleichung 1).

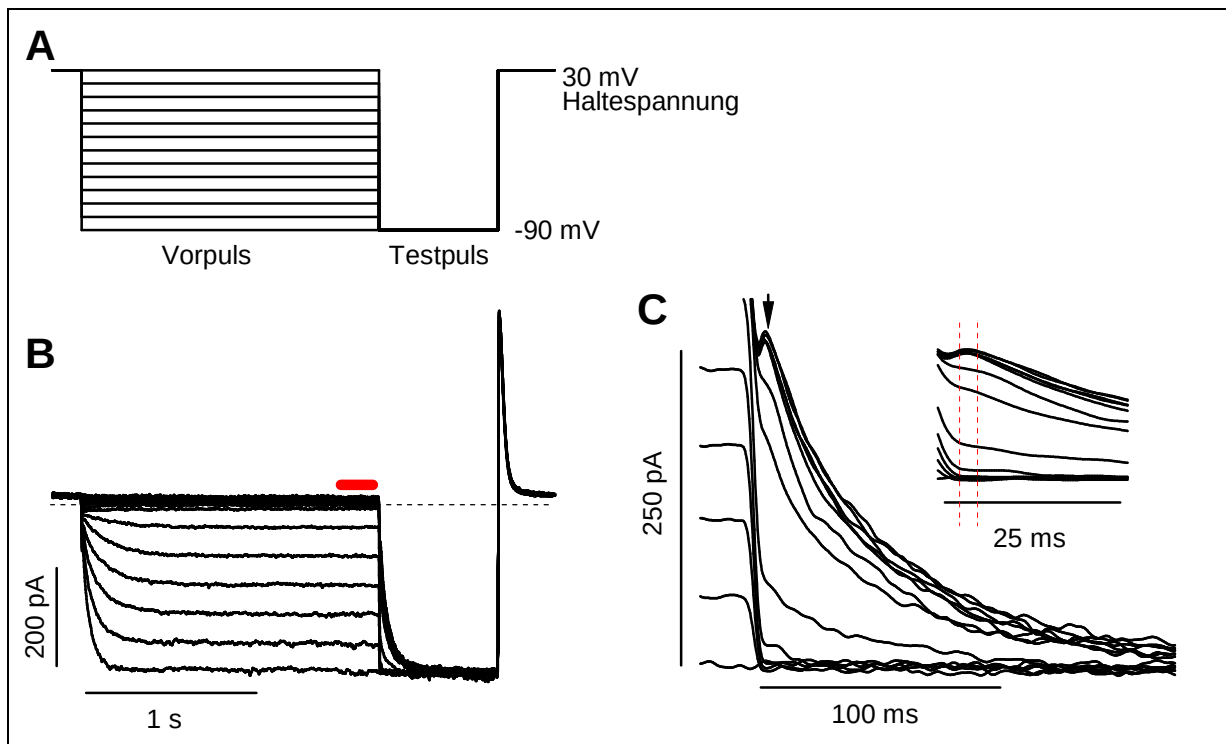


Abbildung 2-7: (A) Spannungsprotokoll. (B) Stromantworten während des Spannungsprotokolls. Am Ende jedes Vorpulses wurde der Gleichgewichtsstrom bestimmt, indem über ein Zeitintervall gemittelt wurde (roter Balken). (C) Das Ende des Vorpulses und der Beginn des Testpulses sind in höherer Zeitauflösung dargestellt. Der Pfeil markiert den Bereich nach dem Abklingen der kapazitiven Transienten (siehe Text), in dem die Amplitude des *tail*-Stromes bestimmt wurde. Im Inset ist dieser Bereich nochmals vergrößert dargestellt. Das Zeitintervall von 2,5 ms, in dem die Amplitude gemittelt wurde, ist durch rote durchbrochene Linien markiert.

Nach dem Sprung auf die Testspannung treten in den Stromableitungen schnelle Transienten auf (Abbildung 2-7 C). Sie entstehen durch die nicht vollständig abgeglichenen Kapazität der Zellmembran. Die Amplitude des *tail*-Stromes wurde nach dem Abklingen der Transienten bestimmt. Der *tail*-Strom wurde dazu in einem kleinen Intervall gemittelt, in dem er fast konstant war (Abbildung 2-7 B).

Der *tail*-Strom I_{tail} wurde als Funktion der korrigierten Vorpulsspannung V_V dargestellt (Abbildung 2-8). Nach Abschnitt 2.2.5 ist I_{tail} proportional zur Offenwahrscheinlichkeit am

Ende des Vorpulses. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung ist damit bestimmt. Sie konnte durch eine Boltzmann-Funktion beschrieben werden (Gleichung 21):

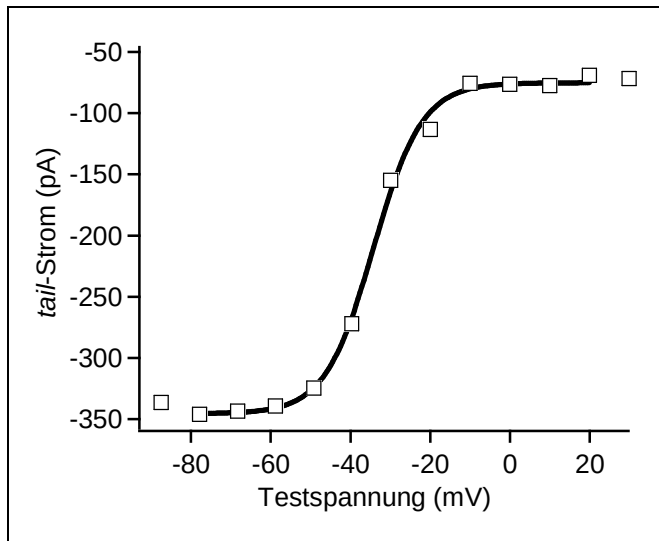


Abbildung 2-8: Die Amplitude des *tail*-Stroms (siehe Abbildung 2-7 B) ist gegen die Spannung V_V am Ende des Vorpulses aufgetragen. Die durchgezogene Kurve ist eine Boltzmann-Funktion (Gleichung 21). Der Einfluss des Zugangswiderstandes R_Z auf die Spannung wurde berücksichtigt.

An jeder Zelle wurden mehrere Familien von Stromableitungen aufgenommen, in der Regel 2 bis 3 Messungen bei jedem pH-Wert. Die jeweiligen Werte für z und $V_{1/2}$ wurden gemittelt und gegen den pH-Wert aufgetragen (Abbildung 2-9).

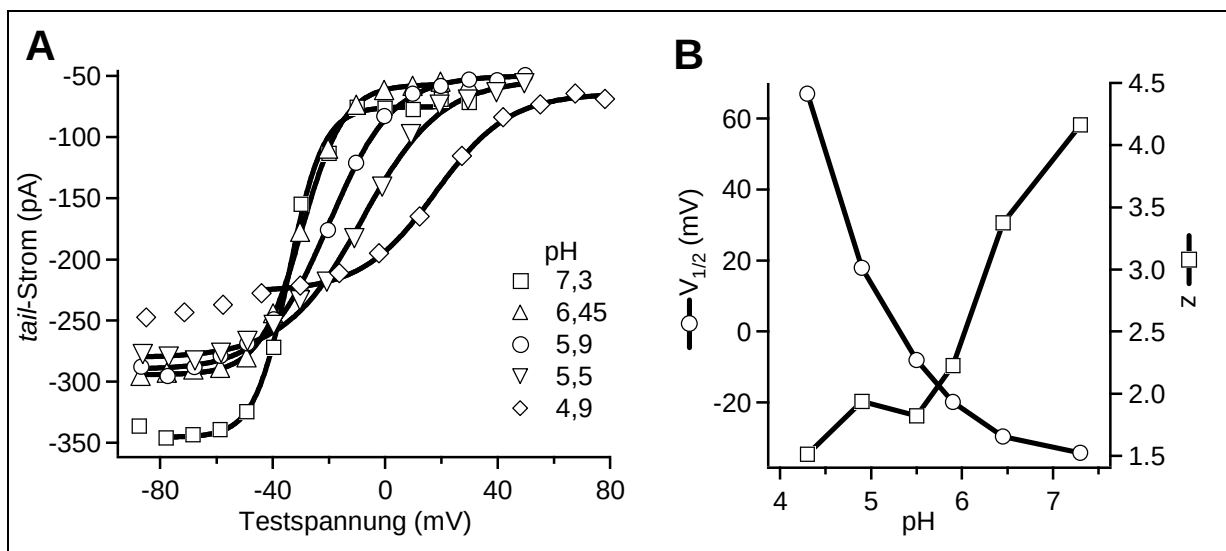


Abbildung 2-9: (A) Spannungsabhängigkeit der Aktivierung für verschiedene pH-Werte. Der Graph enthält die Daten der Abbildung 2-8 ($\square$). Außerdem sind Amplituden von *tail*-Strömen aufgetragen, die aus Stromantworten bestimmt wurden, die bei verschiedenen pH-Werten von derselben Zelle abgeleitet wurden. Durchgehende Linien sind Boltzmann-Funktionen. (B) Die Parameter z und $V_{1/2}$ der Boltzmann-Funktion sind über dem pH-Wert aufgetragen.

2.3.2 Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik

Der Zeitverlauf der HCN1-Ströme nach einem Spannungssprung ist nicht exponentiell sondern sigmoid (siehe Abbildung 2-10). Mit Hilfe eines speziellen Programms (ChannelLab, synaptosoft) habe ich versucht, die gemessenen Stromableitungen durch das Markov-Modell für HCN1 zu beschreiben. Es gelang jedoch nicht, die Anfangsparameter so einzustellen, dass die Anpassungen konvergierten. Vernachlässigt man jedoch die erste Verzögerung in der Stromantwort, lassen sich sowohl Aktivierung als auch Deaktivierung gut durch einfach exponentielle Funktionen beschreiben. Diese Beobachtung kann so gedeutet werden, dass die Kinetik bestimmter Übergänge die Reaktion dominieren, und zwar im Falle der Aktivierung der Übergang $C4 \rightarrow O4$ und im Falle der Deaktivierung der Übergang $O \rightarrow C$ (siehe Kapitel 2.2.4 und Abbildung 2-5). Daher schien es sinnvoll, einfach exponentielle Anpassungen vorzunehmen, auch wenn das Modell für HCN1 offensichtlich komplizierter ist. Das Ergebnis einfacher exponentieller Anpassung an sigmoide Kurven hängt von der Wahl des Start- und Endpunktes ab. Um Variabilitäten durch willkürliche Anpassungsbereiche zu vermeiden, wurden Startpunkt und Dauer der Anpassung mit einer empirisch gewonnenen Formel festgelegt. Bei der Anpassung von Aktivierungsprozessen setzte sich die Verzögerung vor dem Start der Anpassung aus einem festen Intervall ($0,006 \text{ s}$) und einem variablen Intervall ($0,00015 \cdot \tau$) zusammen. Die Länge des angepassten Intervalls betrug stets 5τ . Dabei ist τ die Zeitkonstante aus dem jeweils vorangegangenen Iterationsschritt. Es wurde so lange iteriert, bis aufeinanderfolgende Zeitkonstanten weniger als 0,1 % voneinander abwichen. In etwa 10 % der Fälle wurde keine Konvergenz erreicht. Die Iteration wurde dann nach dem 20. Schritt abgebrochen. War der Unterschied der Zeitkonstanten aus den beiden letzten Iterationsschritten kleiner als 5 %, so wurde ihr Mittelwert übernommen, bei größeren Abweichungen wurde für die Kurve keine Zeitkonstante angegeben.

Für die Anpassungen an Deaktivierungskurven (siehe Abbildung 2-10) wurde der gleiche Algorithmus verwendet. Es ließ sich allerdings keine feste Kombination von festem und variablem Intervall finden, die für alle Deaktivierungskurven befriedigende Anpassungen lieferte. In einigen Fällen brachen die Stromantworten auch zu früh ab, um tatsächlich ein Intervall der Länge 5τ anpassen zu können. In diesen Fällen wurden Längen von 4τ oder 3τ verwendet. Ergebnisse der Anpassungen sind in Abbildung 2-11 A dargestellt. Die so bestimmten Aktivierungszeitkonstanten τ_{akt} wurden über der Spannung V_V aufgetragen (Abbildung 2-11 B).

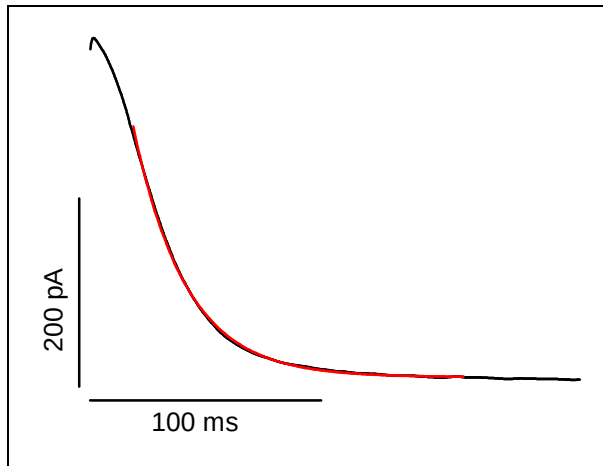


Abbildung 2-10: Deaktivierung von HCN1-N168D. Eine Stromantwort auf den Sprung von der Testspannung (-90 mV) zur Haltespannung (-30 mV). Die einfach exponentielle Anpassung ist rot eingezeichnet. Die Dauer der Anpassung wurde iterativ auf 5 Zeitkonstanten eingestellt.

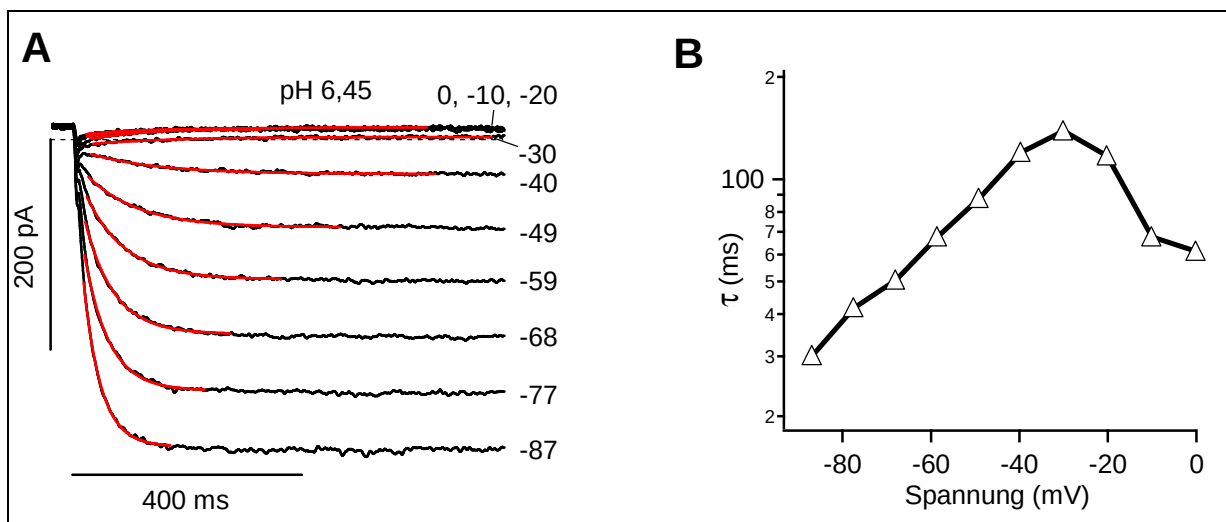


Abbildung 2-11: Bestimmung der Aktivierungskinetik. (A) Stromantworten wurden bei einem festen pH-Wert (pH 6,45) und verschiedenen Spannungen aufgenommen. Die Spannung ist jeweils rechts neben der Ableitung in mV angegeben. Die roten Kurven sind einfache exponentielle Funktionen. Die Dauer der Anpassung betrug das 5fache der Zeitkonstanten τ . (B) Die Zeitkonstanten dieser Funktionen sind über der Spannung aufgetragen.

Es fällt auf, dass die Spannungsabhängigkeit von τ_{akt} einen zweiphasigen Verlauf annimmt. Ausgehend von negativen Spannungen steigt τ_{akt} mit zunehmend positiver Testspannung zunächst an, durchläuft ein Maximum und sinkt dann wieder ab. Ein Grund hierfür ist, dass τ_{akt} , wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, eine Kombination aus zwei oder mehr Ratenkonstanten ist. Im einfachsten Fall ist $\tau = 1 / (\alpha + \beta)$. Die Spannungsabhängigkeit von τ_{akt} hängt demnach von der Spannungsabhängigkeit der Ratenkonstanten α und β ab. Altomare und Mitarbeiter (2001) konnten für HCN1 zeigen, dass α und β praktisch identische Spannungsabhängigkeiten haben. Sie konnten gut beschrieben werden durch:

$$\alpha(V) = \alpha_0 \exp[-(z_\alpha q_e V) / kT] \quad \text{Gleichung 22.1}$$

$$\beta(V) = \beta_0 \exp[(z_\beta q_e V) / kT] \quad \text{Gleichung 22.2}$$

Es galt $z_\alpha = z_\beta = 0,94$. Im Rahmen dieser Arbeit wird zur Kurvenanpassung von τ_{akt} -V-Relationen die Gleichung 22.3 verwendet. Während einer solchen Anpassung wird die Summe der Fehlerquadrate minimiert. Dabei stellt die logarithmische Form, in der Gleichung 22.3 vorliegt, sicher, dass gleichgroße relative Fehler gleichwertig eingehen. Dadurch wird der Algorithmus numerisch stabiler.

$$\ln(1/\tau_{\text{akt}}) = \ln(\alpha\beta) = \ln(\alpha_0\beta_0) - z_\alpha q_e V / kT \quad \text{Gleichung 22.3}$$

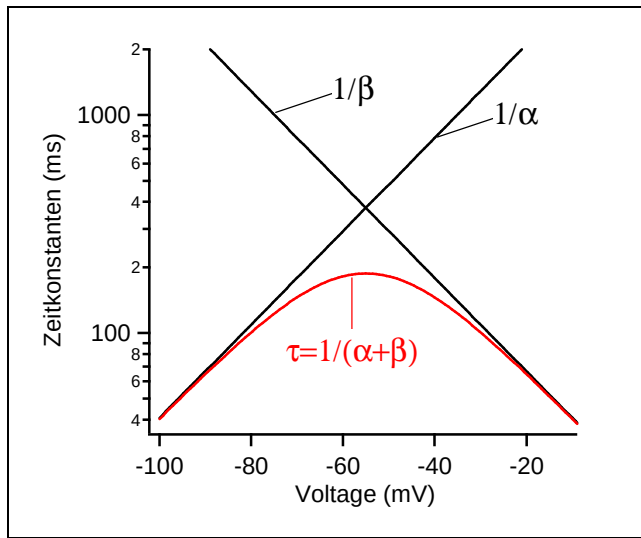


Abbildung 2-12: Theoretischer Zusammenhang zwischen den Ratenkonstanten α und β und der makroskopisch messbaren Zeitkonstanten τ . Es wurde $\alpha = \alpha_0 \cdot \exp(z_\alpha \cdot q_e \cdot V / kT)$ und $\beta = \beta_0 \cdot \exp(-z_\beta \cdot q_e \cdot V / kT)$ mit $z = 0,94$ angesetzt. Die Parameter α_0 und β_0 wurden so gewählt, dass τ ähnlich verläuft, wie τ_{akt} für pH 7,3 in Abbildung 2-13.

Abbildung 2-12 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen α , β und $\tau_{\text{akt}} = 1 / (\alpha + \beta)$. Man kann für ein einfaches Modell (Gleichung 2), bei dem sich die Ratenkonstanten gemäß Gleichung 22.1 und Gleichung 22.2 verhalten, zeigen, dass das Maximum der τ_{akt} -V-Kurve oft in der Nähe des $V_{1/2}$ -Wertes liegt (Siehe Anhang A).

Betrachten wir nun die Spannungsabhängigkeit von τ_{akt} für verschiedene pH-Werte (siehe Abbildung 2-13 A). Das Maximum verschiebt sich mit kleinem pH nach rechts, ähnlich wie die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung (siehe Abbildung 2-9 A). Interpoliert man aus den τ_{akt} -V-Kurven die τ_{akt} -Werte für eine feste Spannung (farbige Punkte) und trägt sie gegen den pH-Wert auf, so erhält man Abbildung 2-13 B. Die resultierenden pH-Abhängigkeiten

verlaufen für die verschiedenen Spannungen recht unterschiedlich. Bei -80 mV deutet sich für τ_{akt} eine Sättigung unterhalb von pH 6 an. Bei -30 mV scheint τ_{akt} dagegen oberhalb von pH 6,45 in Sättigung zu gehen. Bei -20 mV ergibt sich sogar eine konkave τ_{akt} -pH-Kurve.

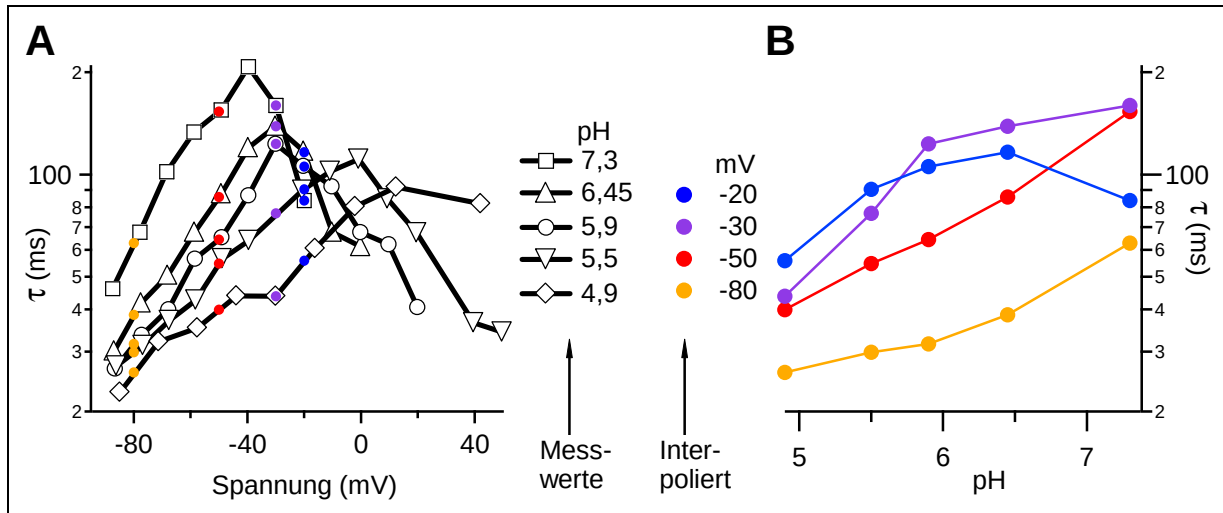


Abbildung 2-13: Bestimmung der pH-Abhängigkeit von τ_{akt} bei einer festen Spannung. In A sind Zeitkonstanten gegen die Spannung aufgetragen. Sie wurden an einer Zelle bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Farbig sind die Werte eingetragen, die sich durch Interpolation bei -80, -50, -30 und -20 mV ergeben. Die interpolierten Werte sind in B über dem pH-Wert aufgetragen. Eine Interpretation der unterschiedlichen pH-Abhängigkeiten ist im Text angegeben.

Vermutlich bilden diese Unterschiede die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung ab und nicht Unterschiede in der pH-Abhängigkeit einer Ratenkonstante. Vergleicht man die Lage der Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit in Abbildung 2-9 A und die Spannungsabhängigkeit der Aktivierungszeitkonstanten in Abbildung 2-13 A, so fällt auf, dass die Maxima der Aktivierungszeitkonstante und die halbmaximale Offenwahrscheinlichkeit bei allen pH-Werten in etwa zusammenfallen. In Abbildung 2-12 wird deutlich, dass links vom Maximum die Ratenkonstante α den Wert von τ dominiert. Rechts vom Maximum dominiert dagegen β . Um die pH-Abhängigkeit der Aktivierungsrate α bei fester Spannung zu bestimmen, sollten also möglichst negative Spannungen verwendet werden. Bei -80 mV sind bei pH 4,9 und pH 7,3 mehr als 99 % der Kanäle aktiviert. Nach Gleichung 4.1 ist damit $0,99 < P_0 = \alpha / (\alpha + \beta)$ und deshalb $0,99 / \alpha < \tau$. Weil β positiv ist, gilt aber auch $\tau = 1 / (\alpha + \beta) < 1 / \alpha$ (siehe auch Abbildung 2-12). Damit ist $0,99 / \alpha < \tau < 1 / \alpha$. Das heißt τ weicht weniger als 1 % von $1 / \alpha$ ab. Die pH-Abhängigkeit von τ (-80 mV) ist also ein geeignetes Maß, um die pH-Abhängigkeit der Ratenkonstante α bei -80 mV zu untersuchen.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Lösungen für die HEK293-Kultur und die Transfektion

M10

10 % (v/v) fötales Kälberserum (FCS)*
 1 % (v/v) Antibiotika/Antimykotika*
 1 % (v/v) nicht essentielle Aminosäuren
 ohne L-Glutamin (100 ×)*
 in Minimal Essential Medium (MEM)
 mit Earle's Salzen, 2 mM L-Glutamin,
 NaHCO₃ (1 × Flüssigmedium)*

Trypsin/EDTA*

0,05 % (w/v) Trypsin
 0,02 % (w/v) EDTA

PLL-Lösung

0,1 mg Poly-L-Lysin/ml H₂O

PBS

137 mM NaCl
 10 mM Na₂HPO₄
 2,6 mM KCl
 1,8 mM KH₂PO₄
 pH 7,2

* Diese Lösungen wurden von GIBCO/Invitrogen bezogen.

Eine Variante der Lösung M10 ohne Antibiotika/Antimykotika wird mit M10 $\ominus$ bezeichnet.

2.4.2 Kulturbedingungen für HEK293-Zellen

Für die heterologe Genexpression wurde die Nierenzelllinie 293 verwendet (HEK293; Graham et al., 1977). Diese Zelllinie wurde durch Transformation mit Adenoviren aus menschlichen, embryonalen Nierenzellen generiert.

HEK293-Zellen wurden in dem Nährmedium M10 bei 37°C, 5 % CO₂ und ~95 % Luftfeuchtigkeit in Petrischalen (Ø 9 cm) kultiviert. Das M10-Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Bei einer Dichte von $\sim 1 \times 10^7$ Zellen/Ø 9 cm-Schale (entspricht 90 % Konfluenz) wurden die Zellen abgelöst und auf neue Schalen verteilt (*Splitting*). Dazu wurden die Zellen zunächst mit 3 - 5 ml PBS gewaschen und dann mit 1 ml Trypsin/EDTA bei 37°C in ca. 5 min abgelöst. Die Zellen wurden in 8 - 10 ml M10 aufgenommen und die Zelldichte der Suspension in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für die Zellerhaltung wurde ein Teil der Zellen mit einer Dichte von $\sim 1,5 \times 10^5$ Zellen (entspricht 10 - 20 % Konfluenz) auf Ø 9 cm-Schalen mit frischem M10 ausgesät. Die verbleibenden Zellen wurden in verschiedenen Dichten in Multiwellplatten ausgesät und für die Transfektion der

HCN1-Gene verwendet. Nach etwa 30 Wochen (30 *Splitting*-Runden) wurden die HEK293-Zellen verworfen und ein neues Aliquot tiefgefrorener Zellen verwendet. Für die Langzeitlagerung wurden HEK293-Zellen geerntet, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase (60 - 70 % Konfluenz) befanden. Etwa 2×10^6 Zellen/ml M10 (10 % DMSO) wurden in flüssigem Stickstoff gelagert.

Tiefgefrorene Zellen wurden wie folgt ausgesät: Sie wurden schnell bei 37°C aufgetaut und vorsichtig in 10 ml vorgewärmtem M10 verdünnt. Um das toxische DMSO zu entfernen, wurden die Zellen anschließend pelletiert (5 min, $200 \times g$, RT) und in 3 - 5 ml frischem M10 resuspendiert. Die Aussaat der Zellen erfolgte mit einer Dichte von $\sim 5 \times 10^5$ Zellen pro $\varnothing$ 9 cm-Schale.

2.4.3 Transfektion von HEK293-Zellen

Für die Transfektion wurden $0,5 \times$ oder $1 \times$ oder 2×10^5 HEK293-Zellen in den Vertiefungen einer Multiwellplatten (Nunc, Wiesbaden) in M10 $\ominus$ ausgesät. Die Dichte richtete sich danach, ob die Transfektion am 3., 2. oder 1. Tag nach der Aussaat erfolgen sollte.

Die Transfektion wurde mit Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) durchgeführt. Die Transfektionsansätze wurden nach Herstellerangaben gemischt und für 20 min (RT) inkubiert. Anschließend wurden sie zu den Zellen gegeben. Nach 6 bis 24 Stunden wurden die Zellen mit 0,5 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann durch Zugabe von 100 μ l Trypsin/EDTA bei 37°C vom Schalenboden abgelöst. Der Trypsinverdau wurde gestoppt, indem die Zellen in 400 μ l M10 $\ominus$ resuspendiert wurden. Jeweils 300 μ l der Zellsuspension wurden dann auf Poly-L-Lysin beschichtete Glasplättchen pipettiert und die Zellen bei 37°C, 5 % CO₂ und ~ 95 % Luftfeuchtigkeit für 24 - 48 h inkubiert. Dem Zellmedium wurde 3 - 4 h nach dem Umsetzen 3 mM Natriumbutyrat zugefügt, um das Expressionsniveau zu steigern.

Die Beschichtung der Plättchen mit Poly-L-Lysin (PLL) erfolgte einen Tag vor dem Umsetzen. Die Plättchen wurden hierzu in den Multiwell-Platten mit PLL-Lösung über Nacht inkubiert. Unmittelbar vor dem Umsetzen wurde die PLL-Lösung entfernt, die Plättchen wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann mit 100 μ l M10 überschichtet.

3 Resultate

3.1 Einfluss des extrazellulären pH-Werts auf HCN1

Der Einfluss des extrazellulären pH-Werts auf die Aktivierungseigenschaften der HCN1-Kanäle wurde in Ganzzell-Versuchen bestimmt. An jeder Zelle wurde zunächst in neutraler extrazellulärer Lösung gemessen. Anschließend wurde die Lösung durch lokale Perfusion ausgetauscht. Dabei wurden pH-Werte zwischen pH 7,3 und pH 4,3 eingestellt.

Abbildung 3-1 zeigt Stromantworten einer Zelle, die HCN1-Kanäle exprimierte, bei verschiedenen extrazellulären pH-Werten. Als Antwort auf den Spannungssprung von 0 mV auf -90 mV beobachtet man zunächst eine sehr schnelle, „instantane“ Stromkomponente. Es ist berichtet worden, dass ein Teil dieser schnellen Komponente durch HCN-Kanäle getragen werden könnte (Gauss et al., 1998). Ein zweiter Teil dieser Komponente ist der Leckstrom. In einigen Experimenten ist diesen Strömen noch ein transienter Strom überlagert. Er entsteht durch das Laden der Kapazität der Zellmembran und kann nicht immer durch die Kapazitätskompensation des Verstärkers beseitigt werden. Nach diesen schnellen Prozessen beobachtet man die charakteristische sigmoide, zeitabhängige Aktivierung der HCN1-Kanäle (siehe auch Einschub in Abbildung 3-1). Der Strom erreicht nach etwa 1 s seinen Gleichgewichtswert. Springt man von -90 mV wieder zurück auf die Haltespannung von 0 mV, beobachtet man einen transienten Auswärtsstrom, den sogenannten *tail*-Strom. Er spiegelt die Deaktivierung der HCN1-Kanäle wider.

Vergleicht man die Stromantworten bei pH 4,9 mit denen bei neutralem pH, werden einige Unterschiede deutlich.

1. Die Aktivierungsprozesse werden schneller, die Deaktivierungsprozesse langsamer.
2. Der Maximalstrom bei -90 mV nimmt ab.
3. Die Amplituden der *tail*-Ströme bei 0 mV nehmen ebenfalls ab.

Außerdem ändert sich die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung. Ich werde diese verschiedenen Aspekte im Einzelnen untersuchen.

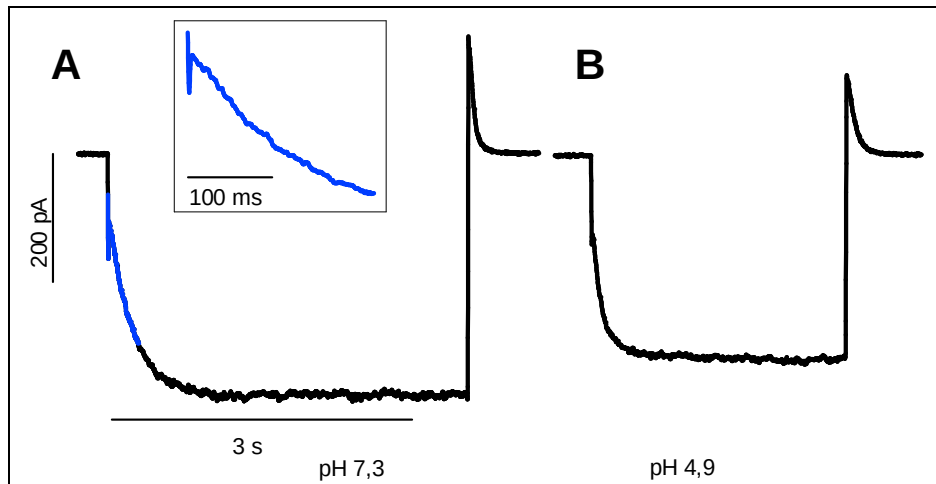


Abbildung 3-1: Stromantworten einer Zelle bei pH 7,3 (A) und pH 4,9 (B). (Haltespannung 0 mV, Testpuls -90 mV). Der Einschub zeigt den sigmoiden Beginn der Aktivierung in einer höheren Zeitauflösung.

3.1.1 Spannungsabhängigkeit der Aktivierung

Abbildung 3-2 zeigt Stromantworten auf Familien von Spannungssprüngen. Das Spannungsprotokoll ist in Abbildung 3-2 A gezeigt. Nach einem Vorpuls auf verschiedene Spannungen springt man auf eine Testspannung von -90 mV, bevor die Zelle wieder auf die Haltespannung von 0 mV gebracht wird. Auch die Ströme bei der Testspannung (siehe Abbildung 3-2, C und E) kann man als *tail*-Ströme bezeichnen. Während der Vorpulse werden HCN-Kanäle aktiviert. Die Dauer des Vorpulses wurde so gewählt, dass dieser Prozess sein Gleichgewicht erreicht. Die Vorpulsspannung bestimmt, welcher Anteil der Kanäle aktiviert wird. Anhand der Amplitude des *tail*-Stroms, unmittelbar nach dem Sprung, kann ermittelt werden, wie groß dieser Anteil ist. Auf diesem Weg wird die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung bestimmt.

Wird der bei der Testspannung bestimmte *tail*-Strom (siehe z.B. Pfeil in Abbildung 3-2 C und E) gegen die Spannung des Vorpulses aufgetragen, so ergeben sich sigmoide Kurven, deren Abszissenlage, Amplitude und Steilheit durch den pH-Wert beeinflusst werden (Symbole in Abbildung 3-3 A). Ansäuern verschiebt die Kurven zu positiveren Spannungen. Außerdem werden die Kurven deutlich flacher.

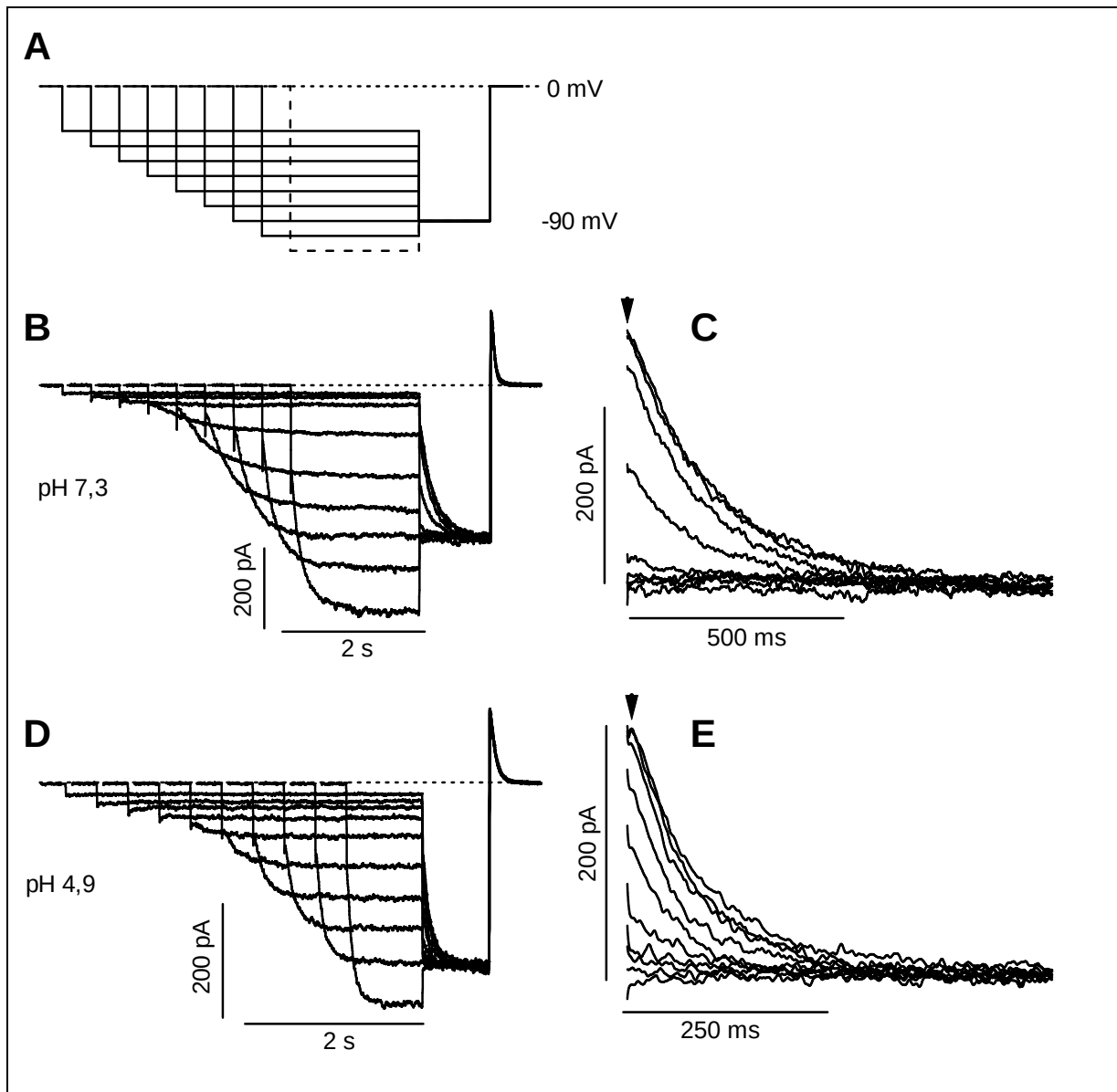


Abbildung 3-2: (A) Spannungsprotokoll. (Haltespannung 0 mV, Vorpulsspannung variiert in Schritten von 10 mV, Testpulsspannung -90 mV). (B-E) Stromantworten einer Zelle auf das angegebene Spannungsprotokoll bei pH 7,3 und pH 4,9. In C und E sind die *tail*-Ströme vergrößert dargestellt. Die Pfeilspitze markiert den Zeitpunkt, an dem die Amplituden der *tail*-Ströme bestimmt wurden (siehe auch Abbildung 3-3 A).

Diese Kurven können gut durch die Boltzmann-Gleichung beschrieben werden (Gleichung 23, siehe durchgehende Kurven in Abbildung 3-3 A).

$$I(V) = I_{\min} + \frac{I_{\max} - I_{\min}}{1 + \exp(zq_e(V_{1/2} - V)/kT)} \quad \text{Gleichung 23}$$

Der Parameter $V_{1/2}$ ist die Spannung, bei der die Amplitude des Stromes ($I - I_{\min}$) 50 % ihres maximalen Wertes ($I_{\max} - I_{\min}$) annimmt. Er wird auch als halbmaximale Aktivierungsspannung bezeichnet. Der Wert des Faktors z bestimmt die Steilheit der Boltzmann-Kurven bei der Spannung $V_{1/2}$. Kleinere Werte von z führen zu flacheren Kurven. Im Zusammenhang mit der

Aktivierung von Ionenkanälen bezeichnet man das Produkt $z \cdot q_e$ auch als apparente *gating*-Ladung. Die Parameter $V_{1/2}$ und z wurden an mehreren Zellen für verschiedene extrazelluläre pH-Werte bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-3 B gegen den pH-Wert aufgetragen. $V_{1/2}$ ist für pH-Werte oberhalb von pH 5,9 konstant. Bei pH 7,3 nimmt $V_{1/2}$ einen Wert von -62 ± 3 mV an ($n = 6$). Unterhalb von pH 5,9 wird $V_{1/2}$ weniger negativ. Die HCN1-Kanäle werden also bereits durch eine weniger starke Hyperpolarisation aktiviert. Bei pH 4,3 beträgt $V_{1/2}$ -27 mV ($n = 2$). Der Faktor z nimmt mit sinkendem extrazellulären pH stetig ab, von $5,1 \pm 0,4$ bei pH 7,3 ($n = 6$) auf 1,9 bei pH 4,3 ($n = 2$). Der Verlauf der pH-Abhängigkeit von $V_{1/2}$ und z zu niedrigen pH-Werten hin ist bei pH 4,3 noch nicht in Sättigung. Leider sind HEK293-Zellen in Lösungen mit noch kleinerem pH-Wert nicht mehr stabil, daher konnten keine saureren Bedingungen getestet werden.

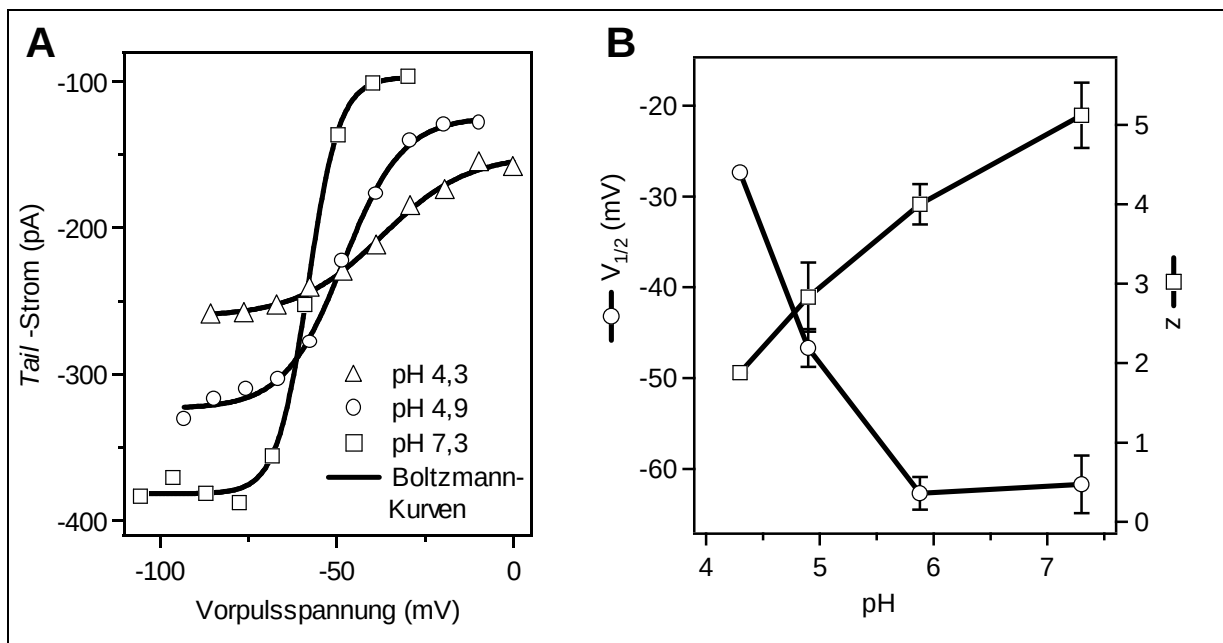


Abbildung 3-3: (A) Spannungsabhängigkeit der HCN1-*tail*-Ströme bei unterschiedlichem pH. Die durchgezogene Linie ist mit der Boltzmann-Gleichung und folgenden Parametern berechnet worden: pH 7,3: $I_{\max} = -97$ pA, $I_{\min} = -382$ pA, $V_{1/2} = -58$ mV, $z = 5,7$; pH 4,9: $I_{\max} = -124$ pA, $I_{\min} = -323$ pA, $V_{1/2} = -48$ mV, $z = 3,0$; pH 4,3: $I_{\max} = -150$ pA, $I_{\min} = -261$ pA, $V_{1/2} = -37$ mV, $z = 2,1$. (B) Einfluss des pH-Wertes auf die Parameter $V_{1/2}$ und z der Boltzmann-Gleichung. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen (pH 7,3 $n = 6$; pH 5,9 $n = 5$; pH 4,9 $n = 4$; pH 4,3 $n = 2$). Für $n < 3$ werden keine Fehlerabschätzungen angegeben.

Aus der Spannungsabhängigkeit der *tail*-Ströme erhält man durch eine Normierung die Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit. Dabei wird angenommen, die maximale Offenwahrscheinlichkeit $P_{O\max}$ sei 1 und die minimale Offenwahrscheinlichkeit $P_{O\min}$ sei 0. Die resultierende Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit P_O ist in Abbildung 3-4 dargestellt.

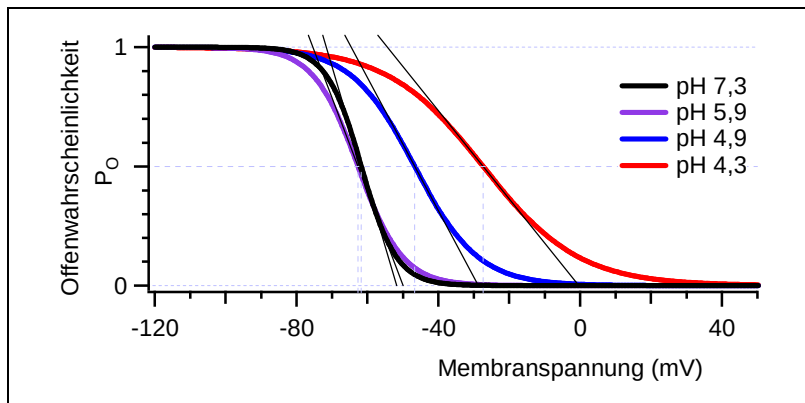


Abbildung 3-4: Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit. Die Kurven wurden mit der Boltzmann-Gleichung (Gleichung 21) und den Parametern z und $V_{1/2}$ berechnet, die in Abbildung 3-3 B dargestellt sind. Die senkrechten gestrichelten Linien deuten die Lage der $V_{1/2}$ -Werte für verschiedenen pH-Werte an. Die durchgezogenen schwarzen Linien sind lineare Anpassungen an die P_O -V-Kurven jeweils im Punkt $V = V_{1/2}$. Ihr Anstieg ist proportional zu z . Der Proportionalitätsfaktor beträgt $-q_e/4kT$. Bei 21°C entspricht das $0,01 \text{ mV}^{-1}$. Ändert sich die Spannung, ausgehend von $V_{1/2}$ um beispielsweise 5 mV , so ergibt das eine Änderung der Offenwahrscheinlichkeit von fast $0,3$ bei pH $7,3$ ($z = 5,7$, damit $\Delta P_O = 5 \text{ mV} \cdot 5,7 \cdot 0,01 \text{ mV}^{-1} = 0,285$), aber nur von $0,1$ bei pH $4,3$ ($z = 2,1$, damit $\Delta P_O = 5 \text{ mV} \cdot 2,1 \cdot 0,01 \text{ mV}^{-1} = 0,105$).

3.1.2 Aktivierungskinetik

Um die Aktivierungskinetik zu bestimmen, wurde die zeitabhängige Aktivierung des HCN-Stromes während des Vorpulses durch eine einfach exponentielle Funktion angepasst. Da der Beginn der Aktivierung sigmoid ist, wurde die Anpassung erst nach einer Verzögerung begonnen. Die Zeitkonstante der angepassten Funktion war vom Startpunkt und von der Dauer des angepassten Bereiches abhängig. Um eine willkürliche Festlegung zu vermeiden wurde Startpunkt und Dauer durch ein festgelegtes Verfahren bestimmt (siehe auch Kapitel 2.3.2).

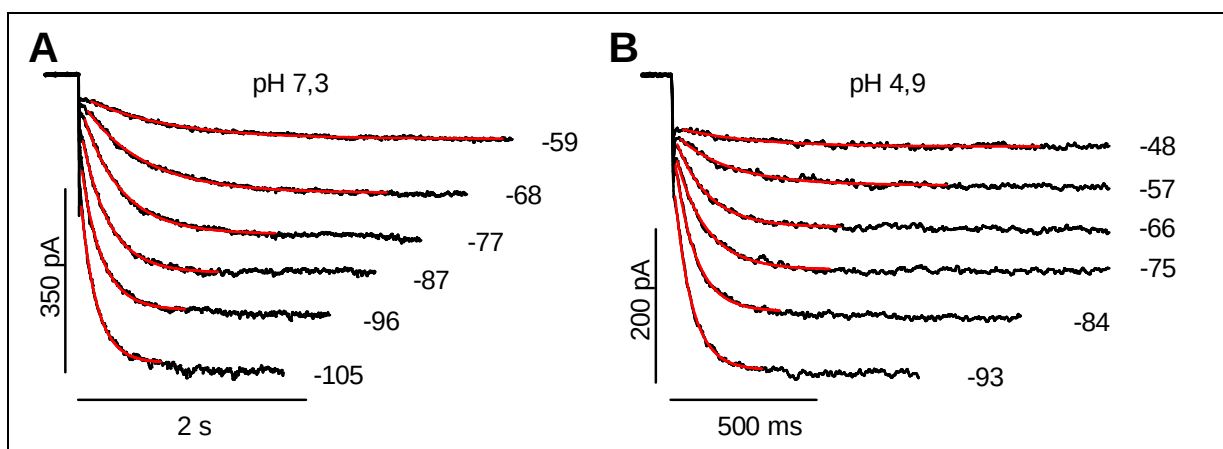


Abbildung 3-5: HCN1-Stromantworten bei pH $7,3$ (A) und bei pH $4,9$ (B). Die Haltespannung betrug 0 mV , rechts neben den Stromspuren ist die Testspannung in mV angegeben. Einfach exponentielle Anpassungen an die Stromkurven sind rot eingezeichnet.

In der Regel wurde die Dauer auf das 5fache der Aktivierungszeitkonstanten eingestellt. Für Spannungen in der Nähe des HCN-Umkehrpotentials (-30 mV) waren die Ströme so klein, dass eine Anpassung nicht möglich war. Ab etwa -50 mV waren die Anpassungen zuverlässig (siehe Abbildung 3-5).

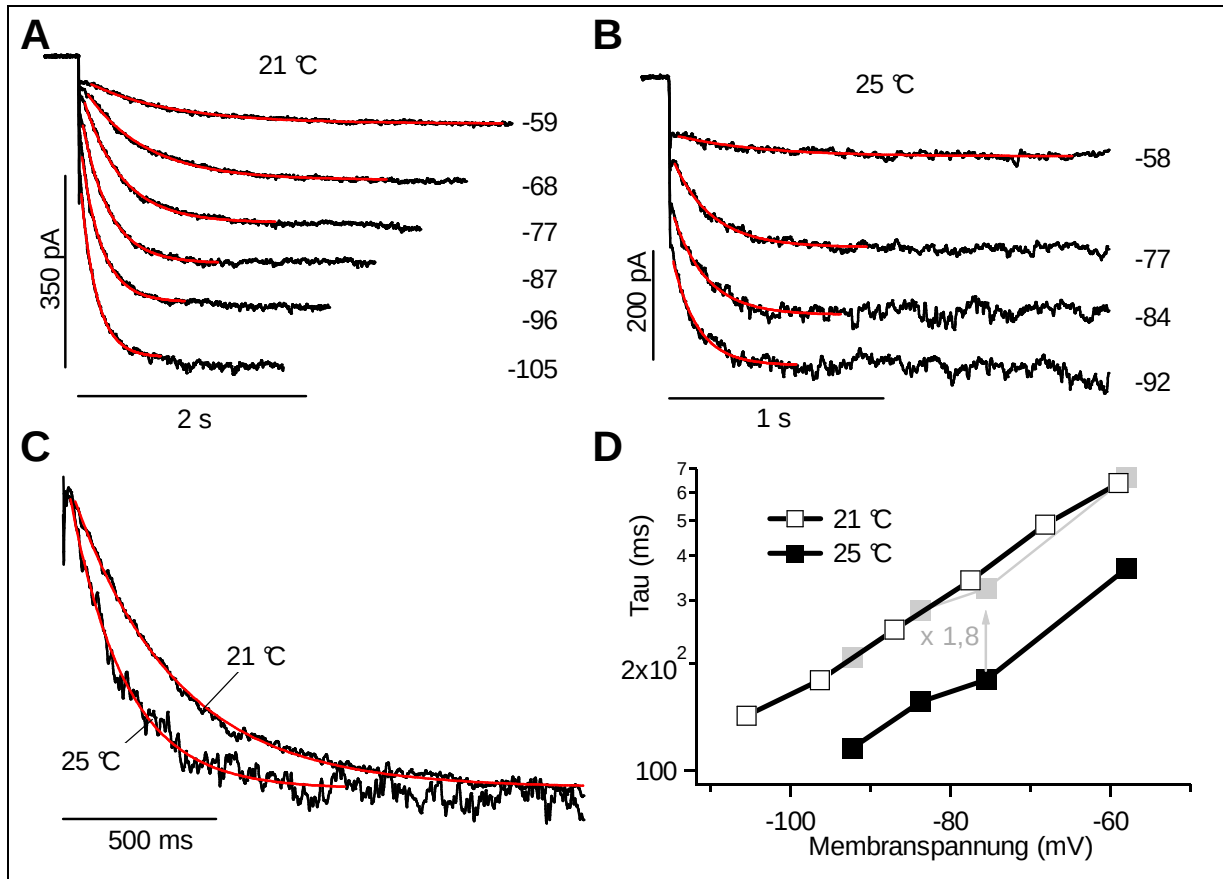


Abbildung 3-6: Stromantworten auf Spannungssprünge bei 21 °C (A) und 25 °C (B). In beiden Experimenten betrug der pH-Wert 7,3. Die Haltespannung betrug 0 mV, rechts neben den Stromspuren ist die Testspannung in mV angegeben. Einfach exponentielle Anpassungen an die Stromkurven sind rot eingezeichnet. (C und D) Temperaturabhängigkeit der Aktivierungskinetik. (C) Die beiden Stromspuren aus den oberen Graphen, die bei -77 mV und 21 bzw. 25 °C aufgenommen wurden, sind so normiert, dass der zeitabhängige HCN1-Strom die gleiche Amplitude hat. Dadurch ist der direkte Vergleich der Aktivierungszeitverläufe möglich. Einfach exponentielle Anpassungen sind rot dargestellt. (D) Die Aktivierungszeitkonstanten der Ströme bei 21 und 25 °C sind über der Testspannung aufgetragen. Multipliziert man die Zeitkonstanten, die bei 25 °C bestimmt wurden, mit 1,8, so ergibt sich die graue Kurve, die praktisch identisch mit der 21 °C-Kurve verläuft.

Die so bestimmten Zeitkonstanten variierten zum Teil sehr stark zwischen unterschiedlichen Experimenten. Es lag die Vermutung nahe, dass unterschiedliche Temperaturen im Labor für diese Variabilität verantwortlich sein könnten. Gerade HCN-Kanäle zeigen eine sehr starke Temperaturabhängigkeit der Aktivierungskinetik (Magee, 1998). Um zu überprüfen, ob Temperatureffekte für die Variabilität der Aktivierungszeitkonstanten verantwortlich sein könnten, wurden HCN1-Ströme bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen (Abbildung

3-6). Die Aktivierungszeitkonstanten τ_{akt} dieser Ströme wurden wie angegeben bestimmt und gegen die Testpulsspannung aufgetragen (Abbildung 3-6 D). In dem halblogarithmischen Diagramm verlaufen die τ_{akt} -Spannungskurven für 21 und 25 °C parallel zueinander. Der Einfluss der Temperatur auf die Aktivierungskinetik kann deshalb durch einen für alle Spannungen konstanten Beschleunigungsfaktor beschrieben werden. In Abbildung 3-6 D ist grau die Kurve eingezeichnet, die sich ergibt, wenn man die Aktivierungszeitkonstanten, die bei 25 °C bestimmt wurden, mit 1,8 multipliziert. Diese Kurve verläuft genau auf der 21 °C Kurve. Eine Erwärmung um 4 K führt demnach fast zu einer Halbierung der Aktivierungszeitkonstanten. Aufgrund dieser Temperaturabhängigkeit können bei der Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Aktivierungskinetik nur Experimente gemittelt werden, die bei gleicher Temperatur durchgeführt wurden. Abbildung 3-7 zeigt gemittelte Aktivierungszeitkonstanten aus zwei Experimenten bei 21 °C.

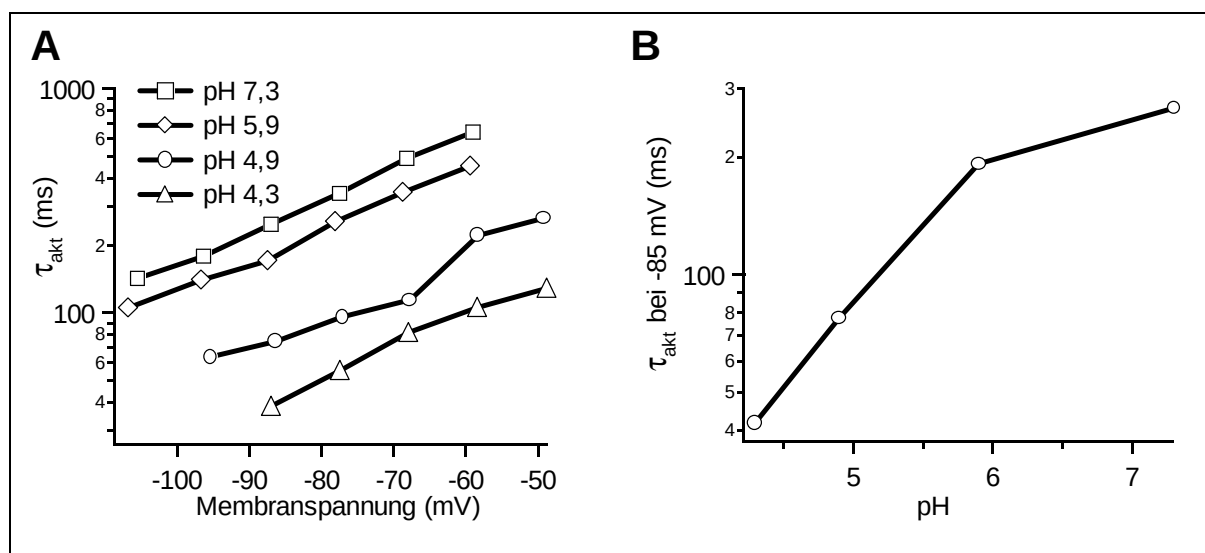


Abbildung 3-7: (A) Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskinetik für verschiedene pH-Werte ($n = 2$). (B) pH-Abhängigkeit der Zeitkonstanten bei -85 mV ($n = 2$). Die Temperatur betrug 21 °C.

Wird τ_{akt} halblogarithmisch über der Spannung aufgetragen, so ergibt sich für einen festen pH-Wert eine annähernd gerade Linie (Abbildung 3-7 A). Die Zeitkonstante ist also in etwa exponentiell von der Membranspannung abhängig. Unter den vorliegenden Bedingungen vergrößert sich τ_{akt} um den Faktor 5, wenn die Membranspannung um 50 mV depolarisiert wird. Um die pH-Abhängigkeit der Aktivierungszeitkonstanten τ_{akt} bei einer festen Spannung zu bestimmen, werden die entsprechenden Werte aus den Daten in Abbildung 3-7 A interpoliert. Die gewählte Spannung muss dazu in dem Spannungsbereich liegen, der durch Messungen bei allen pH-Werten abgedeckt wurde. Die Spannung sollte aber auch möglichst negativ sein. Denn nur bei möglichst vollständiger Aktivierung aller HCN-Kanäle ist τ_{akt} ein

gutes Maß für das Inverse der Aktivierungsrate. Je weniger Kanäle deaktiviert sind, desto kleiner ist der Einfluss der Deaktivierungsrate auf die Zeitkonstante (Gleichung 4.1). In Abbildung 3-7 B ist die pH-Abhängigkeit der Aktivierungszeitkonstanten bei einer Spannung von -85 mV gezeigt. Man beobachtet eine deutliche Abnahme von τ_{akt} mit niedrigem pH. Eine Erhöhung der Protonenkonzentration von pH 7,3 auf pH 4,3 beschleunigt die Aktivierung etwa um den Faktor 6. Eine gleichwertige Beschleunigung würde durch eine Hyperpolarisation der Membranspannung um -55 mV erreicht.

Die Beobachtung, dass man die Aktivierung der Ströme, abgesehen von der sigmoiden Anfangsphase, gut mit einer einfach exponentiellen Funktion beschreiben kann, lässt sich so deuten, dass der Übergang zwischen zwei bestimmten Aktivierungszuständen diesen Vorgang dominiert. In Kapitel 2.2.4 wurde anhand eines kinetischen Modells für HCN-Kanäle beschrieben, dass dies vermutlich der Übergang C4→O4 ist. Es bietet sich damit die Gelegenheit, einen definierten Übergang innerhalb des komplexen Modells anhand seiner Spannungs- und pH-Abhängigkeit genauer zu untersuchen. Wie bereits in Kapitel 2.3.2 erwähnt wurde, kann die Spannungsabhängigkeit der Aktivierungsraten von HCN-Kanälen recht gut durch eine einfach exponentielle Funktion beschrieben werden (Gleichung 22.1). Dabei wird die Aktivierungsrate $\alpha(V)$ durch ein spannungsunabhängige Rate $\alpha_0 = \alpha(V = 0)$ und eine „Schaltladung“ $z_\alpha q_e$ beschrieben. Betrachten wir τ_{akt} in einem Spannungsbereich, in dem die Aktivierungsrate α die Zeitkonstante dominiert, also für sehr große Offenwahrscheinlichkeiten (Gleichung 8.1), dann ist $\tau_{\text{akt}} \approx 1/\alpha$. Unter diesen Bedingungen kann man durch Kurvenanpassung die Parameter α_0 und z_α für verschiedene pH-Werte bestimmen. Dazu wird die Gleichung 22.3 verwendet. In Abbildung 3-8 sind die entsprechenden Anpassungen und die resultierenden Parameter α_0 und z_α dargestellt. Betrachtet man die pH-Abhängigkeit von α_0 und z_α , so fällt auf, dass die gesamte pH-Abhängigkeit von τ_{akt} in α_0 steckt. Der Faktor z_α ist dagegen unabhängig vom pH-Wert (Abbildung 3-8 B). Im Gegensatz dazu war der Wert für z , den man aus der Beschreibung der *tail*-Strom-Amplituden mit der Boltzmann-Gleichung gewonnen hatte, deutlich abhängig vom pH-Wert. In Abbildung 3-8 D wird die pH-Abhängigkeit von z mit der von z_α verglichen. Wie kann man dieses Ergebnis interpretieren? Im Zustandsmodell für HCN-Kanäle (Kapitel 2.2.4) findet die Aktivierung vorwiegend entlang des Pfades C→C1→C2→C3→C4→O4 statt. Bei jedem einzelnen Übergang (C→C1, C1→C2, usw.) wird ein Teil der apparenten *gating*-Ladung im elektrischen Feld über der Membran verschoben. Die Größe $z \cdot q_e$, die die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung beschreibt, gibt an, welche Ladung bei der Aktivierung der

Kanäle im Mittel verschoben wird. Beginnt die Aktivierung für alle Kanäle im Zustand C, so ist $z \cdot q_e$ maximal. Liegen vor der Aktivierung jedoch alle Kanäle im Zustand C4 vor, so wird $z \cdot q_e$ minimal. In diesem Fall beschreibt die Größe $z \cdot q_e$ die apparente *gating*-Ladung des Übergangs $C4 \rightarrow O4$.

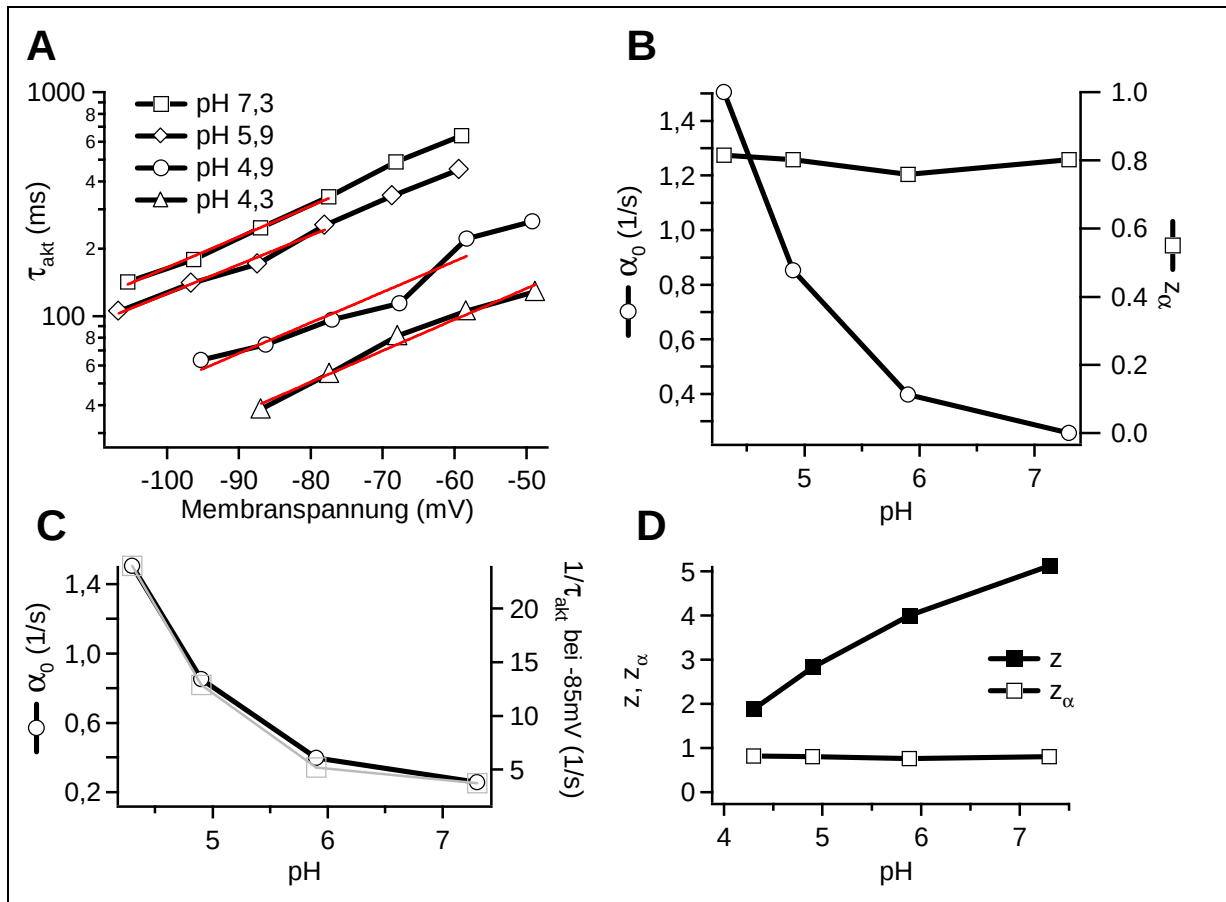


Abbildung 3-8: (A) Spannungsabhängigkeit von τ_{akt} . Anpassungen nach Gleichung 22.3 wurden in einem Spannungsbereich vorgenommen, in dem mehr als 90 % der Kanäle aktiviert waren (siehe auch Abbildung 3-4). Die Anpassungen sind rot eingezeichnet. (B) pH-Abhängigkeit der Parameter α_0 und z_α . Der Parameter z_α ist nicht vom pH-Wert abhängig. (C) Das Inverse der Aktivierungszeitkonstanten bei -85 mV und der Parameter α_0 sind in gleicher Weise vom pH-Wert abhängig.

Um zu beschreiben, welcher Prozess durch die Größe z_α beschrieben wird, teilt man den Übergang $C4 \rightarrow O4$ in zwei Schritte auf. Im ersten Schritt wird aus dem Zustand C4 heraus ein „angeregter“ Übergangszustand X erreicht. Im zweiten Schritt nimmt der Kanal den Zustand O4 ein. Die Kinetik des Überganges $C4 \rightarrow O4$ wird durch τ_{akt} beschrieben. Dieser Parameter ist spannungsabhängig, weil ein Teil der apparenten *gating*-Ladung beim Übergang $C4 \rightarrow X$ im elektrischen Feld verschoben wird. Die Größe $z_\alpha \cdot q_e$ entspricht diesem Anteil. Offenbar wird beim Übergang $C4 \rightarrow X$ immer dieselbe Ladung verschoben, unabhängig vom pH-Wert (siehe Abbildung 3-8 B). Die Ladung $z \cdot q_e$, die während des gesamten Aktivierungsprozesses

verschoben wird, nimmt dagegen zu niedrigen pH-Werten hin ab. Das kann so gedeutet werden, dass die Übergänge in Richtung von C nach C4 nicht nur durch negative Membranspannungen, sondern auch durch die Bindung von Protonen begünstigt werden. Im Rahmen dieser Vorstellung ist z_{α} damit eine untere Grenze für den Wert von z bei sättigenden Protonenkonzentrationen.

3.1.3 Deaktivierungskinetik

Die Deaktivierungskinetik wurde bei einer Spannung von 0 mV untersucht. Die *tail*-Ströme, die während der Deaktivierung nach dem Spannungssprung von –90 mV auf 0 mV aufgenommen wurden, können nach einer ersten Verzögerung durch einfach exponentielle Funktionen angepasst werden (Abbildung 3-9 A). Unterhalb von pH 5,9 nehmen die Zeitkonstanten mit sinkendem extrazellulären pH-Wert ab (Abbildung 3-9 B). Eine Erhöhung der Protonenkonzentration von pH 7,3 auf pH 4,3 verzögert die Deaktivierung etwa um den Faktor 3. Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik sind damit entgegengesetzt vom extrazellulären pH-Wert abhängig (siehe auch Abbildung 3-13 A).

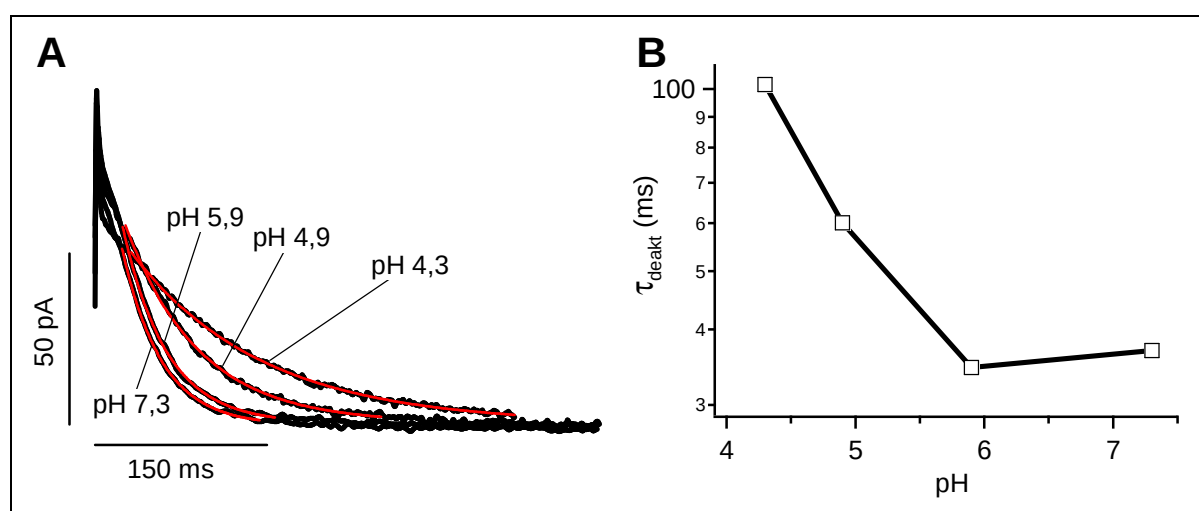


Abbildung 3-9: (A) *tail*-Ströme, nach einem Sprung von –90 auf 0 mV. Alle Aufnahmen stammen von einer Zelle. Der pH-Wert der extrazellulären Lösung ist angegeben. Nach einem sigmoiden Beginn können die *tail*-Ströme durch einfach exponentielle Funktionen beschrieben werden (rot). (B) pH-Abhängigkeit der Deaktivierungskinetik. Die Deaktivierungszeitkonstanten wurden über dem pH-Wert aufgetragen ($n = 2$).

3.1.4 Reversibilität

An dieser Stelle wird untersucht, ob die Veränderungen der Kanaleigenschaften durch Protonen reversibel sind. Damit zeitabhängige Veränderungen das Ergebnis nicht beeinflussen, wurden die Lösungen innerhalb weniger Sekunden gewechselt. Dazu wurde ein Perfusionssystem aus 2 dünnen Glasfiberröhrchen eingesetzt. Jeweils eine Lösung strömte aus dem entsprechenden Röhrchen direkt über die Zelle. Der andere Zufluss wurde unterbrochen. Dadurch konnte die extrazelluläre Lösung in weniger als 2 s ausgetauscht werden. Außerdem

wurde ein Spannungsprotokoll mit relativ kurzen Pulsen eingesetzt. Als Testspannung wurde die Haltespannung gewählt, dadurch ist der Kanal am Ende des Testpulses bereits wieder deaktiviert und der nächste Vorpuls kann unmittelbar angeschlossen werden. Durch die relativ kurzen Pulse erreicht der Strom während des Vorpulses bei pH 7,3 seinen Gleichgewichtswert nicht. Die Analyse der *tail*-Ströme gibt deshalb die Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit nicht ganz korrekt wieder. Das spielt bei der Untersuchung der Reversibilität aber keine Rolle. Abbildung 3-10 zeigt Stromantworten, die in pH 7,3, dann in pH 4,3 und wieder in pH 7,3 aufgenommen wurden.

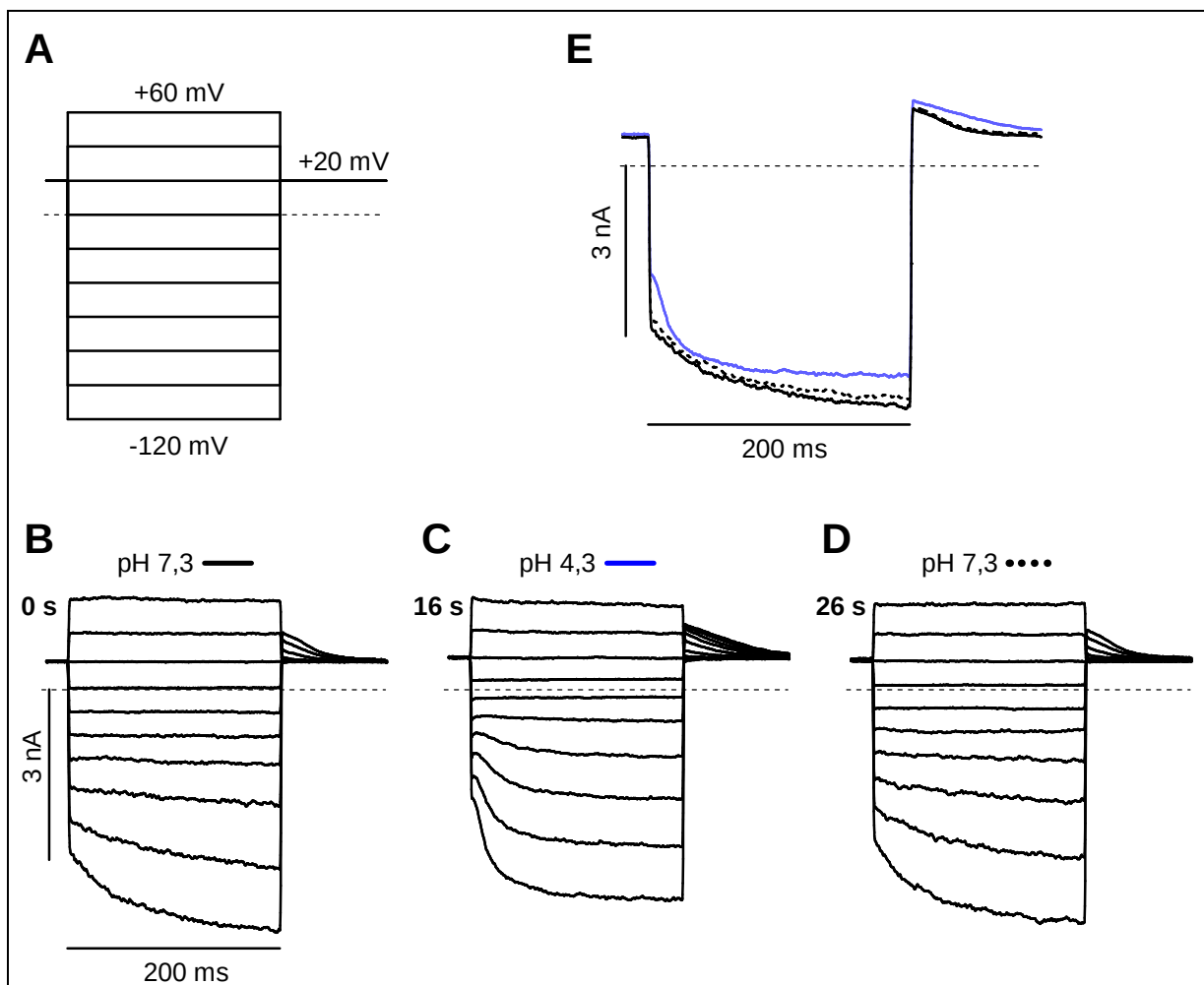


Abbildung 3-10: (A) Spannungsprotokoll. (B-D) Stromantworten auf das Spannungsprotokoll. Zunächst wurde die links dargestellten Stromspuren bei pH 7,3 aufgenommen, anschließend wurde der extrazelluläre pH-Wert auf 4,3 gesenkt und etwa 5 s später wurden die in der Mitte dargestellten Stromableitungen aufgenommen. Nach dem Wechsel zur ursprünglichen Lösung mit pH 7,3 wurden die rechts dargestellten Ableitungen aufgenommen. Über den Stromspuren ist jeweils der pH-Wert angegeben und die Linienart, die zur Darstellung von Stromspuren oder abgeleiteten Größen verwendet wird (siehe E und Abbildung 3-11). (E) Überlagerung der Stromantworten auf den Spannungssprung zu -120 mV.

In Abbildung 3-10 B-D ist zu erkennen, dass HCN1 bei pH 4,3 schneller aktiviert und langsamer deaktiviert als bei pH 7,3. Das wird in der Überlagerung der Stromantworten auf den Sprung zu -120 mV noch deutlicher (Abbildung 3-10 E). Hier ist auch gut zu erkennen, dass bei pH 4,3 die Amplitude der Ströme am Ende des Vorpulses kleiner ist, als in pH 7,3. Würde das Gleichgewicht der Aktivierung auch bei pH 7,3 erreicht, wäre die Differenz der Amplituden noch etwas größer. Die Kurven, die vor dem Wechsel auf pH 4,3 (schwarz durchgezogen) und nach dem Spülen (schwarz durchbrochen) aufgenommen wurden, verlaufen fast gleich. Ich schließe daraus, dass die Beschleunigung der Aktivierung und die Reduktion der Maximalamplitude reversibel sind. In Abbildung 3-11 ist dargestellt, wie sich die Aktivierungszeitkonstante und die Spannungsabhängigkeit des *tail*-Stromes im Verlauf des Experimentes ändern.

Auch wenn die saure Lösung für längere Zeiten appliziert wird, sind die Effekte auf die Spannungsabhängigkeit und Kinetik der Aktivierung weitgehend reversibel. Die Amplituden nehmen jedoch, abhängig von der Zeit und vom pH-Wert stetig und irreversibel ab. Das wird im nächsten Kapitel gezeigt.

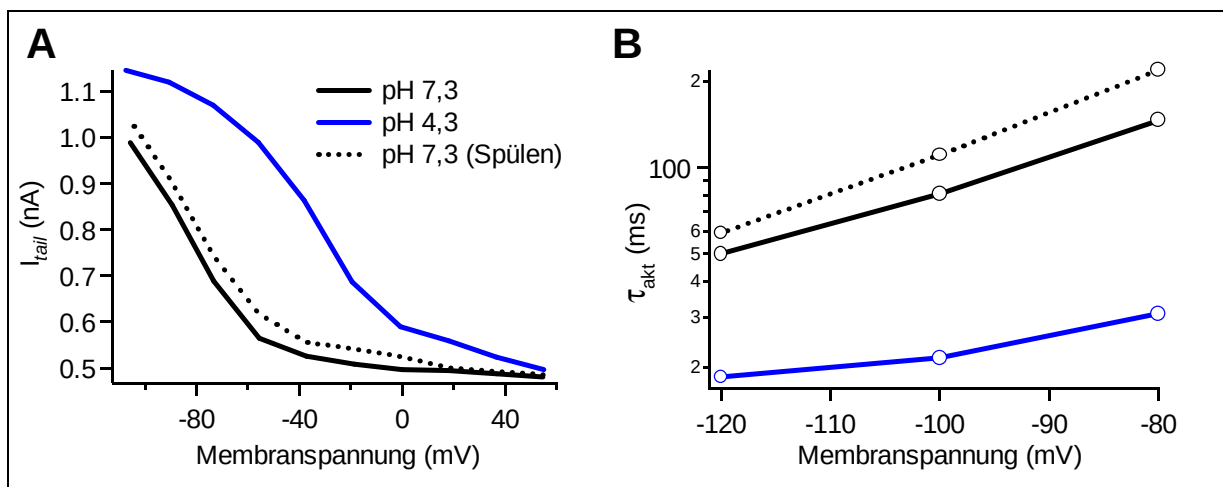


Abbildung 3-11: Spannungsabhängigkeit der *tail*-Ströme (A) und der Aktivierungszeitkonstanten (E) Nach dem Wechsel auf pH 4,3 (blau) ändert sich die Spannungsabhängigkeit der *tail*-Ströme und die Kinetik der Aktivierung. Wird der ursprüngliche pH-Wert wieder eingestellt (durchbrochene Linie), nehmen auch die Parameter ihre Ausgangswerte wieder an. Der Einfluss der Protonen auf beide Parameter ist weitgehend reversibel.

3.1.5 Amplituden

Im Verlauf eines Ganzzell-Experimentes nimmt die Amplitude des Stromes durch HCN1-Kanäle ab. Eine solche Abnahme der Stromamplituden mit der Zeit ist auch für andere Ionenkanäle beschrieben. Als eine mögliche Ursache diskutiert man das Auswaschen zytosolischer Komponenten, die für die Funktion der Kanäle wichtig sind.

Als Maß für die Amplitude des zeitabhängigen HCN1-Stromes wird die maximale Amplitude ($I_{\max}-I_{\min}$ in Gleichung 23) des *tail*-Stromes gewählt (siehe Abbildung 3-3 A). Dieses Maß eignet sich, weil es nicht durch den Leckstrom beeinflusst wird. In Abbildung 3-12 ist für ein typisches Experiment der Verlauf dieser maximale Amplitude des *tail*-Stromes über der Zeit aufgetragen. Der pH-Wert der extrazellulären Lösung ist angegeben. Von kleinen Schwankungen abgesehen, nimmt die maximale Amplitude des *tail*-Stromes stetig ab. Bei saurem pH ($\text{pH} < 6$) schien dieser Vorgang etwas schneller abzulaufen. Er war nicht reversibel. Die Tendenz einer schnelleren Abnahme bei pH-Werten unterhalb von 6 war bei allen Experimenten zu erkennen. Darüber hinaus variierten Ausmaß und Geschwindigkeit der Amplitudenabnahme stark zwischen unterschiedlichen Experimenten. Eine Systematik konnte nicht gefunden werden.

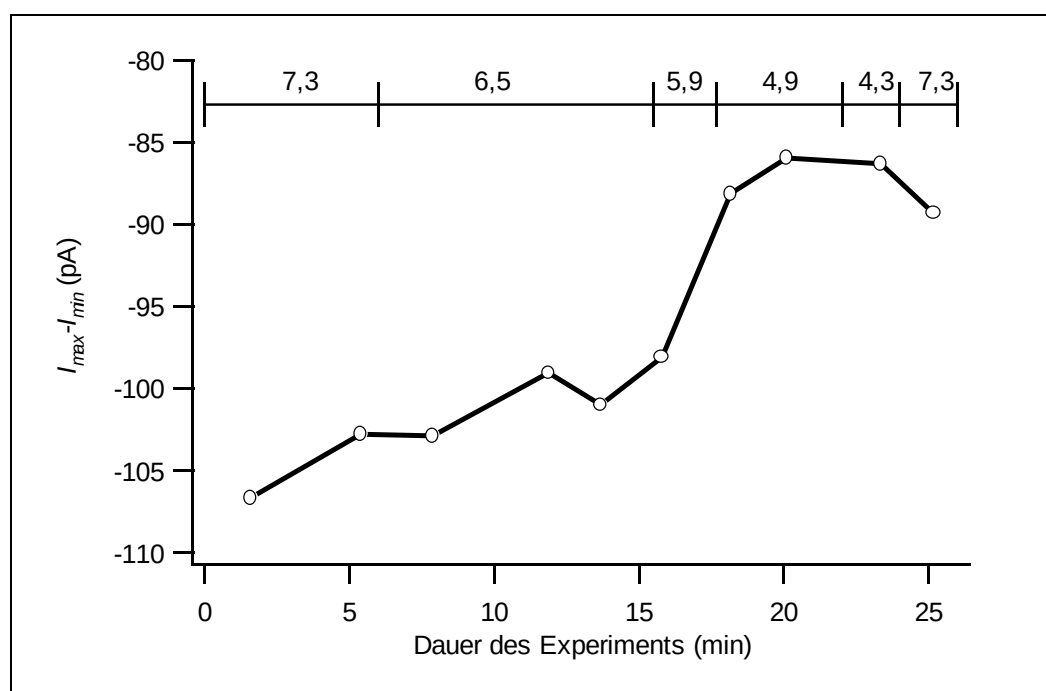


Abbildung 3-12: Verlauf der maximalen Amplitude des *tail*-Stromes ($I_{\max}-I_{\min}$ in Gleichung 23). Die Werte stammen von einem Ganzzell-Experiment. Die Abszisse markiert die Zeit, die nach dem Durchbrechen der Zellmembran verstrich. Während des Experimentes wurden extrazelluläre Lösungen mit verschiedenen pH-Werten verwendet. Am oberen Rand der Abbildung ist der Wechsel des pH-Wertes angegeben.

3.1.6 Abschätzung des pK_s der protonierbaren Gruppen

Protonen und andere Kationen können die Schalteigenschaften von Ionenkanälen auf zweierlei Weise beeinflussen. Zum einen schirmen sie negative Oberflächenladungen am Kanal oder in dessen Umgebung ab. Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Ladungen, die ganz oder teilweise über die Lösung hinweg stattfinden, werden abgeschwächt. Für die Stärke der Abschwächung spielt lediglich die Konzentration und die Valenz der Ionen eine Rolle, nicht aber die Spezies – Abschirmung ist unspezifisch (Hille 2001). Zum anderen können Kationen an spezifischen Bindestellen von Ionenkanälen binden. Bei der Bindung von Kationen wird die Oberflächenladung selbst geändert. Das elektrostatische Potential der Kationen überlagert sich mit dem elektrostatischen Potential der negativen Bindestellen. Die Wechselwirkung mit anderen Ladungen wird auch dann abgeschwächt, wenn sie nicht über die Lösung hinweg stattfindet. Die Bindung der Ionen ist spezifisch. Für die Stärke dieses Effektes ist die Spezies der Ionen entscheidend. An HCN-Kanälen wurde kein spezifischer Effekt von Ca^{2+} - oder Mg^{2+} -Ionen beobachtet (Chen et al., 2001, Henrikson et al. 2002; Malcolm et al., 2002). Mg^{2+} -Ionen schirmen lediglich Oberflächenladungen ab. Wird in Abwesenheit anderer divalenter Kationen die Konzentration extrazellulärer Mg^{2+} -Ionen von 3 mM auf 30 mM erhöht, so verschiebt sich $V_{1/2}$ bei HCN1 lediglich um +9 mV (Henrikson et al. 2002). Aus zweierlei Gründen schirmen divalente Kationen negative Ladungen wesentlich effektiver ab als monovalente Kationen.

1. Divalente Kationen reichern sich in der Umgebung negativer Oberflächenladungen - verglichen mit ihrer Konzentration in freier Lösung - deutlich stärker an, als monovalente Ionen.
2. Die Stärke der Abschirmung wächst etwa mit der Valenz und mit der Wurzel der Ionenkonzentration.

Am HCN1-Kanal hat die Erhöhung der Protonenkonzentration von 0,05 μ M (pH 7,3) auf 50 μ M (pH 4,3) einen starken Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit und Kinetik der Aktivierung. Wie erwähnt, könnten diese Effekte als eine Verschiebung der effektiven Membranspannung um +40 bis + 55 mV interpretiert werden. Ein Vergleich mit dem Effekt von 30 mM Mg^{2+} zeigt, dass der Einfluss der Protonen nicht durch das unspezifische Abschirmen von negativen Oberflächenladungen erklärt werden kann. Vielmehr kann man davon ausgehen, dass Protonen spezifisch an protonierbare Gruppen binden.

Eine protonierbare Gruppen lässt sich durch ihren pK_s -Wert charakterisieren. Es handelt sich dabei um den pH-Wert, bei dem die Gruppe mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% protoniert vorliegt. An dieser Stelle werden zunächst apparente pK_s -Werte für die pH-Abhängigkeit von

τ_{deakt} , τ_{akt} , z und $V_{1/2}$ bestimmt bzw. abgeschätzt. Dazu wird die pH-Abhängigkeit dieser Parameter durch eine Hill-Gleichung (Gleichung 24) beschrieben.

$$A(pH) = A_S + \frac{(A_B - A_S)}{1 + (K_S/[H^+])^r} \quad \text{Gleichung 24}$$

Die Größe A steht hier stellvertretend für die untersuchten Parameter τ_{akt} , τ_{deakt} , z und $V_{1/2}$. A_S und A_B kennzeichnen die Werte, die in Sättigung bei sehr sauren und sehr basischen extrazellulären Lösungen erreicht werden. Der Mittelwert $(A_S + A_B)/2$ wird bei einem pH-Wert von pK_S angenommen. Der so genannte „Hill-Koeffizient“ r beschreibt die Steilheit der Kurve. Ein größeres r führt zu einer steileren Kurve. Mit Hilfe des Parameters r können auch Aussagen über die Stöchiometrie der Bindungsreaktion getroffen werden. Hill-Funktionen werden unter anderem genutzt, um zu beschreiben, wie sich Eigenschaften von Proteinen in Abhängigkeit von der Konzentration eines Bindungspartners ändern.

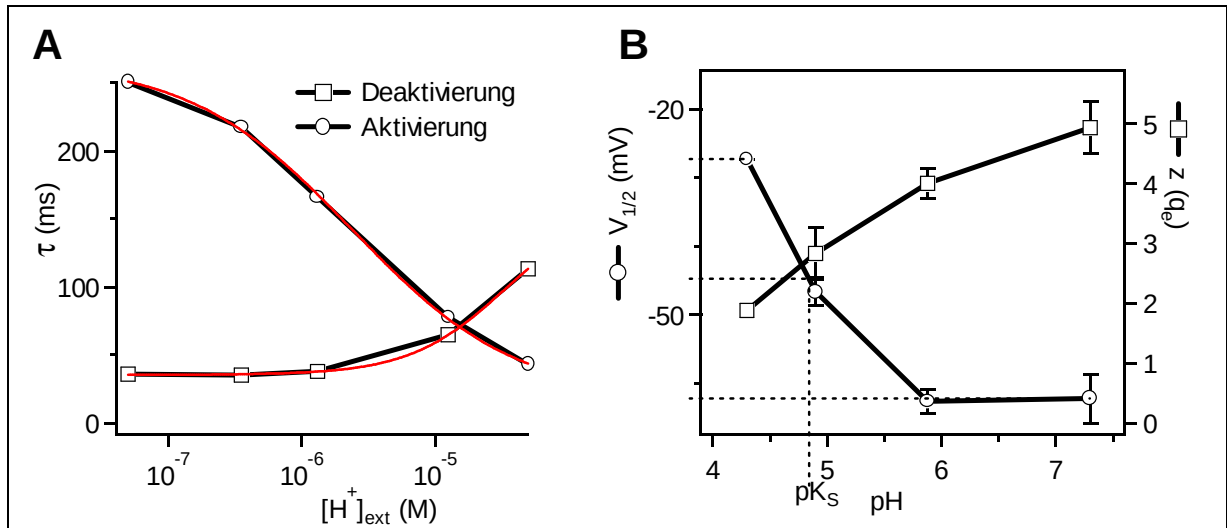


Abbildung 3-13: (A) pH-Abhängigkeit von τ_{akt} und τ_{deakt} bei einem einzelnen Experiment. Die Zeitkonstante der Aktivierung bei -88 mV und die Zeitkonstante der Deaktivierung bei 0 mV sind über der Protonenkonzentration aufgetragen. Die pH-Abhängigkeit von τ_{akt} kann durch eine Hill-Funktionen beschrieben werden. (B) pH-Abhängigkeit von $V_{1/2}$ und z . (übernommen von Abbildung 3-3 B) Die gestrichelten Linien deuten an, wie aus der pH-Abhängigkeit von τ_{deakt} eine Obergrenze für pK_S abgeschätzt wird (siehe Text).

Eine Anpassung der pH-Abhängigkeit von τ_{akt} durch eine Hill-Funktion ergibt einen pK_S -Wert von $5,6$ (Abbildung 3-13 A). Die Parameter der Hill-Funktion sind: $A_S = 17 \pm 11$ ms; $A_B = 270 \pm 7$ ms; $r = 0,7 \pm 0,1$; $K_S = 2,4 \cdot 10^{-6} \pm 4 \cdot 10^{-7}$ M ($pK_S = 5,6 \pm 0,07$).

Die pH-Abhängigkeit der Aktivierungszeitkonstanten zeigt sowohl zu sauren, als auch zu basischen Werten hin ein Sättigungsverhalten (Abbildung 3-13 A). Im Gegensatz dazu zeigen die Werte für τ_{deakt} , z und $V_{1/2}$ keine Sättigung zu kleinen pH-Werten hin. Dadurch lassen sich die Parameter A_S , r und pK_S weniger genau bestimmen. Für τ_{deakt} ergab sich ein pK_S -Wert von

$4,6 \pm 0,3$. Der für die Kurvenanpassungen verwendete Levenberg-Marquard-Algorithmus konvergierte nicht für die pH-Abhängigkeit von z und $V_{1/2}$. Aber auch für diese pH-Abhängigkeiten kann ein Näherungswert für pK_S abgeschätzt werden. Die Abschätzung wird im Folgenden am Beispiel von $V_{1/2}$ erklärt.

Der bei pH 7,3 bestimmte Wert ($V_{1/2} = -62$ mV) dient als Abschätzung für A_B . Der entsprechende Wert bei pH 4,3 ($V_{1/2} = -27$ mV) stellt eine untere Grenze für A_S dar. Damit ist der pH-Wert, bei dem $V_{1/2} (-62 + -22)/2 = -42$ mV beträgt, eine obere Grenze für pK_S . Aus Abbildung 3-13 liest man dafür einen pH-Wert von 4,8 ab. Analog erhält man aus der pH-Abhängigkeit von z eine Obergrenze für pK_S von 5,4.

Man erhält also aus der pH-Abhängigkeit unterschiedlicher Parameter unterschiedliche Bereiche, für die entsprechenden pK_S -Werte. Das kann darauf hindeuten, dass mehrere Gruppen titriert werden, die unterschiedliche apparente pK_S -Werte haben. Es gibt aber auch andere Erklärungen. Da die Messungen nicht die Titration direkt beobachten, sondern nur nachfolgende Veränderungen, kann die Titration einer Gruppe unterschiedliche pH-Abhängigkeiten bei unterschiedlichen gemessenen Parametern hervorrufen. Ein Beispiel am Modell $C=O$ soll dies verdeutlichen. Würde beim Modell $C=O$ durch die Titration einer Gruppe mit $pK_S = 5,4$ der Parameter z von 5 auf 1 reduziert, dann würde sich nicht nur z , sondern nach Gleichung 11 auch $V_{1/2}$ ändern. Weil $V_{1/2}$ proportional zu $1/z$ ist, wäre der apparente pK_S -Wert für $V_{1/2}$ anders als der apparente pK_S -Wert für z . Es ergibt sich $pK_S(V_{1/2}) = 4,7$. Die etwas unterschiedlichen Bereiche der pK_S -Werte für $V_{1/2}$ und z lassen sich also, zumindest beim einfachen $C=O$ -Modell, erklären, ohne die Titration mehrerer verschiedener Gruppen vorauszusetzen.

3.2 Einfluss von Protonen auf HCN1-Mutanten

Extrazelluläre Protonen beschleunigen die Aktivierung, verzögern die Deaktivierung und verschieben die Spannungsabhängigkeit von HCN1-Kanälen. Im letzten Kapitel wurde erläutert, dass wahrscheinlich die Titration protonierbarer Gruppen am Kanalprotein diesen Veränderungen zugrunde liegt.

Um herauszufinden, durch welchen Mechanismus die Protonen die Kanaleigenschaften ändern, ist es wichtig, den Protonensensor - also die Bindungsstelle(n) für Protonen - zu finden. Dazu wurde zunächst eine Liste aller in Frage kommenden Aminosäuren zusammengestellt. Folgende Informationen wurden berücksichtigt:

1. Aus den pH-Abhängigkeit der Parameter τ_{akt} , τ_{deakt} , z und $V_{1/2}$ lassen sich apparente pK_S -Werte abschätzen, die alle unterhalb von 5,7 liegen. Sollten sich diese Parameter aufgrund der Titration protonierbarer Gruppen verändern, so ist es wahrscheinlich, dass auch der apparente pK_S -Wert dieser Gruppen unterhalb von 5,7 liegt.

In freier Lösung haben die Seitengruppen von 2 der 20 Aminosäuren einen pK_S -Wert unterhalb von 5,7. Es handelt sich dabei um Glutaminsäure ($pK_S = 4,25$) und Asparaginsäure ($pK_S = 3,65$), unprotoniert sind sie negativ geladen. Die angegebenen pK_S -Werte wurden in freier Lösung gemessen. Da der Wert stark von den elektrostatischen Eigenschaften der Umgebung abhängt, kann er im Protein anders sein als in Lösung.

2. Intrazelluläre Protonen spielen keine Rolle für die beobachteten Effekte.

Zong und Mitarbeiter (2001) konnten zeigen, dass intrazelluläre Protonen am HCN-Kanal binden können. Dadurch wird die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung verstärkt und zu negativeren Werten verschoben. Als Bindestelle wurde ein Histidin am intrazellulären Ende des Spannungsfühlermotivs in S4 identifiziert. Sein apparenter pK_S -Wert beträgt 7,6. Demgegenüber führt die Erhöhung der extrazellulären Protonenkonzentration zu einer Rechtsverschiebung der Aktivierungskurve. Außerdem sind die verschiedenen Effekte quantitativ verschieden. Während die Titration der intrazellulären Seite zu einer Verschiebung von etwa 20 mV führt, ist $V_{1/2}$ durch extrazelluläre Protonen um bis zu 35 mV verschoben. Die Effekte sind also quantitativ und qualitativ (Richtung der Verschiebung) verschieden. Daher kann ausgeschlossen werden, dass der Effekt extrazellulärer Protonen durch eine indirekte Erhöhung der intrazellulären Protonenkonzentration zustande kommt. Der gesuchte Protonensensor muss also für extrazelluläre Protonen zugänglich sein. An HCN-Kanälen und verwandten K^+ -Kanälen wurden umfangreiche Studien zur Zugänglichkeit von Aminosäuren

durchgeführt. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass alle extrazellulär gelegenen Aminosäuren zugänglich sind. Es handelt sich dabei um die Aminosäuren in den Linker-Domänen zwischen S1 und S2, S3 und S4, S5 und Pore und Pore und S6 (siehe Abbildung 3-14 oben und gepunktete Bereiche in Abbildung 3-14 B). Aber auch innerhalb der Transmembransegmente befinden sich Aminosäuren, die extrazellulär zugänglich sind. Hier kann die Zugänglichkeit vom Aktivierungszustand des Ionenkanals abhängen (Männikkö et al., 2002; Bell et al., 2004; Vemana et al., 2004).

3. Die Eigenschaften von hHCN1, hHCN2, hHCN4 und dmHCN werden in ähnlicher Weise durch Protonen verändert (R. Seifert, persönliche Information; Stevens et al., 2001).

Da vier eng miteinander verwandte HCN-Kanäle auf ähnliche Weise durch Protonen beeinflusst werden, ist es wahrscheinlich, dass bei allen vier Kanälen der gleiche Mechanismus zugrunde liegt. Unter dieser Annahme kann die Zahl der möglichen Protonensensoren durch eine Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen weiter eingegrenzt werden. Nur solche Aminosäuren, die in allen erwähnten Kanälen an vergleichbaren Positionen auftreten, kommen als Protonensensor in Frage.

Folgende Schlussfolgerung kann man aus den angestellten Überlegungen ziehen: Mögliche Protonensensoren im HCN-Kanal sind vermutlich Asparagin- und/oder Glutaminsäuren, die zwischen HCN1,2,4 und DmHCN konserviert sind, und die sich in den Transmembransegmenten oder im extrazellulären Proteinbereich befinden. Im Sequenzvergleich in Abbildung 3-14 B sind die betreffenden Kandidaten rot und fett eingezeichnet.

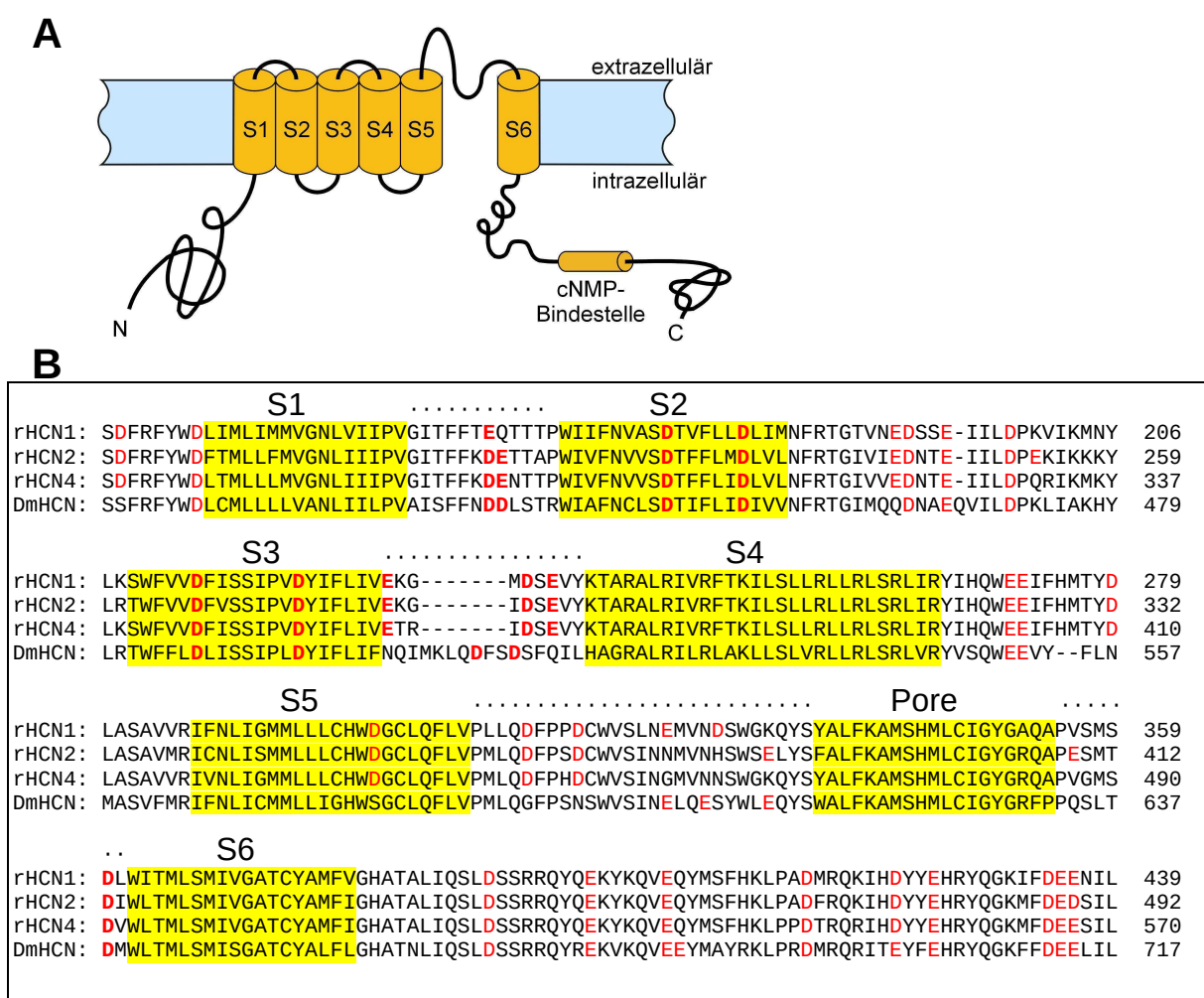


Abbildung 3-14: (A) Schematische Darstellung der Struktur einer HCN-Kanaluntereinheit. Die Transmembransegmente sind als Tonnen dargestellt und mit S1-S6 bezeichnet. (B) Der zentrale Bereich von HCN1, HCN2, HCN4 und DmHCN im Sequenzvergleich. Transmembransegmente sind gelb hinterlegt, extrazelluläre Abschnitte durch Punkte über den Sequenzen markiert. Aminosäuren sind mit dem Einbuchstaben-Code eingetragen. Glutaminsäure (E) und Asparaginsäure (D) sind rot hervorgehoben. Davon sind diejenigen fett gedruckt, welche in allen vier Kanälen konserviert und möglicherweise für extrazelluläre Protonen zugänglich sind. In HCN1 handelt es sich dabei um 9 Aminosäuren (siehe Text).

Im HCN1-Kanal gibt es 3 Glutaminsäuren (E158, E229 und E235) und 6 Asparaginsäuren (D172, D178, D214, D222, D233 und D360) die in Frage kommen. Diese Aminosäuren wurden durch gezielte Mutagenese gegen andere Aminosäuren ausgetauscht. Das Ziel des Aminosäureaustausches war, eine nicht protonierbare Aminosäure, oder wo das nicht toleriert wurde, eine Aminosäure mit anderem pK_s -Wert einzuführen. Die Struktur des Proteins sollte dabei möglichst wenig gestört werden. Aus diesem Grund wurde Glutaminsäure gegen Glutamin ausgetauscht und Asparaginsäure gegen Asparagin. In der Seitenketten der Aminosäuren ersetzt dabei jeweils eine Aminogruppe die Carboxylgruppe der Säure. Die resultierende Aminosäure (N oder Q) kann zwischen pH 3 und pH 12 nicht protoniert werden

(Stryer, 1988). Der Austausch erhält die Größe der Seitenkette weitgehend, man bezeichnet ihn auch als einen konservativen Austausch.

Aminosäureaustausch	Funktionell
E158 → Q	+
D172 → N/V/E	—
D178 → E	—
D214 → E	—
D222 → N/F/E	—
E229Q+D233N+E235Q	+
D360 → N	—

Tabelle 3-1: Zusammenstellung der Aminosäureaustausche an potentiellen Protonensensoren des HCN1. Viele dieser Aminosäureaustausche führen zum Verlust jeglicher Kanalfunktion (siehe zweiten Spalte).

An einigen der oben erwähnten Positionen wurden bereits von einer anderen Arbeitsgruppe Mutationsstudien durchgeführt. Chen und Mitarbeiter (2001) neutralisierten geladene Aminosäuren in HCN2. Unter anderem wurden die Asparaginsäuren in S2 und S3, die homolog zu D172, D178, D214 und D222 in HCN1 sind, durch Glutamin ersetzt. Jeder einzelne Aminosäureaustausch führte zum Verlust der Kanalfunktion. Die Autoren konnten zeigen, dass bei einigen dieser Mutanten der Transport des Proteins in die Plasmamembran nicht mehr funktioniert. Die molekularen Ursachen für diesen Defekt sind aber unklar. Die Erwartung lag nahe, dass die entsprechenden Aminosäureaustausche in HCN1 auch zu nicht-funktionellen Kanälen führen. Daher wurden D172, D178, D214 und D222 durch Glutaminsäure ersetzt. Die Ladung bleibt in diesen Fällen erhalten, die Seitenkette wird lediglich um eine CH₂-Gruppe verlängert. Sollte eine dieser Asparaginsäuren ein Teil des Protonensensors des Wildtypkanals sein, würde man in der Mutante eine veränderte pH-Abhängigkeit erwarten. Darüber hinaus wurden noch die Aminosäureaustausche D172V und D222F untersucht. Diese Austausche führten an homologen Aminosäurepositionen im spannungsabhängigen EAG-Kanal zu funktionellen Kanälen. In Tabelle 3-1 sind die Aminosäureaustausche aufgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht worden sind. Nur bei zwei der untersuchten Mutanten wurden Ströme mit HCN-charakteristischen Eigenschaften gefunden (siehe 2. Spalte in Tabelle 3-1). Im folgenden werden diese Mutanten im Einzelnen beschrieben.

3.2.1 HCN1-E158Q

Die Glutaminsäure an Position 158 des HCN1-Kanals befindet sich im extrazellulären Proteinabschnitt zwischen S1 zu S2 (siehe Abbildung 3-14 B). Sie wurde durch Glutamin ersetzt.

Von HEK293-Zellen, die mit HCN1-E158Q transfiziert worden waren, konnten robuste Ströme mit einer HCN-typischen Aktivierung abgeleitet werden (siehe Abbildung 3-15). Wie bei der Untersuchung von Wildtyp-HCN1 wurde für die Experimente ein Spannungsprotokoll mit variablem Vorpuls und festem Testpuls verwendet (Abbildung 3-15 A). Nach einem Sprung auf Spannungen unterhalb von etwa -40 mV aktivierte der Strom zeitabhängig (siehe Abbildung 3-15 C und E). Der Sprung von der Vorpulsspannung zur Testspannung von -90 mV führte zu *tail*-Strömen (siehe Abbildung 3-15 D und F). Springt man von der Testpulsspannung (-90 mV) zurück auf die Haltespannung von 0 mV, misst man transiente *tail*-Ströme, die den Verlauf der Deaktivierung widerspiegeln (siehe auch Abbildung 3-16 D).

Der E158Q-Kanal unterscheidet sich in diesen Eigenschaften qualitativ nicht vom Wildtyp-Kanal. Zur Bestimmung der Spannungs- und pH-Abhängigkeit der Aktivierung und Deaktivierung können deshalb die gleichen Methoden eingesetzt werden, wie sie im Kapitel 3.1 beschrieben wurden. Das heißt, die Spannungsabhängigkeit der Amplitude der *tail*-Ströme wurde durch die Boltzmann-Gleichung (Gleichung 23) beschrieben. Die Stromableitungen während des Vorpulses und nach dem Sprung von der Testspannung zur Haltespannung wurden durch einfach exponentielle Funktionen angepasst.

Spannungsabhängigkeit der Aktivierung

Die Spannungsabhängigkeit der *tail*-Ströme konnte gut durch die Boltzmann-Gleichung (Gleichung 23) beschrieben werden (durchgezogene Linien in Abbildung 3-15 B, siehe auch Legende der Abbildung). In neutralem pH beträgt $V_{1/2}$ bei der Mutante HCN1-E158Q -72 mV. Dieser Wert ist 10 mV negativer als beim Wildtyp. Beim Ansäuern von pH $7,3$ auf pH $4,9$ ändert sich $V_{1/2}$ um $+14$ mV auf -58 mV. Der Parameter z sinkt dabei von $4,5$ auf $2,6$. Die Änderungen von $V_{1/2}$ und z durch das Ansäuern sind damit ähnlich wie die, die beim Wildtyp gemessen wurden: $+15$ mV für $V_{1/2}$ und $-2,3$ für z .

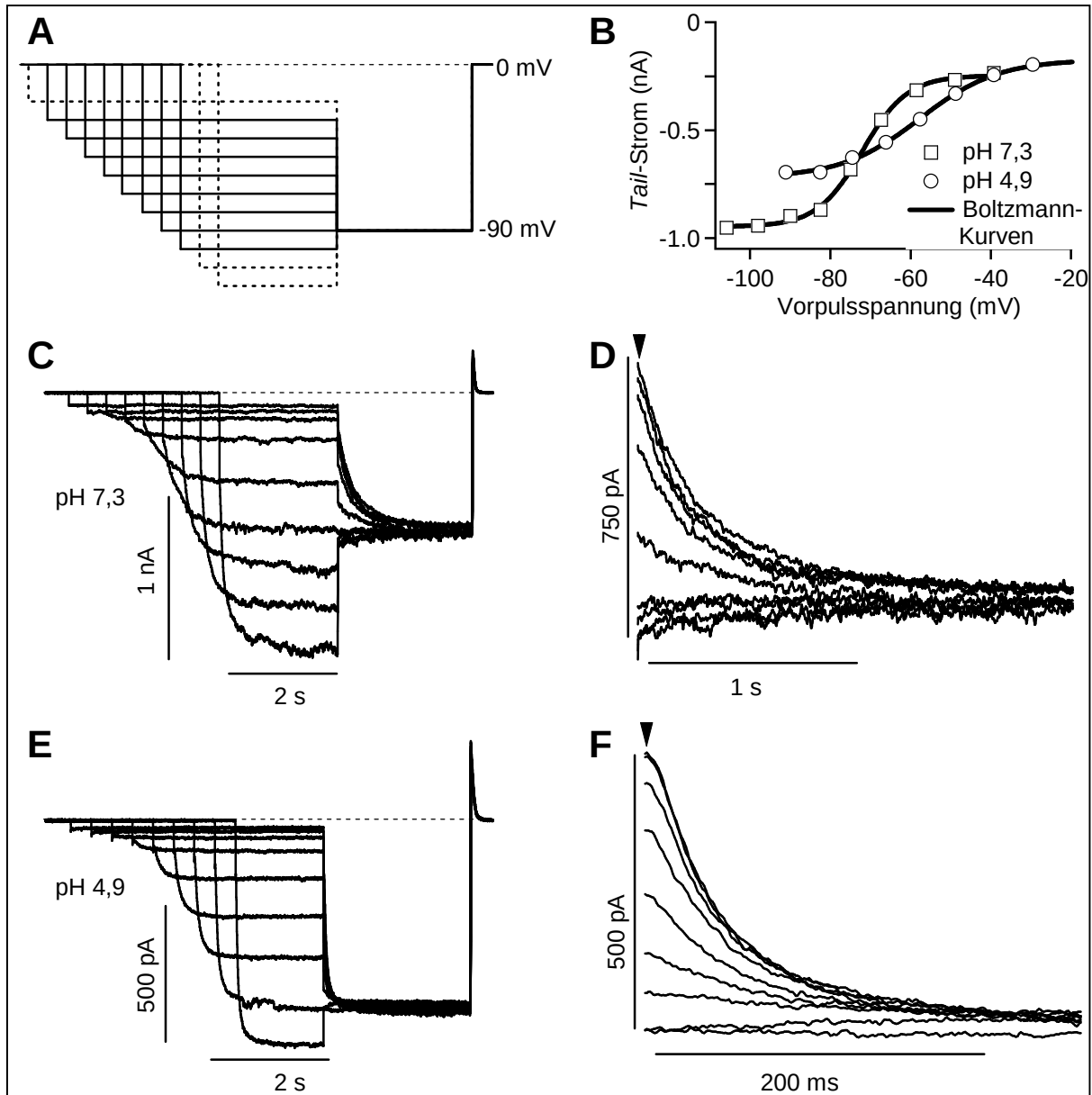


Abbildung 3-15: (A) Spannungsprotokoll. Haltespannung 0 mV, Vorpulsspannung variierte in Schritten von 10 mV, Testpulsspannung -90 mV. (C und E) Stromantworten auf das angegebene Spannungsprotokoll, gemessen an einer Zelle, die HCN1-E158Q Kanäle exprimierte. Der pH-Wert der extrazellulären Lösung betrug pH 7,3 (C und D) und pH 4,9 (E und F). In D und F sind die *tail*-Ströme vergrößert und mit höherer Zeitauflösung dargestellt. Die Pfeilspitze markiert den Zeitpunkt, an dem die Amplituden der *tail*-Ströme bestimmt wurden. (B) Spannungsabhängigkeit der *tail*-Ströme. Die durchgezogene Linie ist mit der Boltzmann-Gleichung (Gleichung 23) und folgenden Parametern berechnet worden: pH 7,3: $I_{\max} = -247$ pA, $I_{\min} = -947$ pA, $V_{1/2} = -72,1$ mV, $z = 4,5$; pH 4,9: $I_{\max} = -173$ pA, $I_{\min} = -719$ pA, $V_{1/2} = -57,7$ mV, $z = 2,6$.

Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik

Die Zeitkonstanten τ_{akt} und τ_{deakt} wurden durch die Kurvenanpassung einfach exponentieller Funktionen an die Stromableitungen bestimmt. Mit abnehmendem pH-Wert wurden die Werte für τ_{akt} kleiner, während die Werte für τ_{deakt} anstiegen. Wie Abbildung 3-16 C zeigt, war die

Aktivierungszeitkonstante exponentiell von der Spannung abhängig. Wird dieser Zusammenhang mit Gleichung 22.3 beschrieben, so ergibt sich sowohl bei pH 7,3 als auch bei pH 4,9 für den Parameter z_α ein Wert von 1. Ebenso wie beim Wildtyp steckt die gesamte pH-Abhängigkeit von τ_{akt} im Parameter α_0 . Sein Wert ändert sich von 0,09 bei pH 7,3 auf 0,8 bei pH 4,9. Bei pH 7,3 und -91 mV beträgt τ_{akt} 250 ms, bei pH 4,9 nur noch 34 ms. Das Ansäuern verringert τ_{akt} also um den Faktor 7,3 - deutlich mehr als beim Wildtyp (Faktor 3). Gleichzeitig wächst τ_{deakt} um den Faktor 1,5 (siehe Abbildung 3-16 D und Legende).

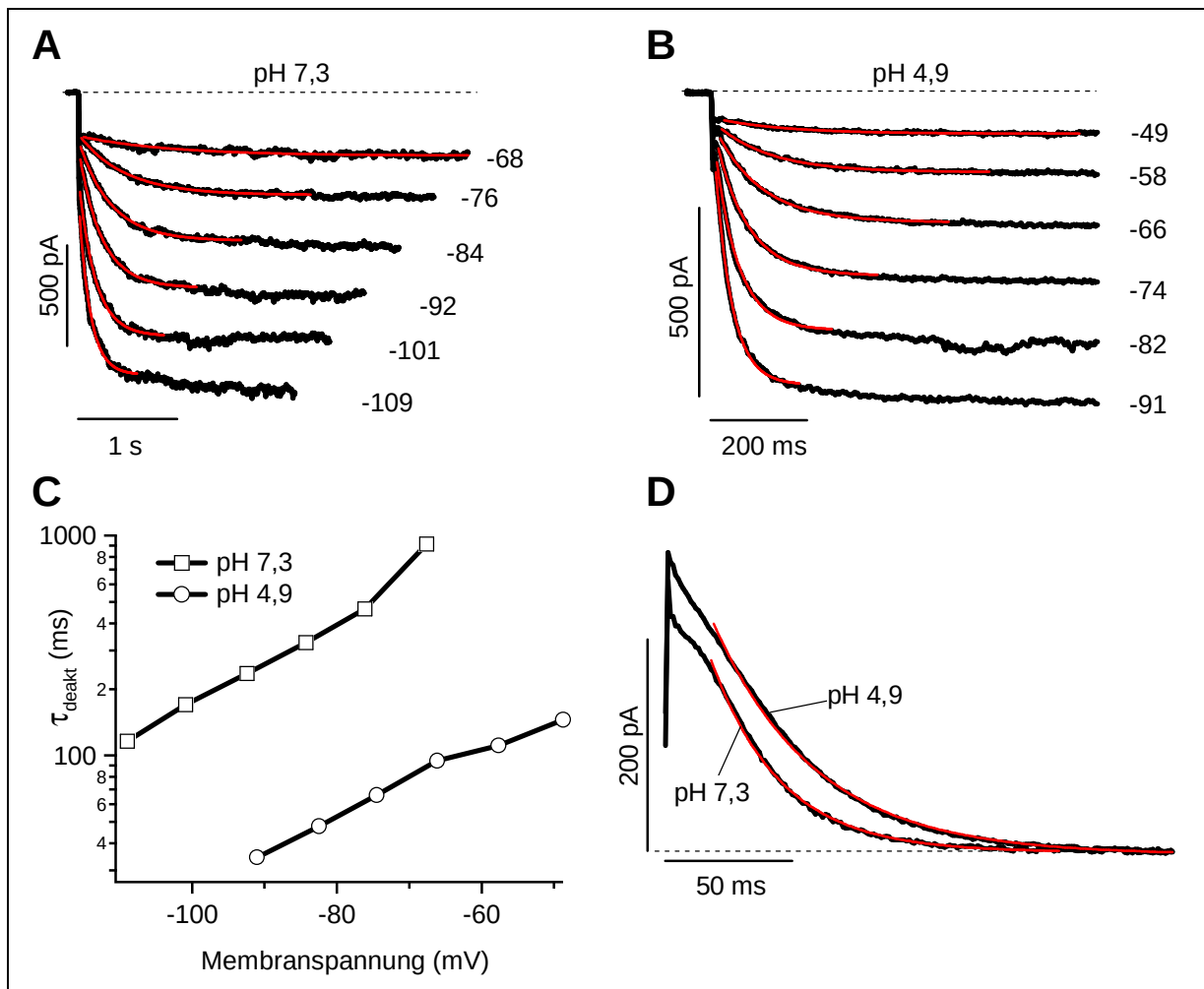


Abbildung 3-16: HCN1-E158Q-Stromantworten, bei pH 7,3 (A) und bei pH 4,9 (B). Die Haltespannung betrug 0 mV, rechts neben den Stromspuren ist die Testspannung in mV angegeben. Die Stromableitungen wurden bei 21 bis 22 °C aufgenommen. Einfach exponentielle Anpassungen an die Stromkurven sind rot eingezeichnet. (C) Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskinetik für pH 7,3 und pH 4,9. (D) *Tail*-Ströme, nach einem Sprung von -90 mV auf 0 mV in pH 7,3 und pH 4,9. Nach einem sigmoiden Beginn können die *tail*-Ströme durch einfach exponentielle Funktionen beschrieben werden (rot). Der Wert der Zeitkonstante τ_{deakt} beträgt 27 ms bei pH 7,3 und 40 ms bei pH 4,9.

pH	$V_{1/2}$ (mV)		z		z_{α}		α_0 (1/s)		τ_{akt} (ms) (-90 mV)		τ_{deakt} (ms) (0 mV)	
	7,3	4,9	7,3	4,9	7,3	4,9	7,3	4,9	7,3	4,9	7,3	4,9
HCN1-wt	-62	-47	5,1	2,8	0,8	0,8	0,26	0,85	226	70	37	60
HCN1-E158Q	-72	-58	4,5	2,6	1,0	1,0	0,09	0,8	263	36	27	40

Tabelle 3-2: Zusammenstellung der Parameter $V_{1/2}$, z , τ_{akt} , τ_{deakt} , α_0 und z_{α} für HCN1-Wildtyp und HCN1-E158Q.

	$\Delta V_{1/2}$ (mV)	Δz	Δz_{α}	α_0 (pH 4,9)/ α_0 (pH 7,3)	τ_{akt} (pH 4,9)/ τ_{akt} (pH 7,3)	τ_{deakt} (pH 4,9)/ τ_{deakt} (pH 7,3)
HCN1-wt	+15	-2,3	0	3,3	0,31	1,62
HCN1-E158Q	+14	-1,9	0	8,9	0,14	1,48

Tabelle 3-3: pH-Abhängigkeit der Parameter. Um den Einfluss des pH-Wertes zu bestimmen, wurden für die Parameter der Spannungsabhängigkeit die absoluten Verschiebungen ($V_{1/2}(\text{pH } 4,9) - V_{1/2}(\text{pH } 7,3)$), für Zeitkonstanten und Aktivierungsraten α_0 die relativen Änderungen ($\tau(\text{pH } 4,9) / \tau(\text{pH } 7,3)$) berechnet.

Anhand der Gegenüberstellung in Tabelle 3-3 wird deutlich, dass auch die Eigenschaften der Mutante HCN1-E158Q stark durch Protonen beeinflusst werden. Die Glutaminsäure an Position 158 ist damit nicht der gesuchte Protonensensor.

3.2.2 HCN1-QNQ (E229Q/D233N/E235Q)

Die drei negativ geladenen Aminosäuren im extrazellulären Proteinbereich zwischen S3 zu S4 wurden gegen neutrale Aminosäuren ausgetauscht. Dabei wurde jeweils eine Glutaminsäure durch Glutamin und eine Asparaginsäure durch Asparagin ersetzt.

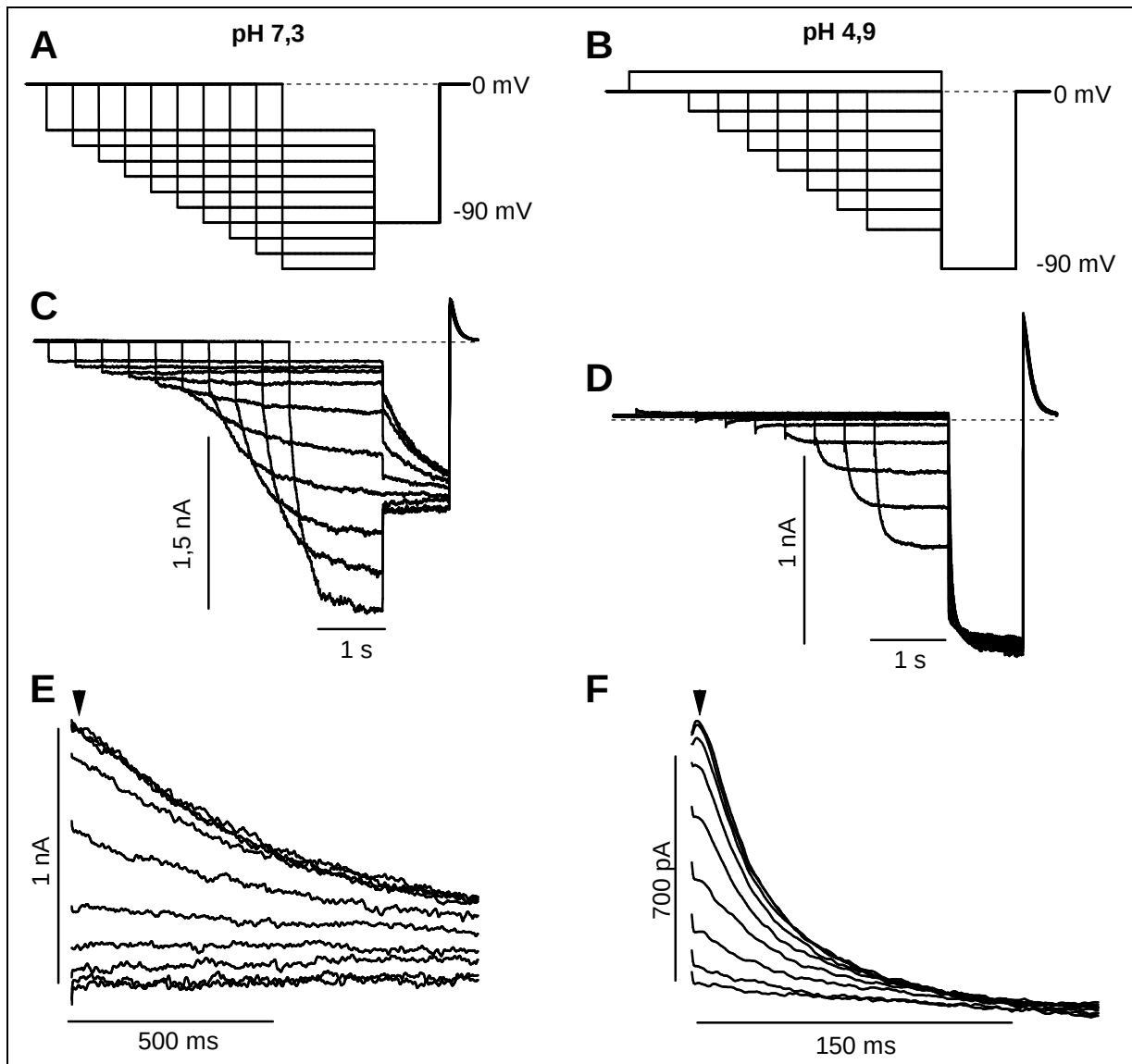


Abbildung 3-17: (A und B) Spannungsprotokolle bei pH 7,3 (A) und pH 4,9 (B) (Haltespannung 0 mV, Vorpulsspannung variiert in Schritten von 10 mV, Testpulsspannung -90 mV). (C und D) Stromantworten auf die angegebenen Spannungsprotokolle, gemessen an einer Zelle, die HCN1-QNQ-Kanäle exprimierte. (E und F) *Tail*-Ströme in höherer Zeitauflösung. Die Pfeilspitze markiert den Zeitpunkt, an dem die Amplituden der *tail*-Ströme bestimmt wurden (siehe auch Abbildung 3-18).

Von HEK293-Zellen, die mit HCN1-QNQ transfiziert waren, konnten robuste Ströme mit einer HCN-typischen Aktivierung abgeleitet werden (siehe Abbildung 3-17). Wieder wurde ein Spannungsprotokoll mit variablem Vorpuls und festem Testpuls verwendet (Abbildung 3-17 A und B). Die Stromantworten auf das Spannungsprotokoll sind denen des Wildtyp-

kanals sehr ähnlich und können mit denselben Methoden charakterisiert werden (siehe Kapitel 3.1).

Spannungsabhängigkeit der Aktivierung

In Abbildung 3-18 ist die Amplitude der *tail*-Ströme über der Vorpulsspannung aufgetragen, die entsprechenden Kurvenanpassungen mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung (Gleichung 23) sind als durchgezogene Linien eingetragen (Abbildung 3-18). Die Spannungsabhängigkeit verschiebt sich beim Ansäuern von pH 7,3 auf pH 4,9 zu positiveren Spannungen, im Mittel ($n = 4$) ändert sich $V_{1/2}$ von -61 ± 5 mV auf -36 ± 2 mV. HCN1-QNQ hat also bei neutralen pH praktisch denselben $V_{1/2}$ -Wert wie der Wildtyp. Bei der Mutante wird $V_{1/2}$ durch eine Absenkung des pH-Wertes auf 4,9 allerdings deutlich stärker verschoben (+25 mV) als beim Wildtyp (+15 mV). Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung nimmt durch das Ansäuern ab, der Parameter z sinkt von 4,4 auf 2,5.

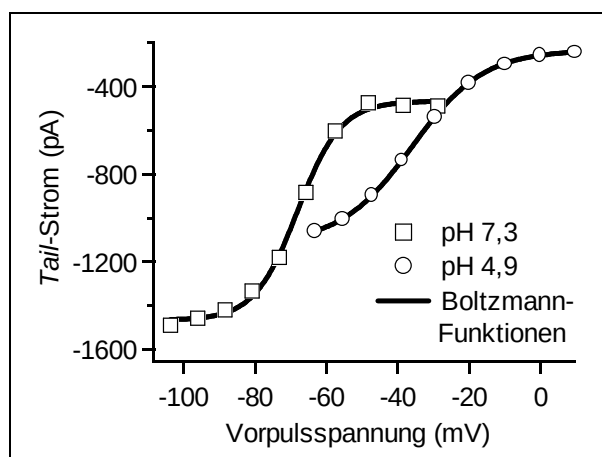


Abbildung 3-18: Spannungsabhängigkeit der *tail*-Ströme von HCN1-QNQ. Die durchgezogene Linie ist mit der Boltzmann-Gleichung (Gleichung 23) und folgenden Parametern berechnet worden: pH 7,3: $I_{\max} = -467$ pA, $I_{\min} = -1467$ pA, $V_{1/2} = -68,0$ mV, $z = 4,2$; pH 4,9: $I_{\max} = -234$ pA, $I_{\min} = -1114$ pA, $V_{1/2} = -35,6$ mV, $z = 2,5$.

Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik

Die einfach exponentiellen Anpassungen, mit denen τ_{akt} und τ_{deakt} bestimmt wurden, sind in Abbildung 3-19 A und B dargestellt. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierungszeitkonstanten ist in Abbildung 3-19 C dargestellt. In der halblogarithmischen Auftragung ergeben sich gerade τ_{akt} -V-Kurven, deren Anstieg bei pH 4,9 deutlich geringer ist als bei pH 7,3. Dadurch ist z_{α} bei HCN1-QNQ vom pH-Wert abhängig, anders als beim Wildtyp und HCN1-E158Q. Der Wert von z_{α} fällt von 1,2 bei pH 7,3 auf 0,7 bei pH 4,9. Auch der Parameter α_0 ändert sich mit dem pH-Wert. Sein Wert steigt beim Ansäuern um den Faktor 100. Diese Änderung ist um ein Vielfaches größer, als beim Wildtyp. Der Parameter τ_{akt} , gemessen bei -90 mV, ist weniger stark vom pH-Wert abhängig als α_0 . Beim Ansäuern sinkt τ_{akt} um den

Faktor 15. Auch diese Änderung ist deutlich größer, als bei Wildtyp (siehe auch Tabellen 3-2 und 3-3). Obwohl die Mutante HCN1-QNQ bei neutralem pH langsamer aktiviert als der HCN1-Wildtyp, führt die starke pH-Abhängigkeit von τ_{akt} dazu, dass die Mutante bei pH 4,9 schneller aktiviert, als der HCN1-Wildtyp bei pH 4,3. Die Deaktivierung verläuft dagegen bei allen pH-Werten langsamer, als beim Wildtyp. Der Wert von τ_{deakt} beträgt 90 ms bei pH 7,3 und 113 ms bei pH 4,9 (siehe Abbildung 3-19 D und Legende). HCN1-QNQ deaktiviert damit nur etwa halb so schnell, wie der HCN1-Wildtyp.

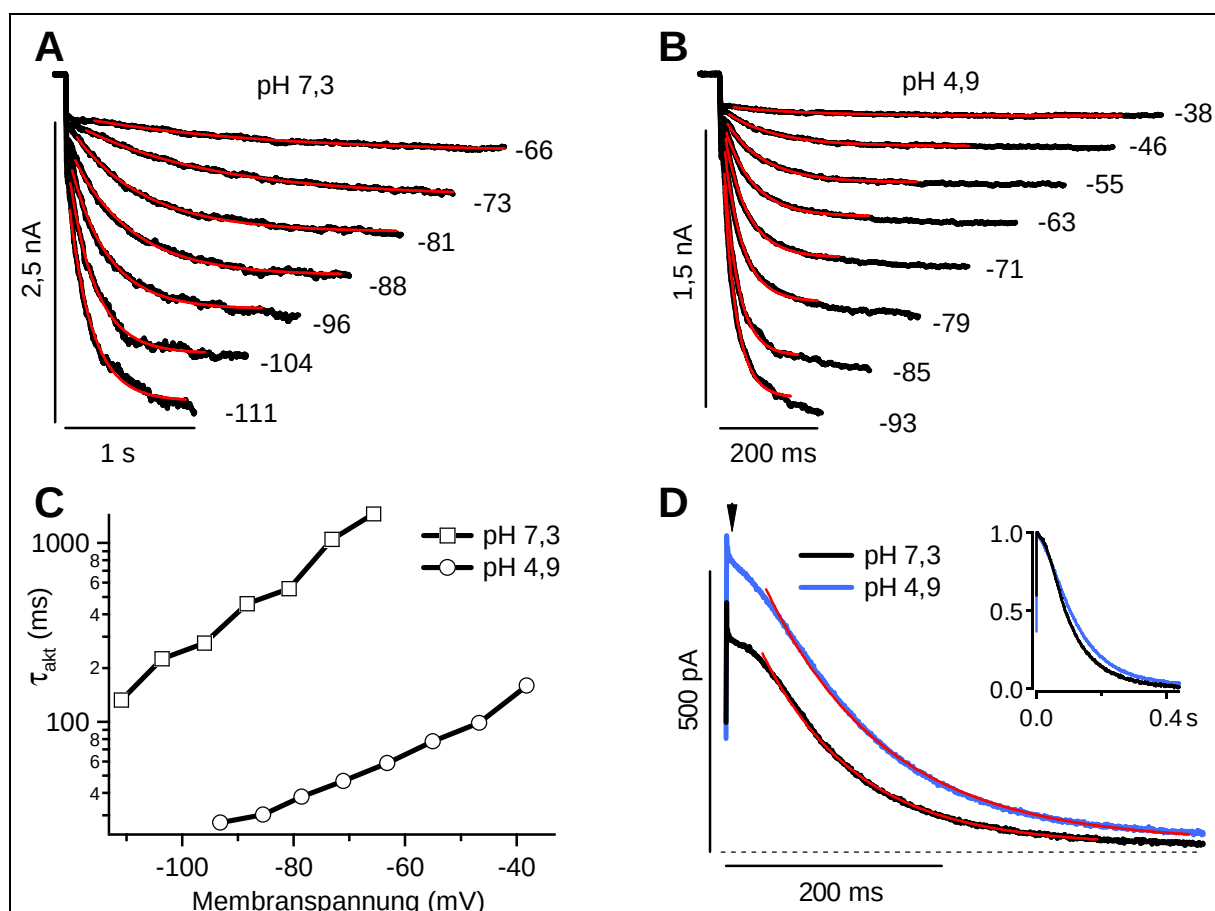


Abbildung 3-19: HCN1-QNQ-Stromantworten, bei pH 7,3 (A) und bei pH 4,9 (B). Die Haltespannung betrug 0 mV, rechts neben den Stromspuren ist die Testspannung in mV angegeben. Die Stromableitungen wurden bei 21 bis 22 °C aufgenommen. Einfach exponentielle Anpassungen an die Stromkurven sind rot eingezeichnet. (C) Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskinetik für pH 7,3 und pH 4,9. (D) *tail*-Ströme, nach einem Sprung von -90 mV auf 0 mV in pH 7,3 und pH 4,9. Nach einem sigmoiden Beginn können die *tail*-Ströme durch einfach exponentielle Funktionen beschrieben werden (rot). Der Wert der Zeitkonstante τ_{deakt} ist 90 ms bei pH 7,3 und 113 ms bei pH 4,9. Der Einschub zeigt normierte Kurven, an denen die geringen Unterschiede der Deaktivierungskinetik deutlich werden. Die maximale Amplitude des *tail*-Stromes wurde dazu nach dem Abklingen des kapazitiven Transienten bestimmt (Pfeilspitze) und auf 1 normiert.

In der Tabelle 3-4 sind alle Parameter zusammengestellt, die am Wildtyp und an der Mutante HCN1-QNQ bei pH 7,3 und pH 4,9 bestimmt wurden. Die Unterschiede zwischen den Werten bei pH 7,3 und den Werten bei pH 4,9 sind in Tabelle 3-5 angegeben.

pH	$V_{1/2}$ (mV)		z		z_{α}		α_0 (1/s)		τ_{akt} (ms) (-90 mV)		τ_{deakt} (ms) (0 mV)	
	7,3	4,9	7,3	4,9	7,3	4,9	7,3	4,9	7,3	4,9	7,3	4,9
HCN1-wt	-62	-47	5,1	2,8	0,8	0,8	0,26	0,85	226	70	37	60
HCN1-QNQ	-61	-36	4,4	2,5	1,3	0,7	0,03	3	419	29	90	113

Tabelle 3-4: Zusammenstellung der Parameter $V_{1/2}$, z , τ_{akt} , τ_{deakt} , α_0 und z_{α} für HCN1-Wildtyp und HCN1-QNQ

	$\Delta V_{1/2}$ (mV)	Δz	Δz_{α}	α_0 (pH 4,9)/ α_0 (pH 7,3)	τ_{akt} (pH 4,9)/ τ_{akt} (pH 7,3)	τ_{deakt} (pH 4,9)/ τ_{deakt} (pH 7,3)
HCN1-wt	+15	-2,3	0	3,3	0,31	1,62
HCN1-QNQ	+25	-1,9	-0,5	100	0,07	1,26

Tabelle 3-5: pH-Abhängigkeit der Parameter. Um den Einfluss des pH-Wertes zu bestimmen, wurden für Zeitkonstanten und Aktivierungsraten α_0 die relativen Änderungen ($\tau(\text{pH } 4,9)/\tau(\text{pH } 7,3)$), für die Parameter der Spannungsabhängigkeit die absoluten Verschiebungen ($V_{1/2}(\text{pH } 4,9)-V_{1/2}(\text{pH } 7,3)$) berechnet.

Bei der Mutante HCN1-QNQ verändern sich alle Parameter beim Ansäuern von pH 7,3 auf pH 4,9. Bei $V_{1/2}$ und α_0 sind die Änderungen bei der Mutante sogar wesentlich größer, als beim Wildtyp. Der gesuchte Protonensensor ist durch die Aminosäureaustausche E229Q, D233N und E235Q nicht entfernt worden.

3.2.3 Nicht-funktionelle Mutanten

Neben den im letzten Kapitel besprochenen 4 Aminosäuren existieren 5 weitere Kandidaten, die als Protonensensor in Frage kommen (siehe Abbildung 3-14 B). Es handelt sich dabei um je 2 Asparaginsäuren in den Transmembransegmenten S2 und S3 (D172 und D178, D214 und D222), sowie eine Asparaginsäure hinter der Pore, kurz vor S6 (D360). Alle 5 wurden gegen ungeladene oder andere negativ geladene Aminosäuren ausgetauscht (siehe Tabelle 3-1). HEK293-Zellen wurden mit der jeweiligen DNA transfiziert. An keiner Zelle wurden Ströme beobachtet, die sich von endogenen Strömen unterschieden, die man an Kontrollzellen messen kann, d.h. die Kanalmutationen sind auch nicht-funktionell.

Die Rolle geladener Seitenketten in den transmembranalen Segmenten S2, S3 und S4 wurde an verwandten Ionenkanälen zum Teil sehr gut untersucht (Tiwari-Woodruff et al., 1997; Chen et al., 2001; Sato et al., 2003). Die Ergebnisse führten zu der Vorstellung, dass negativ geladene Aminosäuren in S2 und S3 mit positiv geladenen Aminosäuren in S4 Salzbrücken ausbilden. Neutralisiert man eine dieser Ladungen durch gezielte Mutagenese, so kommt es damit in der Mutante zu einer freien Ladung in einem transmembranalem Bereich. Dies ist jedoch energetisch so ungünstig, dass in vielen Fällen das Protein nicht mehr richtig gefaltet vorliegt. Die Auswirkungen können mannigfaltig sein. Beim Shaker-Kanal führte diese Situation zu einer unvollständigen „Reifung“ des Proteins, d.h. bestimmte posttranslationale Prozesse, wie Glykosylierung oder Phosphorylierung waren anders als im Wildtypprotein (Tiwari-Woodruff et al., 1997). Bei Mutanten des KAT1-Kanals war die korrekte Integration des Proteins in die Membran gestört (Sato et al., 2003). Chen und Mitarbeiter fanden, dass der Transport von entsprechenden HCN1-Mutanten in die Plasmamembran fast vollständig unterbunden war (Chen et al., 2001).

Tauscht man aber gleichzeitig beide geladenen Seitengruppen einer Salzbrücke gegen neutrale oder aber gegen entgegengesetzt geladene Aminosäuren aus, ändert man den Gesamtladungszustand nur wenig. Tatsächlich konnten solche Mehrfachmutanten erfolgreich analysiert werden. Für einige Aminosäuren in S2, S3 und S4 konnte so ihr Beitrag zu spannungsabhängigen Prozessen untersucht werden (Tiwari-Woodruff et al., 2000; Silvermann et al., 2003)

Es erschien sinnvoll, diese Strategie auch hier anzuwenden, also die nicht-funktionellen HCN1-Mutanten (D172N, D178N, D214N, D222N) durch einen zweiten Aminosäureaustausch in S4 zu „retten“. Leider sind, im Gegensatz zu S2 und S3, die Ladungen in S4 zwischen den verschiedenen Kanalfamilien nicht eindeutig zuzuordnen. Daher ist es

schwierig, vorherzusagen, welcher Aminosäureaustausch in S4 die S2- und S3-Mutanten retten könnte.

Tabelle 3-6 gibt eine Zusammenstellung der zunächst geplanten „Rettungsmutanten“. Es sind verschiedene einfache oder mehrfache Neutralisationen positiver Ladungen in S4 auf dem Hintergrund der nicht-funktionellen Mutanten, bei denen eine Asparaginsäure in S2 oder S3 neutralisiert worden war.

Hintergrund	geplanter Rettungsversuch
D172N	+ K238Q/R241Q/R244Q/R247Q
	+ K250Q
	+ K256Q
	+ K259Q
D222N	+ K238Q/R241Q/R244Q/R247Q
	+ K250Q
	+ K256Q
	+ K259Q
D178N	+ K238Q/R241Q/R244Q/R247Q
	+ K250Q
	+ K256Q
	+ K259Q
D214N	+ K238Q/R241Q/R244Q/R247Q
	+ K250Q
	+ K256Q
	+ K259Q

Tabelle 3-6: Überblick über geplante und bereits untersuchte Rettungsmutationen.

Nicht alle dieser geplanten Mutanten konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Im nächsten Kapitel werden die vorläufigen Ergebnisse dargestellt.

3.2.4 Rettungsmutanten

3.2.4.1 D172N + R259Q

Vor dem Hintergrund des Aminosäureaustauschs D172N wurde das Arginin an der Position 259 neutralisiert. HEK293-Zellen wurden mit HCN1-D172N/R259Q-DNA transfiziert. Zwei bis drei Tage später konnten Ströme mit einer Amplitude von 0,5 bis 2 nA bei -100 mV abgeleitet werden (siehe Abbildung 3-20). Solche Ströme treten weder in Kontrollzellen auf, noch in Zellen, die mit HCN1-D172N transfiziert wurden.

Auf Spannungssprünge von einer Haltespannung von +60 mV zu Testspannungen zwischen +40 und -120 mV resultieren Stromantworten mit einer zeitunabhängigen und einer zeitabhängigen Komponente. Der zeitabhängige Strom wächst ohne Verzögerung sofort nach dem Spannungssprung. Der Zeitverlauf lässt sich durch eine einfach exponentielle Funktion gut beschreiben (siehe Abbildung 3-20 B). Die Zeitkonstanten sind kleiner und deutlich

weniger spannungsabhängig als beim HCN1-Wildtyp (siehe Abbildung 3-20 D). Der Wert für z_α betrug 0,17, der Wert für α_0 6,5.

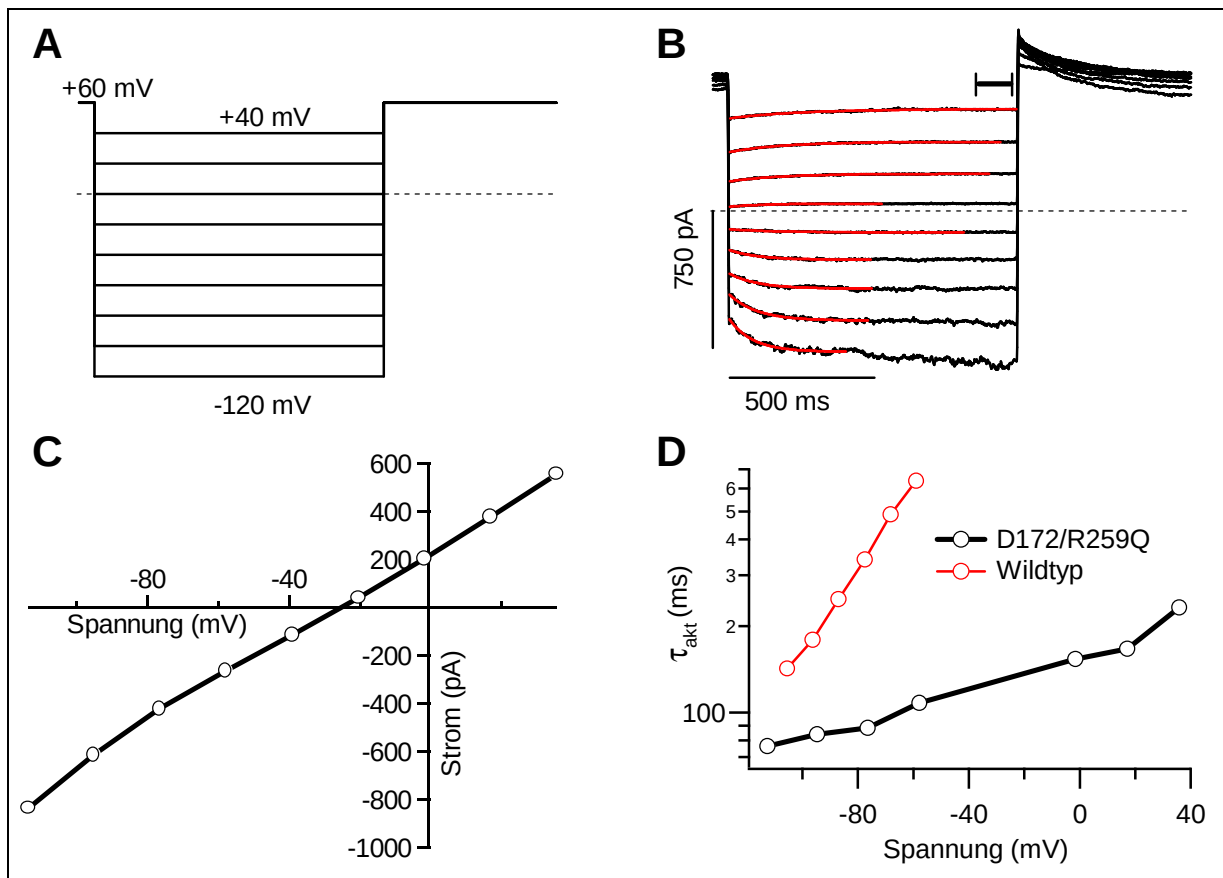


Abbildung 3-20: (A) Spannungsprotokoll. (B) Stromantworten auf das angegebene Spannungsprotokoll, gemessen an einer Zelle, die HCN1-D172N/R259Q exprimiert. Einfach exponentielle Anpassungen sind rot eingetragen. Die Länge des angepassten Intervalls wurde iterativ auf fünf Zeitkonstanten eingestellt (mit Ausnahme der obersten Ableitung). Der Balken zeigt, in welchem Intervall der Strom gemittelt wurde, um die Amplitude am Ende des Testpulses zu bestimmen. Sie ist in C gegen die Testpulsspannung aufgetragen. (D) Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskinetik. Die schwarze Kurve gibt den Mittelwert von 3 Messungen an einer Zelle wieder. Zum Vergleich wurden die Aktivierungszeitkonstanten des HCN1-Wildtyps mit eingetragen.

Am Ende des Testpulses hat der Strom sein Gleichgewicht erreicht. Wird dieser Gleichgewichtswert gegen die Testspannung aufgetragen (Abbildung 3-20 C), so erkennt man, dass der Strom bei etwa -25 mV sein Vorzeichen wechselt. Diese Spannung wird Umkehrpotential genannt. Leckstrom hat ein Umkehrpotential von ca. 0 mV. Da der Strom in Abbildung 3-20 ein deutlich negativeres Umkehrpotential hat, fließt er durch eine spezifische Leitfähigkeit. Zwischen $+40$ mV und -80 mV ist der Strom praktisch linear von der Spannung abhängig (Abbildung 3-20 C). Die Größe der Leitfähigkeit ist demnach fast unabhängig von der Spannung.

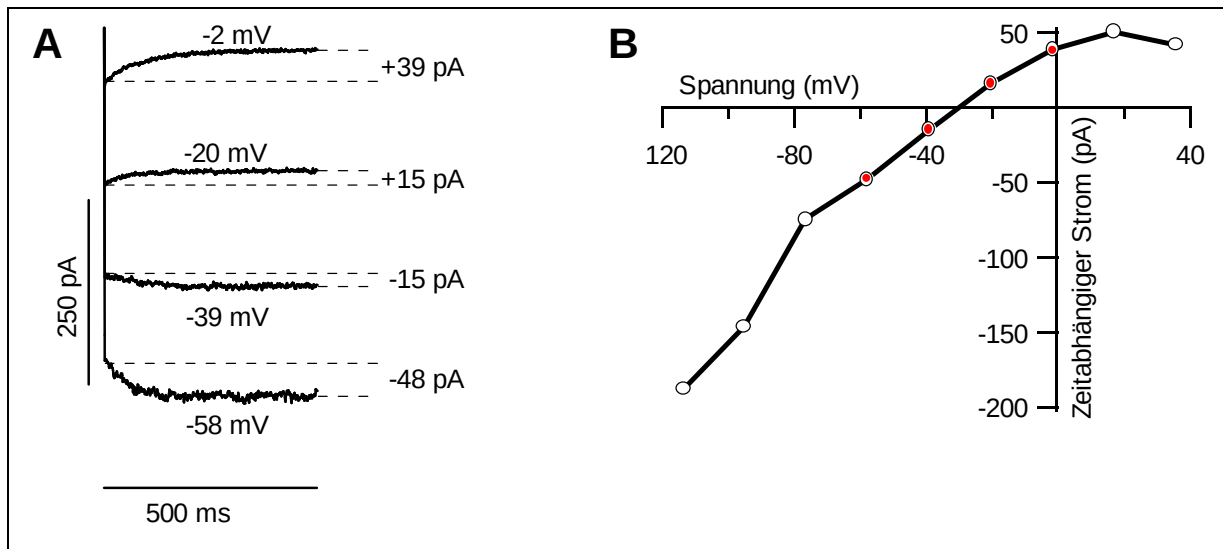


Abbildung 3-21: (A) Bestimmung der Amplitude des zeitabhängigen Stromes an vier Stromableitungen aus Abbildung 3-20 B. (B) Spannungsabhängigkeit des zeitabhängigen Stromes. Die in Graph A bestimmten Werte sind rot eingetragen. Das Umkehrpotential des Stromes beträgt -30 mV.

Um das Umkehrpotential des zeitabhängigen Stromanteils zu ermitteln, wird die Differenz zwischen dem Strom am Anfang und dem Strom am Ende des Testpulses bestimmt (siehe Abbildung 3-21 A). Dieser Strom wird über der Testspannung aufgetragen (siehe Abbildung 3-21 B). Er verschwindet bei -30 mV ($n = 3$).

In der Einführung wurde beschrieben, dass extrazelluläre Cs^+ -Ionen den Einwärtsstrom durch Wildtyp-HCN-Kanäle blockieren. Der Strom, der an Zellen gemessen wird, die mit HCN1-D172N/R259Q transfiziert wurden, ist ebenfalls Cs^+ -sensitiv. In Abbildung 3-22 A - C ist dargestellt, welche Ströme vor, während und nach der Perfusion mit 5 mM CsCl gemessen wurden. Unterhalb von etwa -80 mV sind die Ableitungen nicht mehr stabil (siehe auch Legende der Abbildung 3-22). Für die Beschreibung des Cs-Effektes auf die Ströme beschränke ich mich auf den Spannungsbereich zwischen $+40$ und -80 mV.

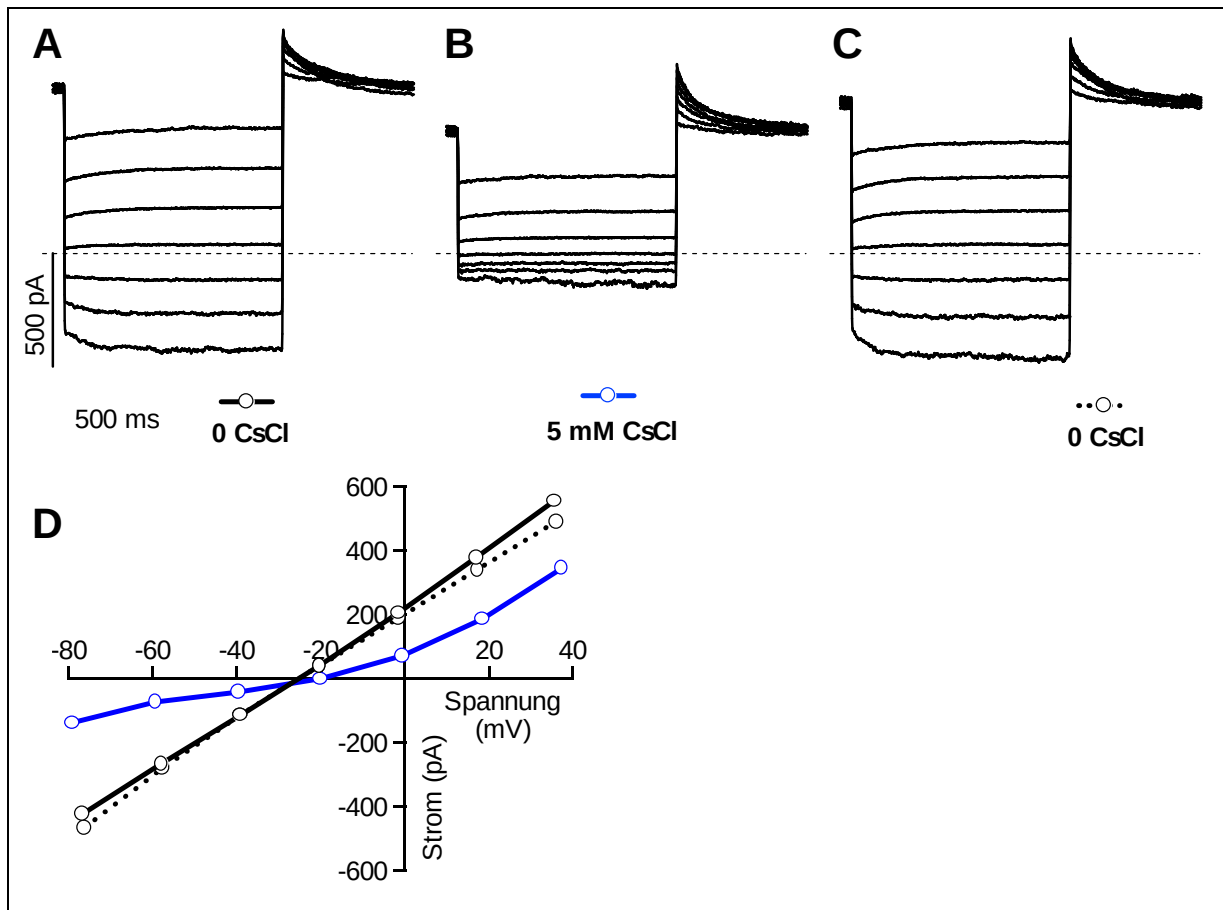


Abbildung 3-22: (A - C) Extrazelluläre Cs⁺-Ionen blockieren den Strom an einer Zelle, die mit HCN1-D172N/R259Q transfiziert wurde. Es wurde das Spannungsprotokoll aus Abbildung 3-20 A verwendet. Die Ableitungen im linken Graphen wurden vor Cs⁺-Zugabe aufgenommen; die im rechten Graphen nachdem das Cs⁺ ausgewaschen war. Unter den Graphen ist angegeben, mit welcher Farbe der jeweilige Strom unten dargestellt wird. (D) Spannungsabhängigkeit des Stromes. In allen drei oberen Graphen wurde die Stromamplitude am Ende des Testpulses bestimmt und gegen die Spannung aufgetragen. Der Effekt der Cs⁺-Ionen auf den Strom ist reversibel.

In der Gegenwart von 5 mM CsCl sind die Ströme deutlich kleiner. Einwärts fließende Ströme weisen keine zeitabhängige Komponente auf. Cs⁺-Ionen blockieren 70% des Einwärtsstromes bei -80 mV, sowie etwa 40% des Auswärtsstromes bei +30 mV (siehe Abbildung 3-22 D). Der Einfluss von Cs⁺ ist vollständig reversibel. Nach Auswaschen der Cs⁺-haltigen Lösung sind die Ströme praktisch identisch mit denen vor der Zugabe (siehe Abbildung 3-22 D)

Die gemessenen HCN1-D172N/R259Q-Ströme sind in vielen Eigenschaften HCN-untypisch. Insbesondere das sigmoide Aktivierungsverhalten von HCN-Kanälen ist in der Mutante nicht vorhanden. Das Umkehrpotential und der Block durch Cs⁺-Ionen unterstützen die These, dass die Ströme durch die HCN1-Mutante fließen.

3.2.4.2 D222N + R259Q

Auf dem Hintergrund des Aminosäureaustauschs D222N wurde das Arginin an der Position 259 neutralisiert. HEK293-Zellen wurden mit HCN1-D222N/R259Q DNA transfiziert. Auch bei dieser Mutante konnten zwei bis drei Tage später große Ströme mit einer Amplitude von 0,5 bis 2,5 nA bei -100 mV abgeleitet werden (siehe Abbildung 3-20). Solche Ströme treten weder in Kontrollzellen auf, noch in Zellen, die mit HCN1-D222N transfiziert worden waren.

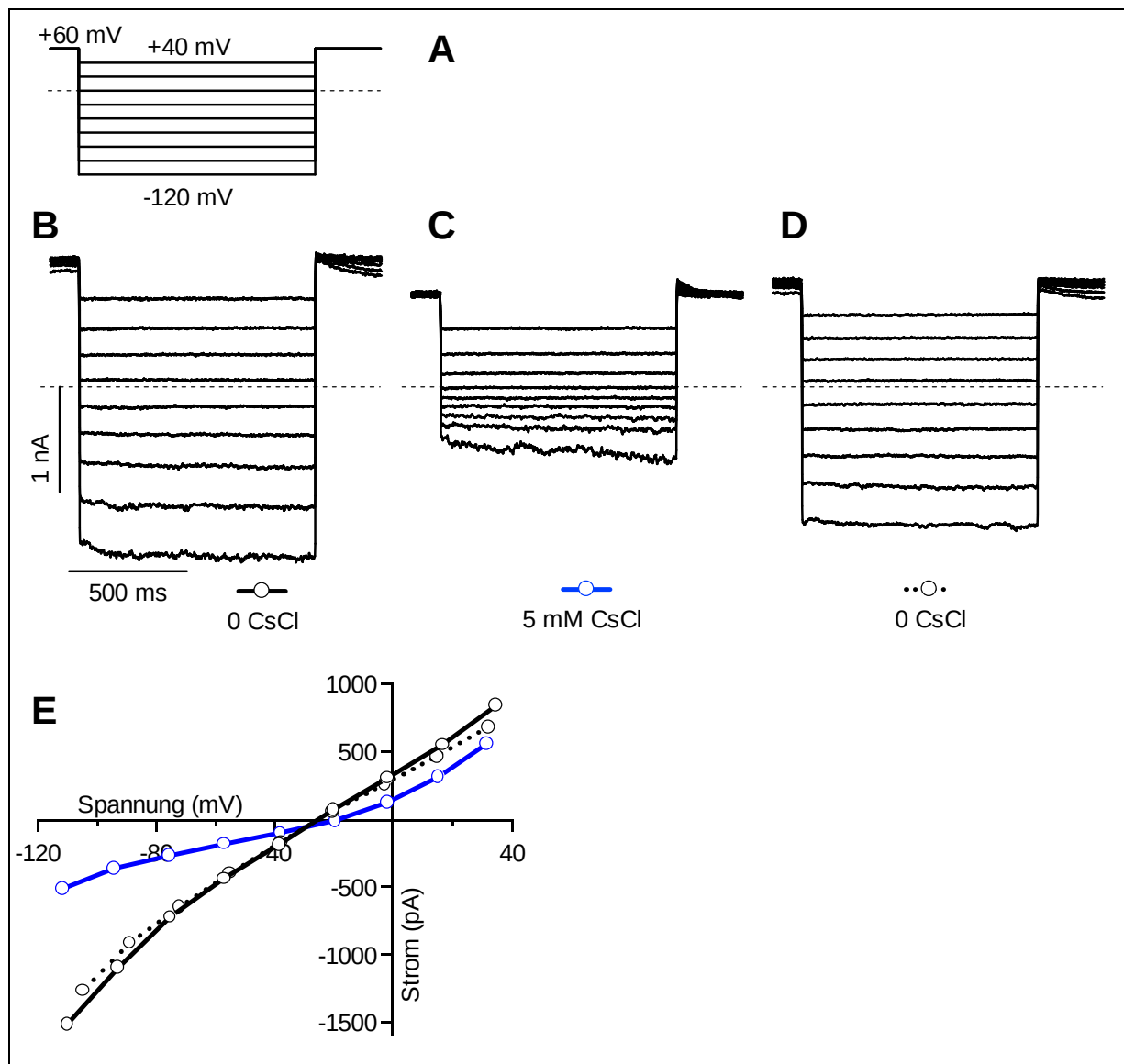


Abbildung 3-23: (A) Spannungsprotokoll. (B-D) Extrazelluläre Cs^+ -Ionen blockieren den Strom an einer Zelle, die mit HCN1-D222N/R259Q transfiziert wurde. Es wurde das oben dargestellte Spannungsprotokoll verwendet. Die Ableitungen im linken Graphen wurden vor der Zugabe von Cs^+ aufgenommen; die im rechten Graphen, nachdem Cs^+ ausgewaschen war. Unter den Graphen ist angegeben, mit welcher Farbe der jeweilige Strom unten dargestellt wird. (E) Spannungsabhängigkeit des Stromes. In den drei mittleren Graphen wurde die Stromamplitude am Ende des Testpulses bestimmt und gegen die Spannung aufgetragen. Der Effekt der Cs^+ -Ionen auf den Strom ist fast völlig reversibel.

Bei Spannungssprüngen von +60 mV zu Testspannungen zwischen +40 und –120 mV ergeben sich zeitunabhängige Ströme, die an Kontrollzellen nicht auftreten. Ihre Amplitude ist spannungsabhängig, das Umkehrpotential liegt bei etwa –25 mV (siehe Abbildung 3-23 E). Cs⁺-Ionen blockieren 70% des Einwärtsstromes bei -90 mV und etwa 30% des Auswärtsstromes bei +30 mV. Die zugrundeliegenden Kanäle haben damit ähnliche Eigenschaften wie HCN1-D172N/R259Q-Kanäle. Ich schließe daraus, dass der Strom durch die HCN1-Mutante fließt.

Bisher wurden nur diese beiden Rettungsmutanten untersucht. Ihre Charakterisierung ist noch nicht abgeschlossen. Die anderen, in Tabelle 3-6 aufgezählten, potentiellen Rettungsmutanten, konnten aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht charakterisiert werden.

3.3 Einführen einer negativen Ladung in S2

Im Kapitel 3.2.4 wurde beschrieben, dass bei den HCN1-Mutanten, bei denen Asparaginsäuren in S2 oder S3 ausgetauscht wurden, keine HCN-Ströme nachweisbar waren. Es kann daher nicht entschieden werden, ob eines dieser Aspartate in S2 und S3 ein Teil des gesuchten Protonensensors des Wildtypkanals ist. Daher wurde nach einer anderen Möglichkeit gesucht, Rückschlüsse auf den Ort des Protonensensors zu ziehen. Wie bereits erwähnt, hängt der pK_S -Wert von der Umgebung der protonierbaren Gruppe ab. Wird in der Nähe eine zusätzliche Ladung eingeführt, so kann das direkte Auswirkungen auf den pK_S -Wert haben.

Vergleicht man die Aminosäuresequenzen von S2-Segmenten verwandter Ionenkanäle (Abbildung 3-27), so fällt auf, dass in S2 negativ geladene Aminosäuren an drei verschiedenen Positionen auftreten können. Die entsprechenden Positionen im rHCN1 sind 168, 172 und 178. An der ersten Position findet man negative Aminosäuren in Kanälen aus der EAG-Familie, der CNG-Familie und der Kv-Familie. In allen HCN-Kanälen dagegen findet sich an der entsprechenden Position ein ungeladenes Asparagin (N168 in rHCN1). Es erschien deshalb wahrscheinlich, dass beim Austausch N168D oder N168E die Kanalfunktion erhalten bleibt. Gleichzeitig bestand die Hoffnung, dass die eingeführte Ladung den pK_S -Wert eines - möglicherweise benachbarten - Protonensensors verändert.

	168	172	178	
rHCN1	:	WIIFN	VASD	TVFLLDLIM 181
rHCN2	:	WIVFN	VVSD	TFFLMDLVL 234
rHCN4	:	WIVFN	VVSD	TFFLIDLVL 142
DmHCN	:	WIAFN	CLSD	TIFLIDIVV 453
hERG	:	LAVVD	LIVD	IMFIVDILI 512
DmEAG	:	LLVV	DSIVD	VIFFIDIVL 287
bEAG1	:	WLVV	DSIVD	VIFLVDIVL 267
bCNG1	:	WLAF	DYLS	DVVYLLDMFV 215
bCNG2	:	WLV	LDYVSD	VVYIADLFI 192
Shaker	:	FFLI	ETLCII	WFTFELTV 330
hKv1.1	:	FFIV	ETLCII	WFSFELVV 238
hKv1.3	:	FFVV	ETLCII	WFSFELLV 260
hKv1.4	:	FFIV	ETVCIV	WFSFEFVV 238

Abbildung 3-27: Sequenzvergleich der S2-Segmente verwandter Ionenkanäle. Die negativ geladenen Aminosäuren Asparaginsäure (D) und Glutaminsäure (E) sind rot eingetragen.

3.3.1 HCN1-N168D

HEK293-Zellen wurden mit HCN1-N168D DNA transfiziert. Zwei bis drei Tage nach der Transfektion konnten charakteristische HCN-Ströme abgeleitet werden (siehe Abbildung 3-28). Wie bei der Untersuchung von Wildtyp-HCN1 wurde für die Experimente ein Spannungsprotokoll mit variablem Vorpuls und festem Testpuls verwendet. Bei pH-Werten oberhalb von 5 sind die Stromantworten denen des HCN1-Wildtyps ähnlich. Bei niedrigeren pH-Werten ist, anders als beim Wildtyp, ein Großteil der Kanäle schon bei der Haltespannung geöffnet. Bei pH 4,3 ist es schließlich experimentell nicht mehr möglich, alle Kanäle zu schließen, weil dazu sehr große positive Spannungen benötigt werden. Bei diesen Spannungen aktivierten bei pH-Werten unterhalb von 5 große endogene Ströme, die die Stabilität der Ableitung verringerten. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung der HCN1-N168D-Kanäle wurde durch die Analyse der *tail*-Ströme bestimmt, wie sie in den Kapiteln 2.3.1 und 3.1.1 beschrieben wurde.

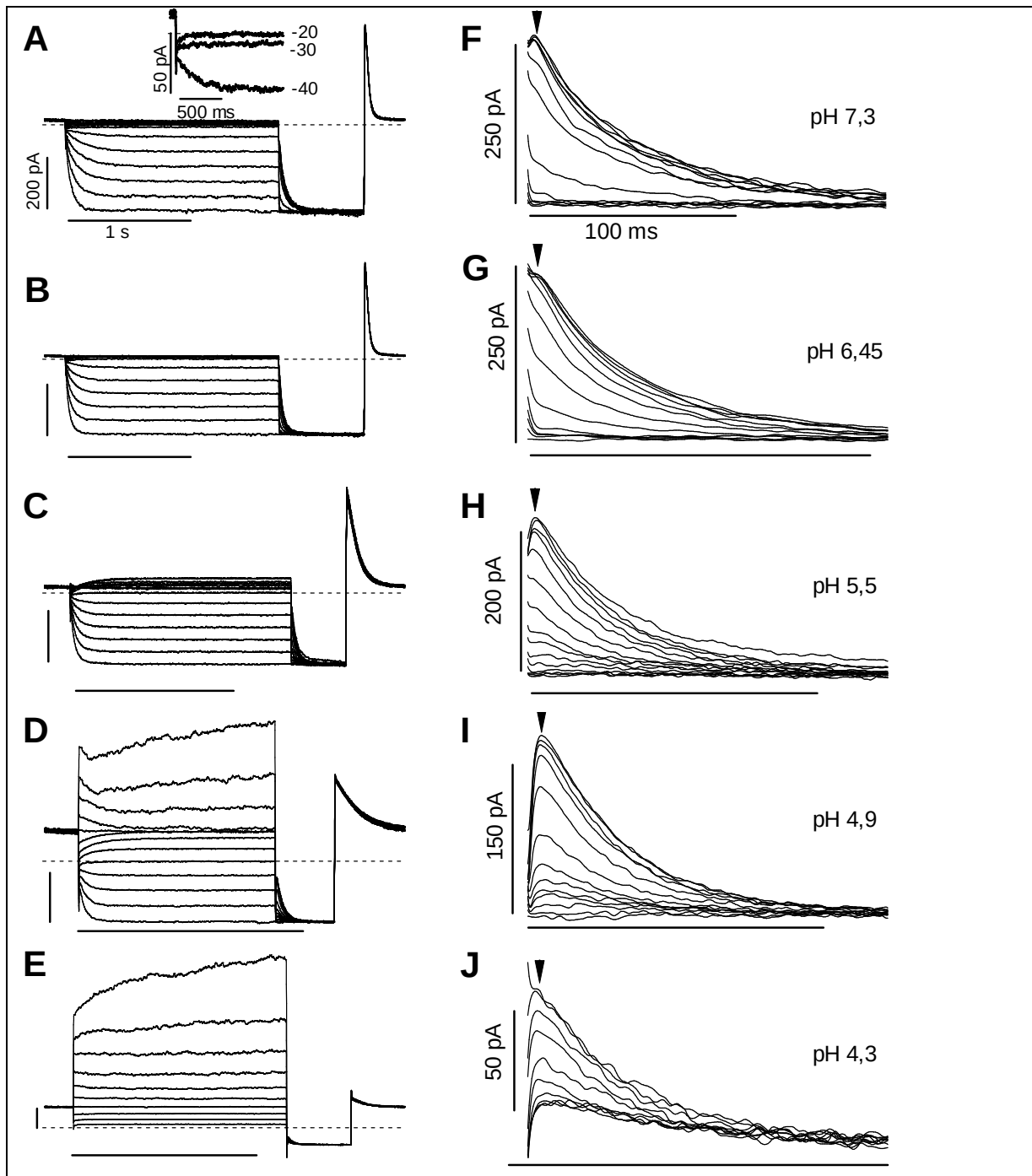


Abbildung 3-28: Stromantworten, gemessen an einer Zelle, die mit HCN1-N168D transfiziert war. Der pH-Wert der extrazellulären Lösung ist jeweils rechts außen angegeben. Die Haltespannung betrug +30 mV, die Testspannung -90 mV. Die Vorpulsspannung variierte in Schritten von 10 mV (pH 7,3 – pH 5,5) bzw. 15 mV (pH 4,9 und pH 4,3). Links ist jeweils die gesamte Stromableitung zu sehen (A - E). Der Einschub in A zeigt drei Stromableitungen bei pH 7,3 in größerer Auflösung. Hier kann man erkennen, dass der Kanal schon bei Sprüngen zu -20 mV teilweise aktiviert wird. Bei pH 4,3 (D) und pH 4,9 (E) beobachtet man zusätzliche, vermutlich pH-aktivierte endogene Ströme. Sie haben allerdings keinen Einfluss auf die *tail*-Ströme (I und J). (F - J) Die *tail*-Ströme sind in einer höheren Auflösung dargestellt. Die Pfeilspitze markiert den Zeitpunkt, an dem die Amplituden der *tail*-Ströme bestimmt wurden (siehe Abbildung 3-29).

Spannungsabhängigkeit der Aktivierung

In Abbildung 3-29 ist die Amplitude der *tail*-Ströme (Pfeile in Abbildung 3-28 rechts) gegen die Vorpolsspannung aufgetragen. Die entsprechende Anpassung durch die Boltzmann-Gleichung (Gleichung 23) ist als durchgezogene Linie eingetragen. In neutraler extrazellulärer Lösung beträgt $V_{1/2} = -32 \pm 3$ mV ($n = 10$). Das ist eine recht große Verschiebung relativ zu den -62 mV des Wildtyps, wenn man bedenkt, dass in der Mutante lediglich eine negative Ladung eingeführt wurde. Beim Ansäuern auf pH 4,3 wird $V_{1/2}$ dramatisch verschoben. Die halbmaximale Aktivierungsspannung bei pH 4,3 beträgt $+55 \pm 5$ mV ($n = 3$). Das ist eine sehr große Veränderung (+93 mV), mehr als 2,5 mal so viel, wie beim Wildtyp. Der Parameter z sinkt dabei von $3,6 \pm 0,3$ ($n=10$) auf $1,6 \pm 0,3$ ($n = 3$) (siehe auch Abbildung 3-29 rechts und Tabelle 3-7).

Interessant ist, dass die pH-Abhängigkeiten von $V_{1/2}$ und z bei der Mutante sehr verschieden sind (Abbildung 3-29 B). Während sich z sehr stark zwischen pH 7,3 und pH 5,5 ändert und unterhalb von pH 5,5 praktisch konstant ist, ändert sich $V_{1/2}$ unterhalb von pH 5,5 wesentlich stärker mit dem pH-Wert, als oberhalb von 5,5. Daraus kann man schließen, dass die pH-Abhängigkeit von $V_{1/2}$ und z durch die Titration von mehreren unterschiedlichen Gruppen zustande kommt. Beim Wildtypkanal überlappen die pH-Bereiche, in denen sich $V_{1/2}$ bzw. z ändern, weitgehend.

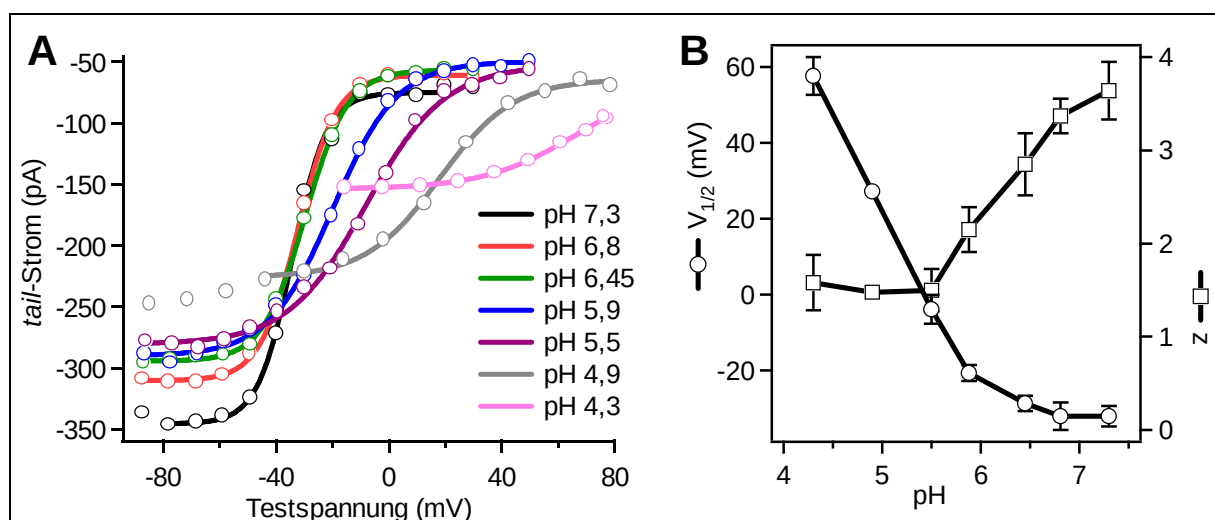


Abbildung 3-29: (A) Spannungsabhängigkeit der HCN1-N168D-*tail*-Ströme. Die durchgezogenen Linien sind mit der Boltzmann-Gleichung (Gleichung 23) berechnet worden. Die entsprechenden Parameter sind in Tabelle 3-7 angegeben. (B) Einfluss des pH-Wertes auf die Parameter z und $V_{1/2}$ der Boltzmann-Gleichung. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen (pH 7,3 $n = 10$; pH 6,8 $n = 4$; pH 6,45 $n = 4$; pH 5,9 $n = 4$; pH 5,5 $n = 3$; pH 4,9 $n = 2$; pH 4,3 $n = 3$). Für $n < 3$ sind keine Fehlerabschätzungen angegeben.

	pH 7,3	pH 6,8	pH 6,45	pH 5,9	pH 5,5	pH 4,9	pH 4,3
$I_{\min}$	-75	-61	-57	-50	-53	-64	-64
$I_{\max}$	-346	-310	-294	-290	-281	-226	-154
$V_{1/2}$	-34,2	-32,1	-29,6	-19,9	-8,0	17,9	66,9
z	4,2	3,7	3,4	2,2	1,8	1,9	1,5

Tabelle 3-7: Parameter der Boltzmann-Gleichung zu Abbildung 3-29 (A). $V_{1/2}$ und z sind in Abbildung 3-29 (B) über dem pH-Wert aufgetragen.

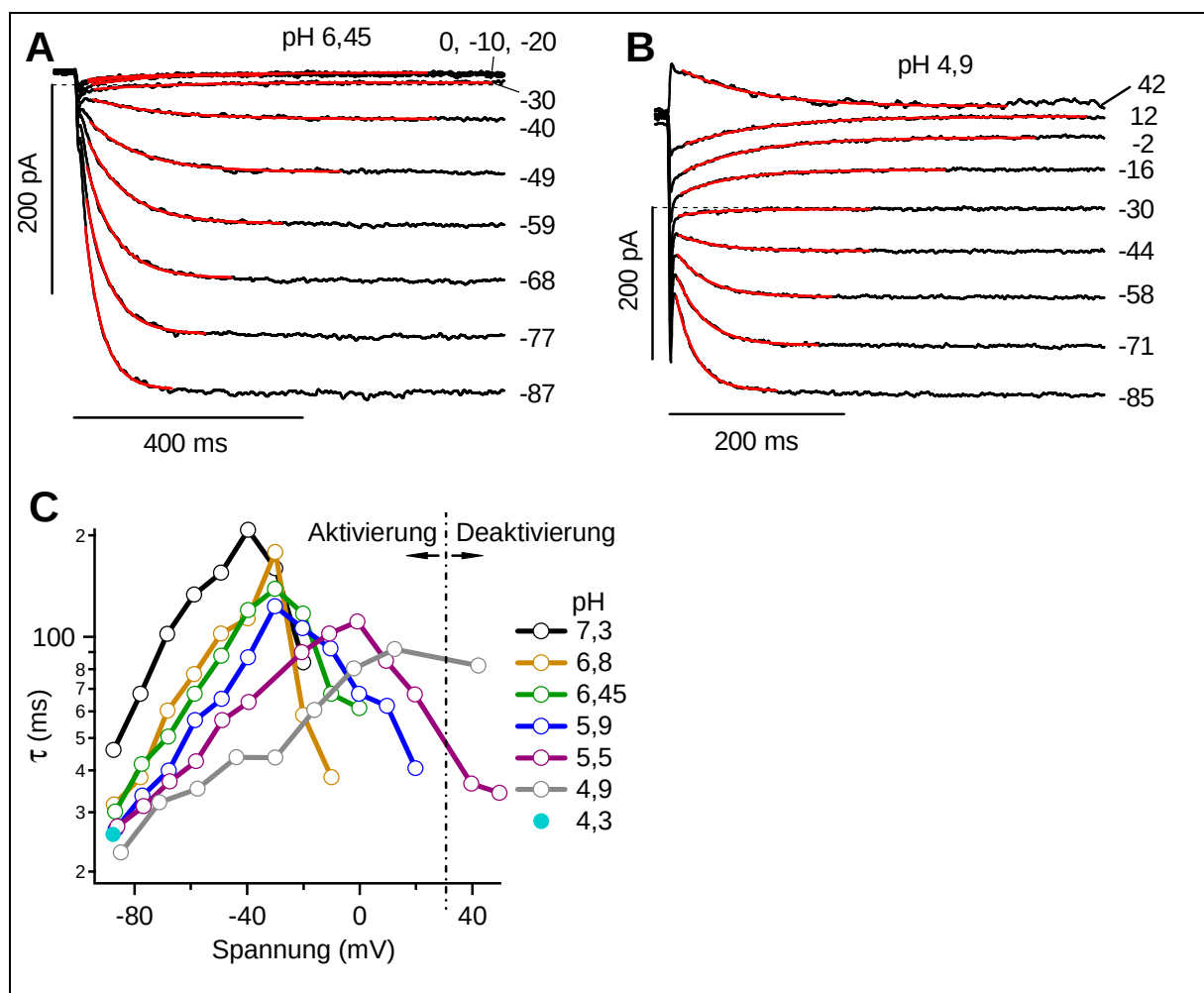


Abbildung 3-30: Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskinetik. (A und B) Stromantworten aus Abbildung 3-28 bei pH 6,45 (A) und pH 4,9 (B). Die Spannung ist rechts neben den Kurven in mV angegeben. Einfach exponentielle Anpassungen sind rot eingezeichnet, ihre Dauer beträgt 5τ . Der Zeitverlauf der Stromantwort nach einem Sprung von +30 auf +42 mV bei pH 4,9 (B) gibt den Zeitverlauf der Deaktivierung wieder. (C) Spannungsabhängigkeit der Zeitkonstanten, die in den oberen Graphen und an weiteren Messungen an derselben Zelle bestimmt wurden. Für pH 4,3 wurde die Aktivierungskinetik durch Anpassung der *tail*-Ströme bei -90 mV bestimmt. Die senkrechte Strich-Punkt-Linie trennt die Daten in Aktivierungs- und Deaktivierungskonstanten.

Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskinetik

Die Zeitkonstante τ_{akt} wurde durch Kurvenanpassungen mit einfach exponentiellen Funktionen bestimmt (siehe Abbildung 3-30 A und B). Für pH 4,3 existiert nur ein einziger

verlässlicher Messpunkt. Er wurde durch Anpassungen an den *tail*-Strom bei -85 mV bestimmt (● in Abbildung 3-30 C).

Für die Spannungsabhängigkeit von τ_{akt} ergeben sich bei den anderen pH-Werte konkave Kurven, die ihr Maximum in der Nähe der Spannung $V_{1/2}$ annehmen (Abbildung 3-30 C). Der Anstieg der linken Flanke wird zu niedrigeren pH-Werten hin kleiner, das heißt die Spannungsabhängigkeit wird schwächer

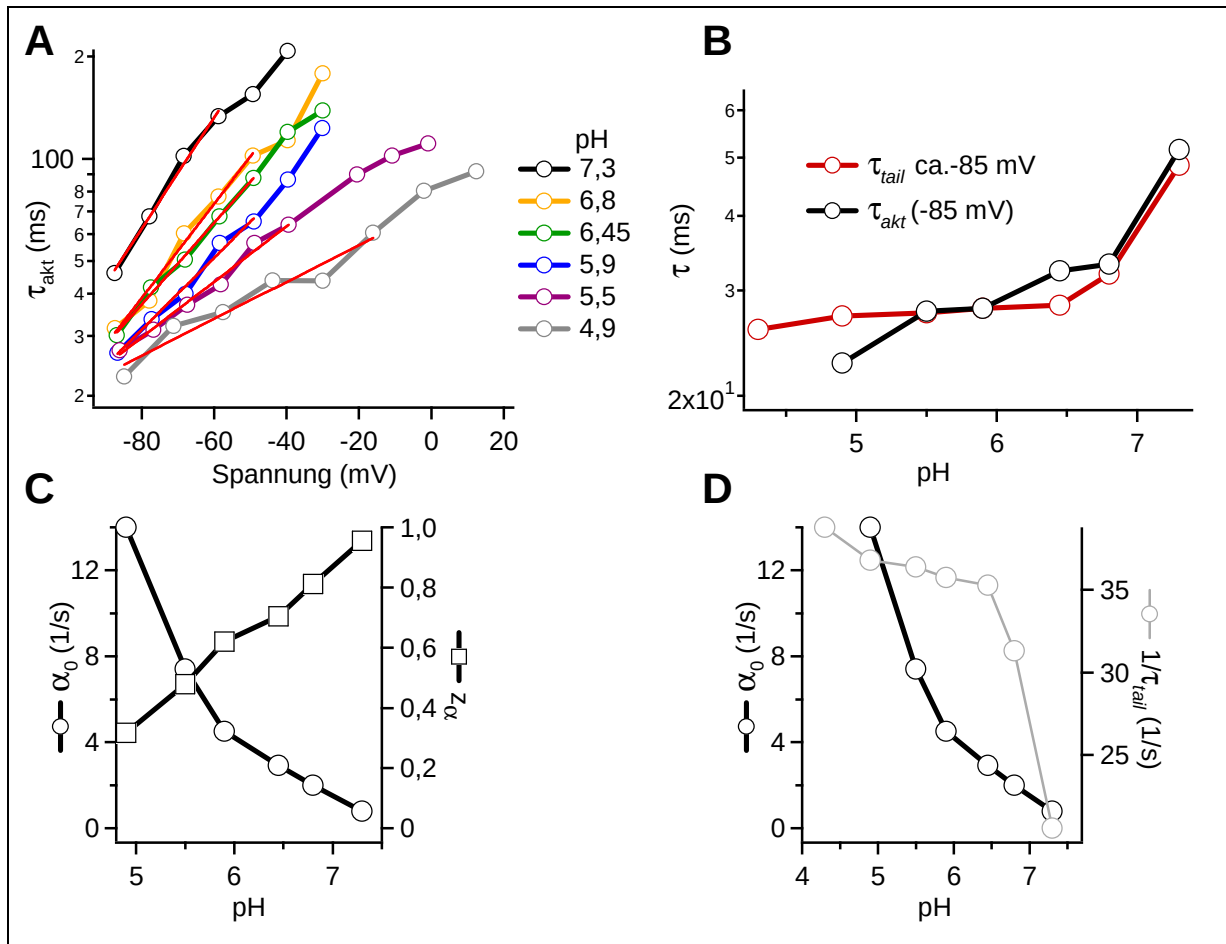


Abbildung 3-31: pH-Abhängigkeit der Aktivierungskinetik. (A) Es ist jeweils die linke Flanke der τ_{akt} -V-Kurven aus Abbildung 3-30 C dargestellt. Kurvenanpassungen (rote Geraden) nach Gleichung 22.3 wurden in einem Spannungsbereich vorgenommen, in dem mehr als 90 % der Kanäle aktiviert waren. (B) pH-Abhängigkeit von τ_{akt} bei -80 mV. Die Zeitkonstante der Aktivierung wurde aus den Daten in A interpoliert und über dem pH-Wert aufgetragen. Rot dargestellt ist die Zeitkonstante τ_{tail} der Aktivierung der *tail*-Ströme bei etwa -85 mV (Beschreibung siehe Text). (C) pH-Abhängigkeit der Parameter α_0 und z_α . (D) Die pH-Abhängigkeit von $1/\tau_{tail}$ und α_0 .

pH-Abhängigkeit der Aktivierungskinetik

Wie bereits erwähnt können Aktivierungszeitkonstanten auch anhand der *tail*-Ströme bestimmt werden, die nach Sprüngen von der Vorpuls- zur Testspannung (ca. -85 mV) aufgenommen wurden. Diese Aktivierungszeitkonstanten werden im folgenden als τ_{tail} bezeichnet. Bei der Mutante HCN1-N168D ist es sinnvoll, für die Bestimmung der pH-

Abhängigkeit der Aktivierungskinetik die Werte für τ_{tail} anstatt der Werte für τ_{akt} zu verwenden. Die Werte von τ_{tail} und τ_{akt} können sich unterscheiden da – durch die große Verschiebung von $V_{1/2}$ – bei pH-Werten unterhalb von 5,9 bei der Haltespannung (+30 mV) nicht alle Kanäle vollständig deaktiviert sind. Bei einer Vorpulsspannung, die positiver als die Haltespannung ist, sind mehr Kanäle vollständig deaktiviert. Damit ist die Zeitkonstante τ_{tail} , die nach dem Sprung von der größten positiven Vorpulsspannung ermittelt wurde, am besten geeignet, die Kinetik der Aktivierung aus einem vollständig deaktivierten Zustand zu beschreiben. Kanäle, die nicht vollständig deaktiviert sind, aktivieren nach dem Sprung zu negativen Spannungen möglicherweise schneller, als das bei vollständig deaktivierten Kanälen der Fall wäre (siehe auch Beispiel in Kapitel 2.2.3). Bei kleinen pH-Werten, bei denen bei der Haltespannung deutlich weniger Kanäle vollständig deaktiviert sind als bei der positivsten Vorpulsspannung, würde man demnach erwarten, dass τ_{akt} kleiner ist als τ_{tail} . Die pH-Abhängigkeit von τ_{tail} und τ_{akt} ist in Abbildung 3-31 B dargestellt. Bei pH 4,9 ist τ_{akt} deutlich kleiner als τ_{tail} , bei größeren pH-Werten gleichen sich die Werte. Der Wert für τ_{tail} ist unterhalb von pH 6,5 fast konstant. Beim HCN1-Wildtyp nahm die Aktivierungszeitkonstante dagegen mit sinkendem pH-Wert stetig ab. Abbildung 3-31 D verdeutlicht, dass die pH-Abhängigkeit von $1/\tau_{\text{tail}}$ völlig anders verläuft, als die pH-Abhängigkeit des Parameters α_0 . Der Parameter $1/\tau_{\text{tail}}$ zeigt für kleine pH-Werte ein Sättigungsverhalten, der Parameter α_0 für große pH-Werte. Letzteres ist in Abbildung 3-31 D nicht unmittelbar ersichtlich. Berücksichtigt man jedoch, dass α_0 keine negativen Werte annehmen kann, so wird klar, dass α_0 zu größeren pH-Werten hin nicht deutlich kleiner werden kann. Der Unterschied im Verlauf der pH-Abhängigkeit von $1/\tau_{\text{tail}}$ und α_0 ist leicht verständlich. Da $1/\tau_{\text{tail}} \approx \alpha(-85 \text{ mV})$ gilt, sind die Größen $1/\tau_{\text{tail}}$, α_0 und z_α sind durch Gleichung 22.1 miteinander verbunden. Weil der Parameter z_α stark vom pH-Wert abhängt, unterscheiden sich die pH-Abhängigkeiten von $1/\tau_{\text{tail}}$ und α_0 (Abbildung 3-31 C). Wenn nun aber die Aktivierungsraten bei –85 mV ($1/\tau_{\text{tail}}$) und bei 0 mV (α_0) in so unterschiedlicher Weise vom pH-Wert abhängen, wie kann dann ein apparenter pK_S -Wert für die pH-Abhängigkeit der Aktivierungskinetik bestimmt werden?

pH-Abhängigkeit der Deaktivierungskinetik

In Abbildung 3-32 (A) sind *tail*-Ströme dargestellt, die den Verlauf der Deaktivierung nach dem Sprung von etwa –85 mV zur Haltespannung von +30 mV widerspiegeln. Einfach exponentielle Anpassungen sind rot eingezeichnet. Die entsprechenden Zeitkonstanten τ_{deakt}

sind rechts in Teil B gegen den pH-Wert aufgetragen. Ändert sich der pH-Wert von 7,3 auf 4,9, steigt τ_{deakt} auf das 4,4fache an.

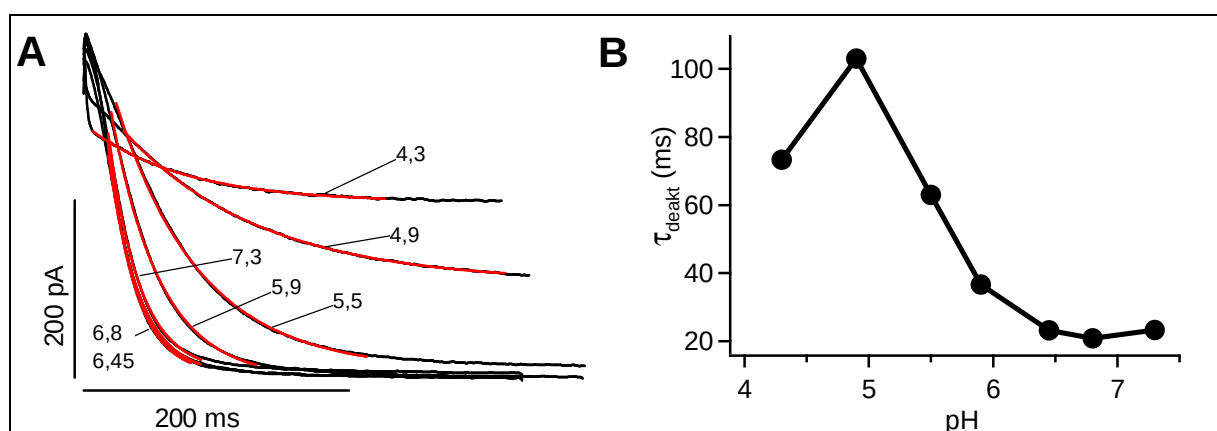


Abbildung 3-32: (A) *tail*-Ströme aus Abbildung 3-28, aufgenommen während der Deaktivierung nach dem Sprung von -90 mV auf $+30$ mV. Einfach exponentielle Anpassungen sind rot eingezeichnet. Die Länge des angepassten Intervalls wurde iterativ auf 3 Zeitkonstanten eingestellt (außer pH 4,9: $2,8 \cdot \tau$). (B) pH-Abhängigkeit der Zeitkonstanten.

Der Abfall von τ_{deakt} beim weiteren Ansäuern zu pH 4,3 spiegelt vermutlich nicht eine höhere Deaktivierungsrate wider. Er wird durch die stark verschobene Spannungsabhängigkeit der Aktivierung verursacht. Bei pH 4,3 und $+30$ mV wird die Zeitkonstante nicht mehr durch eine einzelne Ratenkonstante bestimmt (siehe auch Kapitel 2.2.1).

3.3.2 HCN1-N168E

HEK293-Zellen wurden mit HCN1-N168E-DNA transfiziert. Zwei bis drei Tage nach der Transfektion konnten charakteristische HCN-Ströme abgeleitet werden (siehe Abbildung 3-28). Wie bei der Untersuchung von Wildtyp-HCN1 wurde für die Experimente ein Spannungsprotokoll mit variablem Vorpuls und festem Testpuls verwendet. Nach einem Sprung auf Spannungen unter etwa -20 mV aktivierte der Strom zeitabhängig. Qualitativ unterscheiden sich die Stromableitungen nicht von denen des HCN1-Wildtyps. Zur Bestimmung der Spannungs- und pH-Abhängigkeit der Aktivierung und Deaktivierung wurden daher die bereits beschriebenen Methoden eingesetzt (siehe auch Kapitel 2.3. und Kapitel 3.1).

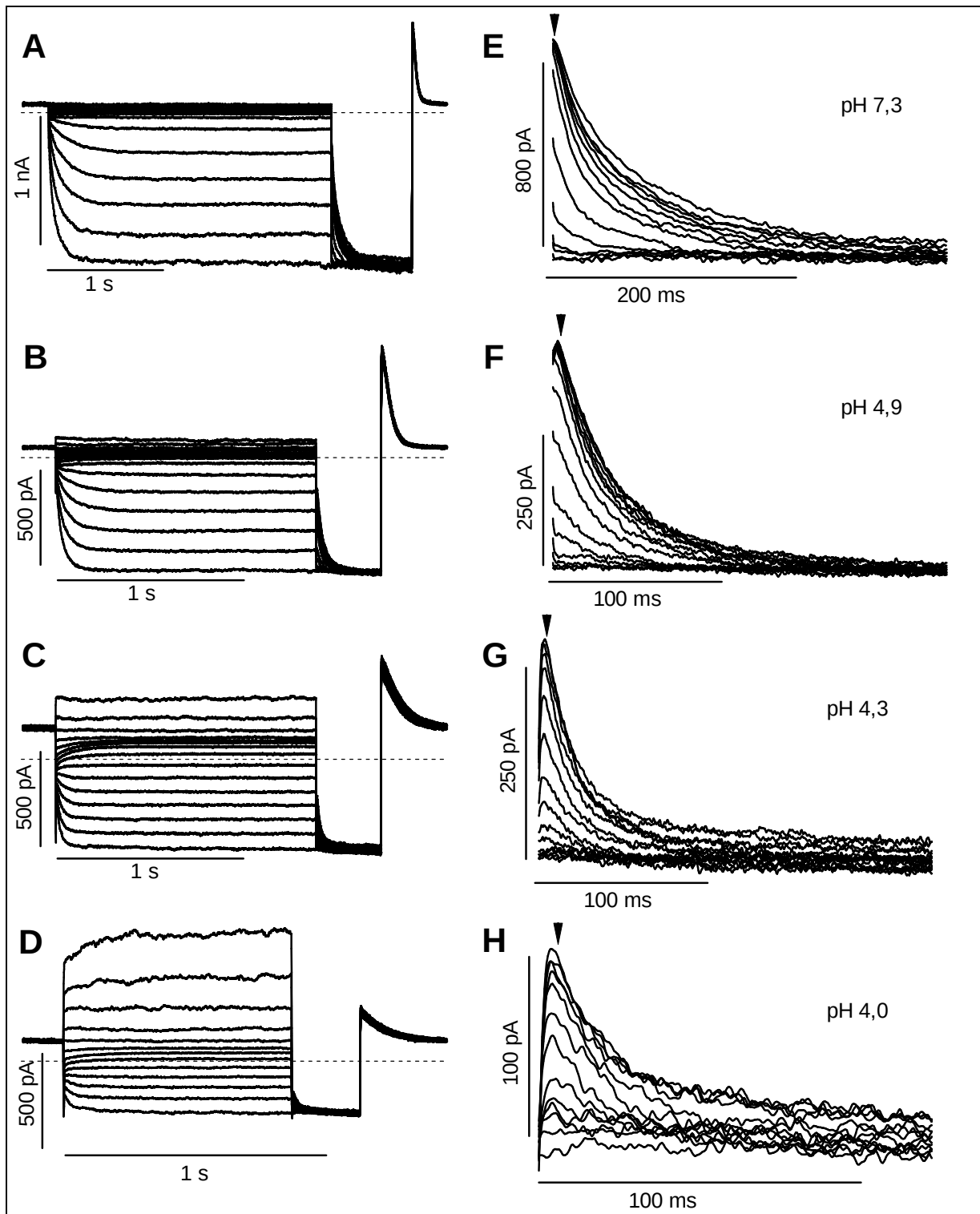


Abbildung 3-33: Stromantworten gemessen an einer Zelle, die mit HCN1-N168E transfiziert war. Der pH-Wert der extrazellulären Lösung ist jeweils rechts außen angegeben. Die Haltespannung betrug +30 mV, die Testspannung -90 mV. Die Vorpulsspannung variierte in Schritten von 10 mV. Die Graphen A bis D zeigen jeweils die gesamte Stromableitung zu sehen. Die tail-Ströme sind in einer höheren Auflösung dargestellt (E – H). Die Pfeilspitze markiert den Zeitpunkt, an dem die Amplituden der *tail*-Ströme bestimmt wurden (siehe Abbildung 3-34). Bei der Erniedrigung des pH-Werts ging der HCN-Strom in diesem Experiment relativ stark zurück.

Spannungsabhängigkeit der Aktivierung

Bei pH 7,3 beträgt die halbmaximale Aktivierungsspannung $V_{1/2} = -41 \pm 2$ mV ($n = 10$), das entspricht einer Verschiebung von +21 mV gegenüber dem Wildtyp und von -9 mV gegenüber der Mutante HCN1-N168D. Der Übergang von pH 7,3 zu pH 4,3 verschiebt $V_{1/2}$ um +39 mV auf -2 ± 5 mV ($n = 3$). Die pH-abhängige Veränderung von $V_{1/2}$ ist damit nur 4 mV größer als beim HCN-Wildtyp. Beim Ansäuern sinkt die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und damit z . Der Wert für z beträgt $3,7 \pm 0,4$ bei pH 7,3 ($n = 10$) und $2,0 \pm 0,2$ bei pH 4,3 ($n = 3$). Die pH-abhängige Veränderung von z ist damit etwas kleiner als beim Wildtyp und bei der Mutante HCN1-N168D.

Der Verlauf der pH-Abhängigkeit von z (siehe Abbildung 3-34 rechts) ähnelt dem des Wildtyps. Auch bei HCN1-N168E sinkt z stetig mit dem pH-Wert. Die pH-Abhängigkeit von $V_{1/2}$ zeigt sowohl zu kleinen, als auch zu großen pH-Werten hin ein Sättigungsverhalten. Eine Anpassung mit der Hill-Funktion (Gleichung 25) ergibt einen pK_S -Wert von 4,8.

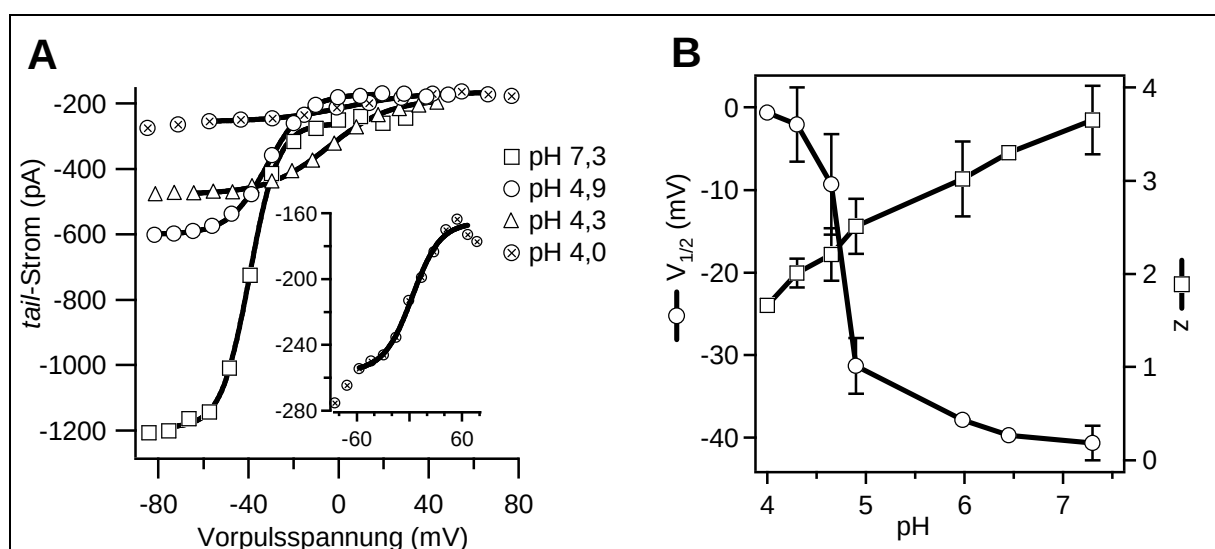


Abbildung 3-34: (A) Spannungsabhängigkeit der *tail*-Ströme von HCN1-N168E. Der Einschub zeigt die Daten zu pH 4,0 in größerer Auflösung. Die durchgezogenen Linien sind mit der Boltzmann-Gleichung berechnet worden, die entsprechenden Parameter sind in Tabelle 3-8 angegeben. (B) Einfluss des pH-Wertes auf die Parameter z und $V_{1/2}$ der Boltzmann-Gleichung. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen (pH 7,3 $n = 10$; pH 6,45 $n = 1$; pH 6,0 $n = 2$; pH 4,9 $n = 3$; pH 4,7 $n = 3$; pH 4,3 $n = 3$; pH 4,0 $n = 1$).

	pH 7,3	pH 4,9	pH 4,3	pH 4,0
$I_{\min}$	-262	-171	-186	-166
$I_{\max}$	-1192	-600	-478	-256
$V_{1/2}$	-39,5	-31,5	-4,3	3,1
z	4,0	2,9	1,9	1,6

Tabelle 3-8: Parameter der Boltzmann-Gleichung zu Abbildung 3-34.

Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskinetik

Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskonstanten τ_{akt} ist in Abbildung 3-35 unten links dargestellt. Es ergeben sich konkave Kurven, die ihr Maximum in der Nähe der jeweiligen Spannung $V_{1/2}$ annehmen. Zu negativen Spannungen hin ist τ_{akt} auch bei HCN1-N168E exponentiell von der Spannung abhängig. Um die Spannungsabhängigkeit genauer zu untersuchen, wurden die Daten in Abbildung 3-35 unten links mit der Gleichung 22.3 angepasst. Das geschah jeweils in dem Spannungsbereich, in dem mehr als 90% der Kanäle aktiviert waren.

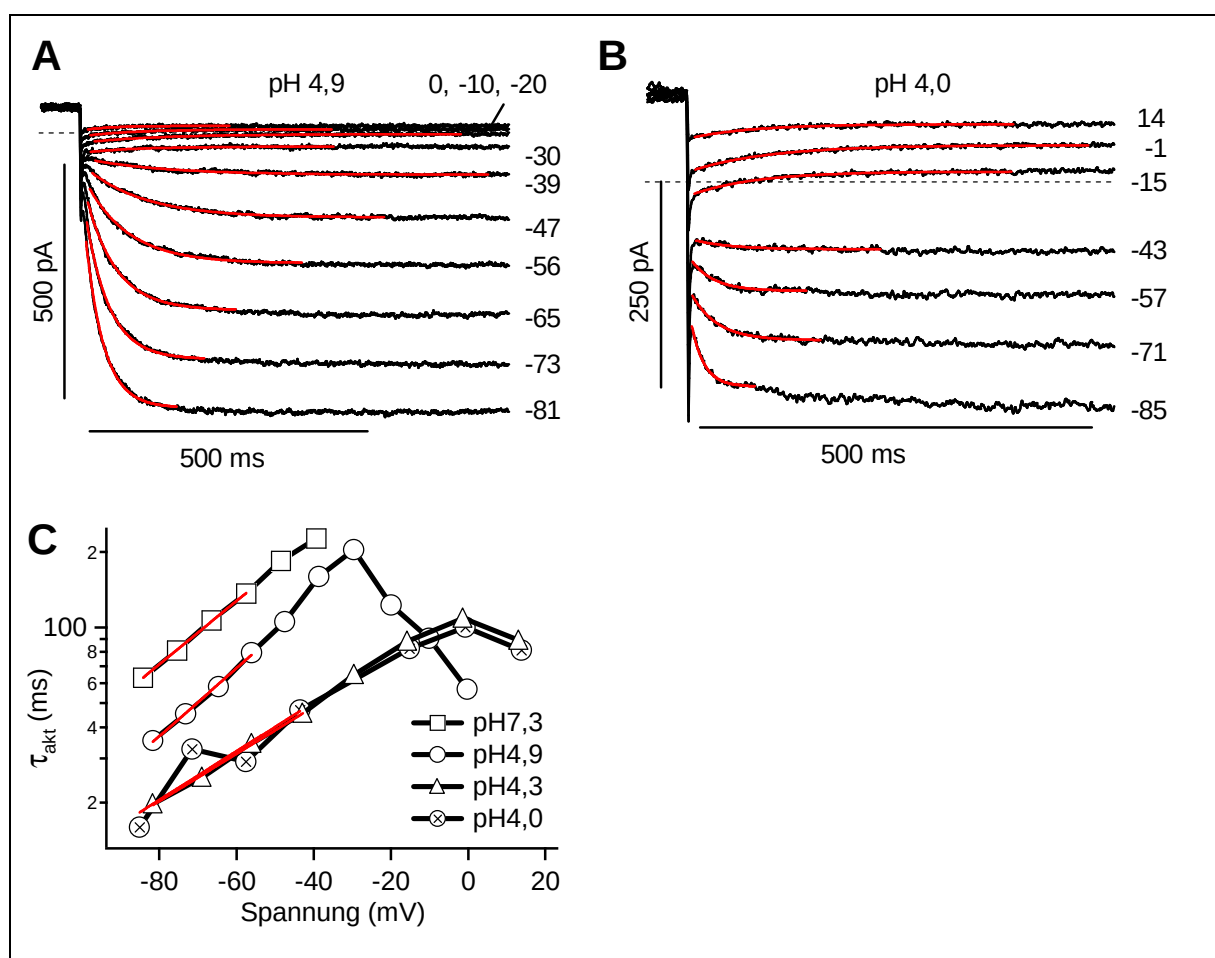


Abbildung 3-35: Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskinetik. (A und B) Stromantworten aus Abbildung 3-33 bei pH 4,9 (A) und pH 4,0 (B). Die Spannung ist rechts neben den Kurven in mV angegeben. Einfach exponentielle Anpassungen sind rot eingezeichnet. Die Dauer der Anpassung wurde iterativ auf 5τ festgelegt. Bei pH 4,0 konnte die Stromantwort nach dem Sprung auf -30 mV wegen der geringen Amplitude nicht angepasst werden. Die Stromspur wurde nicht eingezeichnet. (C) Spannungsabhängigkeit von τ_{akt} . Kurvenanpassungen (rot) nach Gleichung 22.3 wurden in einem Spannungsbereich vorgenommen, in dem mehr als 90 % der Kanäle aktiviert waren.

pH-Abhängigkeit der Aktivierungskinetik

Die Kurven für τ_{akt} bei pH 4,3 und pH 4,0 liegen übereinander, es scheint so, als ob der

Einfluss der Protonen auf die Aktivierungskinetik in diesem Konzentrationsbereich gesättigt ist. Der Messwert bei pH 4,0 und -71 mV fällt dabei aus der Reihe. Kurvenanpassungen nach Gleichung 22.3 an die τ_{akt} -V-Kurven (siehe Abbildung 3-36 A) ergaben eine pH-Abhängigkeit für z_{α} , bei der der Wert des Parameters zwischen pH 7,3 und pH 4,9 leicht wächst, und zwischen pH 4,9 und pH 4,3 deutlich absinkt (Abbildung 3-36 B). Zwischen pH 4,3 und pH 4,0 ändert sich z_{α} nur wenig. Ebenso wie τ_{akt} ändert sich auch der Wert von α_0 zwischen pH 4,9 und pH 4,3 deutlich und ist zwischen pH 4,3 und pH 4,0 praktisch konstant. Trotz der pH-Abhängigkeit von z_{α} verlaufen α_0 und $1/\tau_{\text{akt}}$ recht ähnlich (Abbildung 3-36 D). Aus der pH-Abhängigkeit aller drei Parameter z_{α} , α_0 und τ_{akt} lässt sich jeweils ein pK_S -Wert von etwa 4,8 abschätzen. Da das gezeigte Experiment das einzige ist, in dem Stromableitungen bei pH 4,0 aufgezeichnet werden konnten, wird das Sättigungsverhalten der Parameter für pH-Werte unterhalb von 4,3 nicht durch weitere Messungen bestätigt. Alle anderen Eigenschaften der pH-Abhängigkeit der Aktivierungskinetik, insbesondere die deutliche Änderung der Parameter z_{α} , α_0 und τ_{akt} zwischen pH 4,9 und pH 4,3 sind in mehreren Experimenten bestätigt worden.

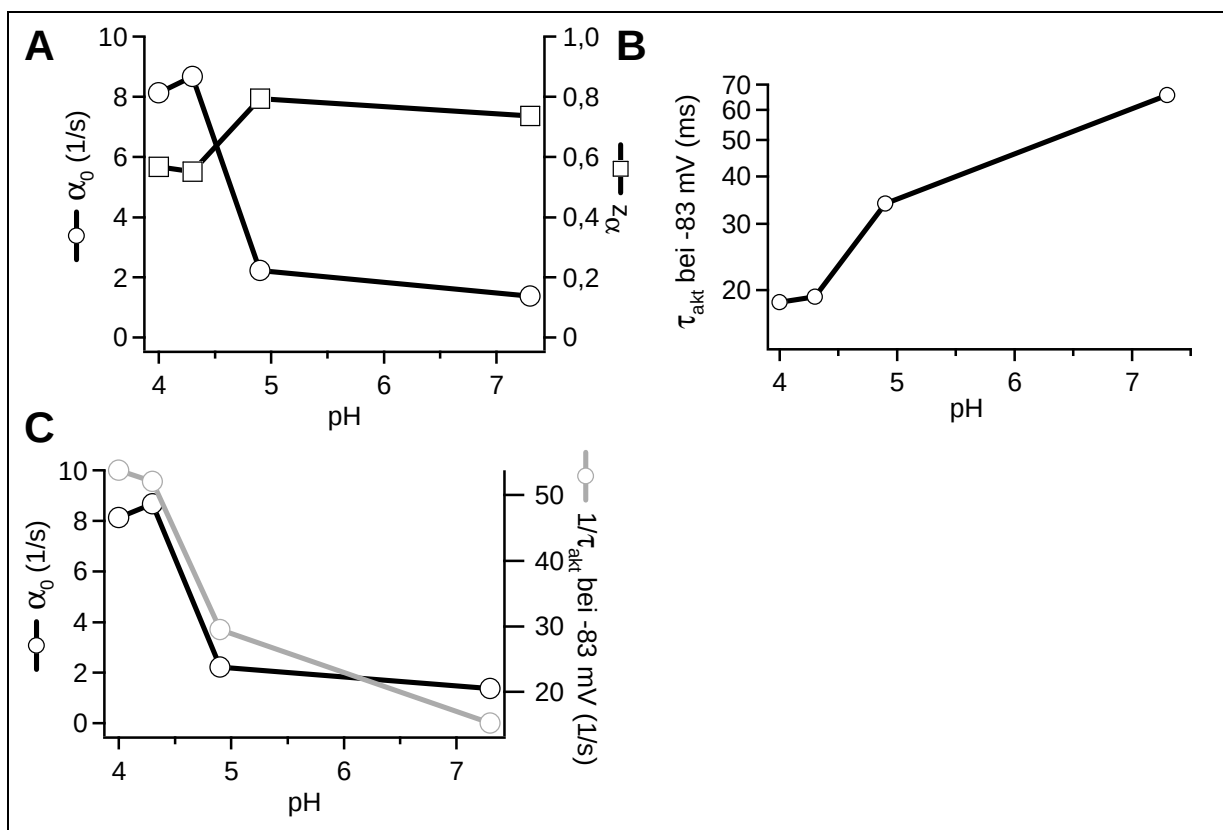


Abbildung 3-36: pH-Abhängigkeit der Aktivierungskinetik von der Mutante. (A) pH-Abhängigkeit der Parameter α_0 und z_{α} . (B) pH-Abhängigkeit von τ_{akt} bei -83 mV. Die Zeitkonstante der Aktivierung wurde aus den Daten in Abbildung 3-35 C interpoliert und über dem pH-Wert aufgetragen. (C) Vergleich der pH-Abhängigkeit von α_0 und $1/\tau_{\text{akt}}$.

pH-Abhängigkeit der Deaktivierungskinetik

In Abbildung 3-37 (A) sind *tail*-Ströme dargestellt, die den Verlauf der Deaktivierung nach dem Sprung von etwa -85 mV zur Haltespannung von $+30$ mV widerspiegeln. Einfach exponentielle Anpassungen sind rot eingezeichnet. Die entsprechenden Zeitkonstanten τ_{deakt} sind rechts in der Abbildung gegen den pH-Wert aufgetragen. Sinkt der pH-Wert von 7,3 auf 4,0, steigt τ_{deakt} um das 3,3fache. Bei der Interpretation des Graphen in Abbildung 3-37 A muss beachtet werden, dass bei pH 4,3 bzw. pH 4,0 etwa 7 % bzw. 15 % der Kanäle bei der Haltespannung nicht deaktiviert sind. Dadurch wird τ_{deakt} auch von der Aktivierungsrate (α) beeinflusst. Der Wert für τ_{deakt} ist daher etwas kleiner als das Inverse der Deaktivierungsrate ($1/\beta$). Berücksichtigt man den Einfluss von α mit Hilfe der Gleichungen, die für das Modell C=O gelten, so erhält man eine $1/\beta$ -pH-Kurve (siehe Gleichungen 4.2 und 7). Die Deaktivierungsrate zeigt für niedrige pH-Werte kein Sättigungsverhalten (graue Kurve in Abbildung 3-37 B).

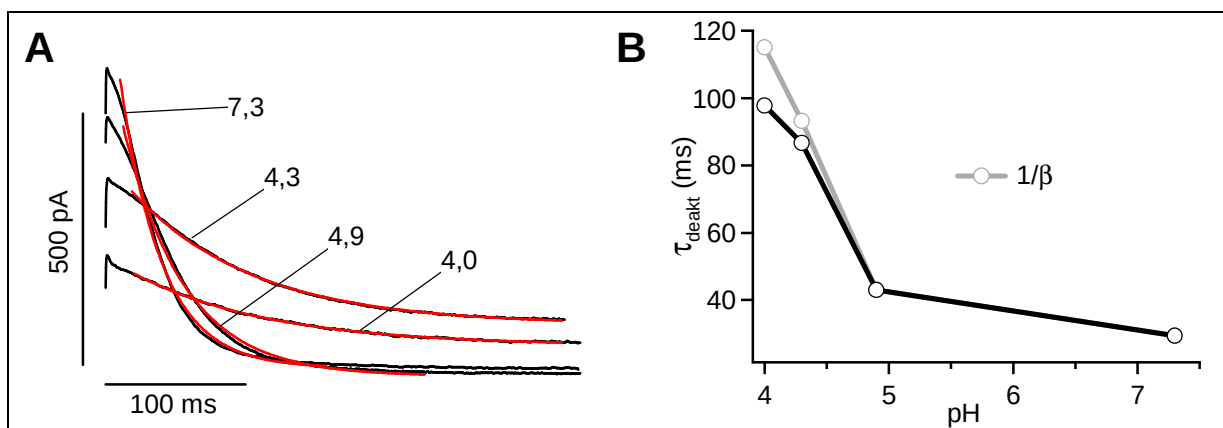


Abbildung 3-37: (A) *tail*-Ströme aus Abbildung 3-33, aufgenommen während der Deaktivierung nach dem Sprung von -90 mV auf $+30$ mV. Einfach exponentielle Anpassungen sind rot eingezeichnet. Die Länge des angepassten Intervalls beträgt 5τ (pH 7,3 und pH 4,9) bzw. 3τ (pH 4,3 und pH 4,0). (B) Die pH-Abhängigkeit der Zeitkonstanten. Die graue Kurve stellt das Inverse der Deaktivierungsrate dar (siehe Text).

3.3.3 Vergleich zwischen HCN1 und den Mutanten HCN1-N168D und HCN1-N168E

Das Asparagin an der Position 168 des HCN1-Kanals wurde gegen eine Asparaginsäure bzw. eine Glutaminsäure ausgetauscht, in der Hoffnung, dadurch die pH-Abhängigkeit der Kanaleigenschaften so zu verändern, dass Rückschlüsse auf den Protonensensor möglich sind. Der folgende Vergleich soll die Unterschiede zwischen den Eigenschaften der Wildtypkanäle und den Eigenschaften der Mutanten zusammenfassen. Insbesondere wird, wo das möglich ist, ein apparenter pK_S -Wert - oder eine obere bzw. untere Grenze für den pK_S -Wert - abgeschätzt, der die pH-Abhängigkeit des jeweiligen Parameters beschreibt.

Neutraler pH-Wert

In Lösungen mit pH 7,3 aktivieren die Mutanten bereits bei weniger negativen Spannungen, als der Wildtyp. Für HCN1-N168D ist $V_{1/2}$ um etwa +30 mV verschoben, für HCN1-N168E um etwa +21 mV. Diese Veränderungen sind vergleichbar mit dem Einfluss des pH-Wertes auf den Wildtyp, dort verschob sich $V_{1/2}$ beim Übergang von pH 7,3 zu pH 4,3 um +35 mV.

Auch der Wert der apparenten *gating*-Ladung $z \cdot q_e$ wird durch die Aminosäureaustausche N168E und N168D verändert. In neutralem pH beträgt der Wert für z bei beiden Mutanten etwa 3,6. Er ist damit 1,5 kleiner als für den Wildtyp ($z = 5,2$). Der Wert $z = 3,6$ wird beim HCN1-Wildtyp etwa bei pH 5,6 erreicht.

Bei neutralem pH unterscheiden sich die Zeitkonstanten τ_{akt} der beiden Mutanten nur geringfügig (siehe Abbildung 3-38 A). Beide aktivieren etwa 4,5 mal schneller, als der Wildtyp (siehe Abbildung 3-38 B). Die Aktivierungskinetik, die die Mutanten bei neutralem pH aufweisen, wird vom Wildtyp etwa bei pH 4,6 erreicht (siehe auch schwarze Strichlinie in Abbildung 3-38 B).

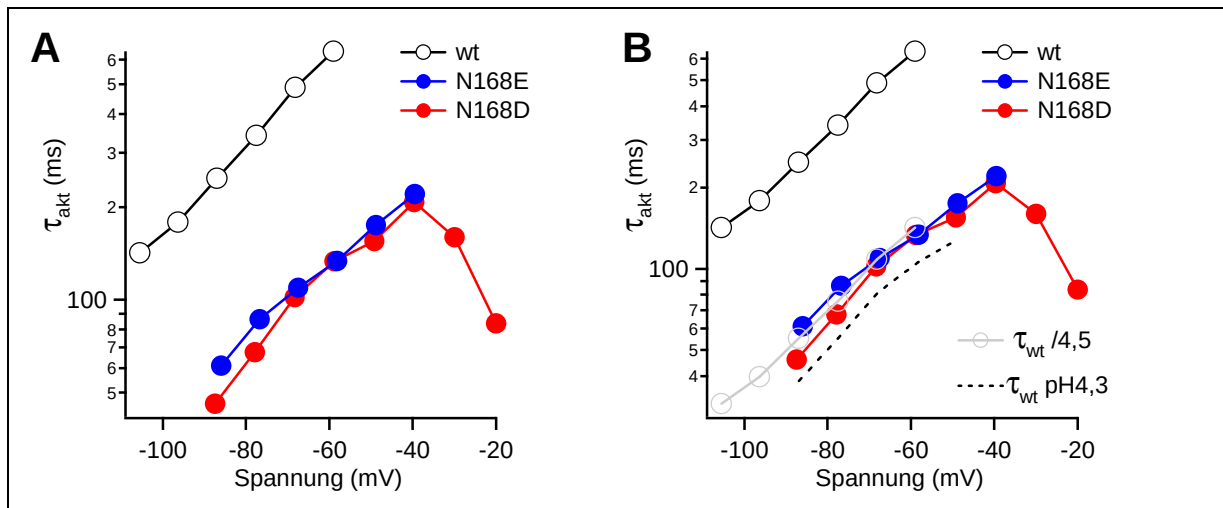


Abbildung 3-38: (A) Spannungsabhängigkeit der Aktivierungszeitkonstanten von HCN1-Wildtyp (wt) und den Mutanten HCN1-N168D und HCN1-N168E bei pH 7,3. (B) Zusätzlich zu den Daten des linken Graphen sind zwei Kurven eingefügt, die den Vergleich von Wildtyp und Mutanten unterstützen. Die Graue Kurve entsteht, wenn die Werte τ_{akt} des Wildtyps bei pH 7,3 durch 4,5 dividiert werden. Die schwarze Strichlinie stellt die τ_{akt} -V-Kurve des Wildtyps für pH 4,3 dar. Sie macht deutlich, dass der Wildtyp in sauren Lösungen ähnlich schnell aktiviert, wie die Mutanten bei pH 7,3. Die Zeitkonstanten anhand von Messungen bei 21 °C (HCN1-Wildtyp) bzw. 21,5-22 °C (Mutanten) bestimmt.

Bezüglich der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und der Aktivierungskinetik sind die Eigenschaften der Mutanten HCN1-N168D und HCN1-N168E bei neutralem pH denen des HCN1-Wildtyp-Kanals in sauren Lösungen recht ähnlich.

pH-Abhängigkeit

Halbmaximale Aktivierungsspannung - $V_{1/2}$

Die pH-Abhängigkeit wird dadurch charakterisiert, wie stark $V_{1/2}$ durch Protonen verschoben werden kann, und welchen apparenten pK_S -Wert dieser Effekt hat. Beim Übergang von pH 7,3 nach pH 4,3 verschiebt sich $V_{1/2}$ beim Wildtyp um +35 mV, bei der Mutante HCN1-N168E um +38 mV. Für den Wildtyp wurde $pK_S \leq 4,8$ geschätzt. Für HCN1-N168E lässt sich der pK_S -Wert recht genau bestimmen. Er beträgt 4,8. Anhand von pK_S -Wert und Stärke der Verschiebung von $V_{1/2}$ lässt sich kein Unterschied zwischen der pH-Abhängigkeit von $V_{1/2}$ beim HCN1-Wildtyp und bei HCN1-N168E feststellen.

Für die pH-Abhängigkeit von $V_{1/2}$ wird bei der Mutante HCN1-N168D $pK_S \leq 5,2$ geschätzt. Damit lässt sich nicht entscheiden, ob der pK_S -Wert der pH-Abhängigkeit von $V_{1/2}$ bei HCN1-Wildtyp und HCN1-N168D unterschiedlich sind. Die absolute Änderung von $V_{1/2}$ durch extrazelluläre Protonen wurde allerdings deutlich verändert. Während bei HCN1-Wildtyp durch das Ansäuern von pH 7,3 auf pH 4,3 eine Verschiebung vom +35 mV erreicht wird, beträgt die Verschiebung bei HCN1-N168D +90 mV.

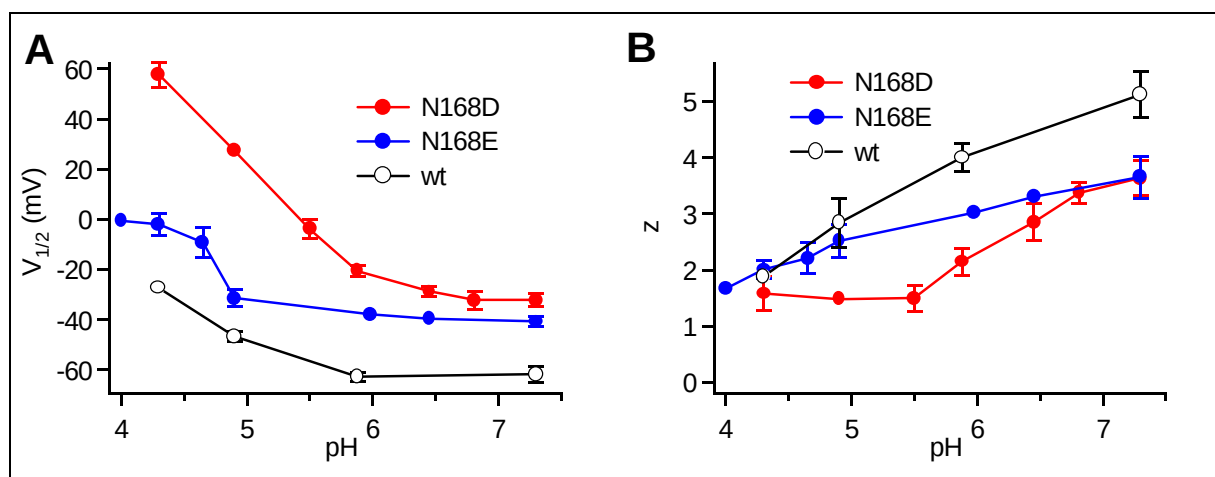


Abbildung 3-39: (A) Die pH-Abhängigkeit von $V_{1/2}$ bei HCN1-Wildtyp und den Mutanten HCN1-N168D und HCN1-N168E. (B) Die pH-Abhängigkeit von z bei HCN1-Wildtyp und den Mutanten HCN1-N168D und HCN1-N168E. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (wt: pH 7,3 $n = 6$; pH 5,9 $n = 5$; pH 4,9 $n = 4$; pH 4,3 $n = 2$; HCN1-N168D: pH 7,3 $n = 10$; pH 6,8 $n = 4$; pH 6,45 $n = 4$; pH 5,9 $n = 4$; pH 5,5 $n = 3$; pH 4,9 $n = 2$; pH 4,3 $n = 3$; HCN1-N168E: pH 7,3 $n = 10$; pH 6,45 $n = 1$; pH 6,0 $n = 2$; pH 4,9 $n = 3$; pH 4,7 $n = 3$; pH 4,3 $n = 3$; pH 4,0 $n = 1$). Für $n < 3$ sind keine Fehlerabschätzungen angegeben

Spannungsabhängigkeit der Aktivierung - z

Der Verlauf der pH-Abhängigkeit von z ist bei HCN1-Wildtyp und HCN1-N168E recht ähnlich (Abbildung 3-39 B). Wie beim Wildtyp lässt sich anhand der z -pH-Kurve auch bei der Mutante lediglich eine obere Grenze für den apparenten pK_S -Wert angeben, sie beträgt 5,2. Der geringe Unterschied zur Obergrenze des pK_S -Wertes beim Wildtyp (5,4) lässt keine Schlussfolgerungen zu. Die pH-Abhängigkeit von z bei HCN1-N168D unterscheidet sich dagegen deutlich von der des Wildtyps. Bei der Mutante ist z für pH-Werte unterhalb von pH 5,5 konstant. Die Untergrenze für den apparenten pK_S -Werte beträgt 6,2. Der apparente pK_S -Wert, der sich aus der pH-Abhängigkeit von z ergibt, verschiebt sich durch den Aminosäureaustausch N168D um mindestens +0,8. Interessant ist auch, dass sich aus der pH-Abhängigkeit von $V_{1/2}$ und z ganz unterschiedliche Abschätzungen für die entsprechenden pK_S -Werte ergeben ($pK_S \leq 5,2$ und $pK_S \geq 6,2$). Daraus schließe ich, dass die pH-Abhängigkeit von $V_{1/2}$ und z durch die Titration von mehreren unterschiedlichen Gruppen zustande kommt.

pH-Abhängigkeit der Aktivierungskinetik

Die pH-Abhängigkeit der Aktivierungskinetik wird anhand der Parameter α_0 , z_α und τ_{akt} charakterisiert (Abbildung 3-40 A bis C).

Beim HCN1-Wildtyp hängen nur die Werte von α_0 und τ_{akt} vom pH-Wert ab. Der Wert des Parameters z_α ist dagegen konstant. Die $1/\tau_{akt}$ -pH-Kurve und die α_0 -pH-Kurve verlaufen sehr ähnlich. Beide scheinen bei großen pH-Werten zu sättigen. Es lässt sich jeweils eine

Obergrenze für den apparenten pK_S -Wert abschätzen. Aus der $1/\tau_{akt}$ -pH-Kurve ergibt sich $pK_S \leq 4,9$ und aus der α_0 -pH-Kurve ergibt sich $pK_S \leq 4,8$.

Bei der Mutante HCN1-N168E ähnelt der Verlauf der pH-Abhängigkeit bei allen drei Parametern α_0 , z_α und τ_{akt} . Am stärksten ändern sich die Werte der Parameter zwischen pH 4,9 und pH 4,3. Sowohl oberhalb, als auch unterhalb dieses Bereiches ist ein Sättigungsverhalten zu erkennen. Damit lässt sich für alle drei Parameter ein apparenter pK_S abschätzen. Es ergibt sich jeweils ein Wert für pK_S zwischen 4,6 und 4,8.

Bei der Mutante HCN1-N168D ist der Parameter z_α stärker vom pH-Wert abhängig, als bei HCN1-Wildtyp oder HCN1-N168E. Mit sinkendem pH-Wert wird z_α stetig kleiner, ein pK_S -Wert kann nicht abgeschätzt werden. Der Parameter α_0 sinkt mit wachsendem pH-Wert. Da α_0 keine negativen Werte annehmen kann, lässt sich aus dem Verlauf der pH-Abhängigkeit von α_0 eine obere Grenze für den entsprechenden pK_S -Wert abschätzen. Man erhält $pK_S \leq 5,5$. Wie im Kapitel 3.2.1.1 erwähnt, wird bei der Mutante HCN1-N168D anstelle der Zeitkonstanten τ_{akt} bei -85 mV die äquivalente Zeitkonstante τ_{tail} verwendet. Die $1/\tau_{tail}$ -pH-Relation zeigt zu kleinen pH-Werten ein Sättigungsverhalten. Es lässt sich dadurch eine Untergrenze für den entsprechenden pH-Wert angeben. Man erhält: $pK_S \geq 6,8$. Die Unterschiede der Abschätzungen anhand der pH-Abhängigkeit von $1/\tau_{tail}$ und von α_0 ($pK_S \leq 5,5$), lassen vermuten, dass auch die pH-Abhängigkeit der Aktivierungskinetik durch die Titration von mehreren unterschiedlichen Gruppen zustande kommt. Die Abschätzungen beim HCN1-Wildtyp und der Mutante HCN1-N168E deuten dagegen nicht darauf hin, dass auch bei diesen Kanälen mehrere Gruppen protoniert werden.

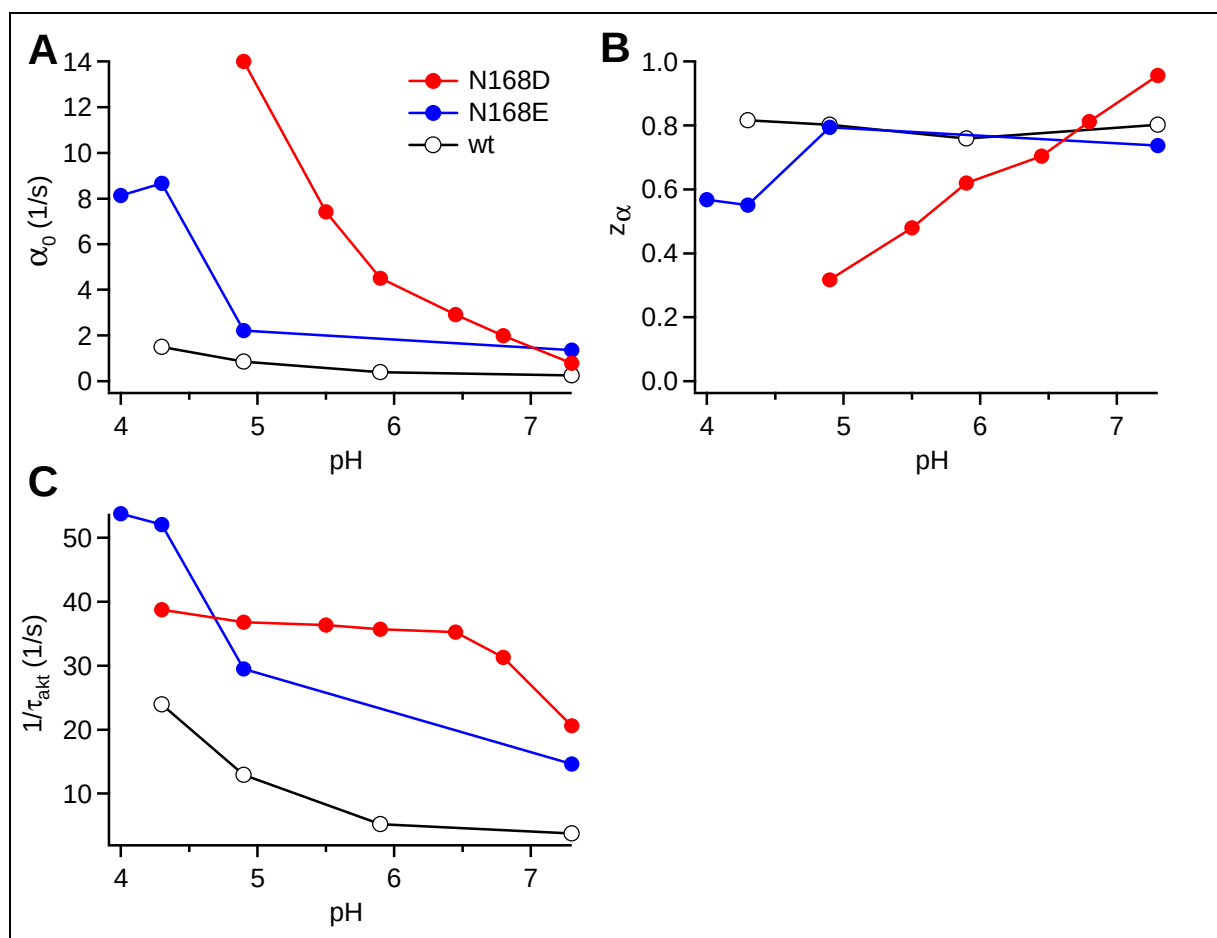


Abbildung 3-40: pH-Abhängigkeit der Aktivierungskinetik dargestellt anhand der Parameter α_0 (A) z_α (B) und $1/\tau_{akt}$ (C).

4 Diskussion

Es war das Ziel dieser Arbeit, die molekularen Ursachen der Modulation von HCN-Kanälen durch extrazelluläre Protonen aufzuklären. Dazu wurden der HCN1-Wildtyp und HCN1-Mutanten bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und die Kinetik von Aktivierung und Deaktivierung wurden durch die Parameter $V_{1/2}$, z , τ_{akt} , α_0 und z_α beschrieben. Bei einigen Mutanten unterscheidet sich die pH-Abhängigkeit dieser Parameter nur wenig von der pH-Abhängigkeit beim Wildtyp. Dagegen unterscheiden sich die Mutante HCN1-N168D sowie die Rettungsmutanten HCN1-D172N/R259Q und HCN1-D222N/R259Q sehr deutlich vom HCN1-Wildtyp. Aus den Eigenschaften dieser Mutanten können wichtige Informationen über den gesuchten Protonensensor gewonnen werden.

4.1 HCN1-N168D

Durch den Aminosäureaustausch N168D wurde im S2-Segment eine negative Ladung eingeführt. Trotzdem entsprechen die Eigenschaften von HCN1-N168D in etwa denen eines teilweise protonierten HCN1-Wildtyps, obwohl die Anzahl der negativen Ladungen durch die Protonierung verringert wird. Möglicherweise befindet sich die eingeführte Asparaginsäure in unmittelbarer Nähe des Protonensensors, oder, wenn es mehrere Protonensensoren gibt, in unmittelbarer Nähe mindestens eines Protonensensors. Durch die Erhöhung der lokalen Protonenkonzentration in der Umgebung der eingeführten negativen Ladung würde dann der apparente pK_S -Wert des Protonensensors erhöht. Ein Sensor in der Nähe der eingeführten Ladung wäre schon bei pH 7,3 teilweise protoniert und dadurch wären die Eigenschaften von HCN1-N168D bei pH 7,3 und HCN1-Wildtyp bei saurem pH vergleichbar. Für diese Theorie, dass durch den Aminosäureaustausch N168D der apparente pK_S -Wert mindestens eines Protonensensors erhöht wird, sprechen auch die geschätzten pK_S -Werte für die Mutante HCN1-N168D. Aus der pH-Abhängigkeit von z und $1/\tau_{akt}$ ergeben sich für HCN1-N168D Abschätzungen von $pK_S > 6,2$ bzw. $pK_S > 6,8$. Für den Wildtyp ergeben sich aber Abschätzungen von $pK_S < 5,4$ bzw. $pK_S < 4,9$.

Bei der Mutante HCN1-N168D ändern sich z und $V_{1/2}$ in unterschiedlichen pH-Bereichen. Das lässt sich nur erklären, wenn man annimmt, es gäbe mindestens zwei protonierbare Gruppen, mit unterschiedlichen apparenten pK_S -Werten. Dabei ergibt sich das folgende Bild:

1. Bei der Titration würde demnach zuerst eine Gruppe mit einem apparenten pK_S -Wert oberhalb von 6,2 protoniert. Dabei werden z und τ_{akt} kleiner, $V_{1/2}$ verschiebt sich

etwas zu positiven Werten hin und die Deaktivierungszeitkonstante τ_{deakt} verändert sich nicht (siehe Abbildungen 3-39 und 3-40).

- Bei pH-Werten unterhalb von 6 wird dann eine zweite Gruppe protoniert. $V_{1/2}$ wird noch deutlich positiver. Außerdem ist im Bereich unterhalb von pH 6 auch die Deaktivierungskinetik pH-abhängig, τ_{deakt} steigt deutlich an. Die Parameter z und τ_{akt} ändern sich dagegen nicht weiter (siehe Abbildungen 3-39 und 3-40).

Kann man anhand der Veränderung der einzelnen Parameter vielleicht bestimmen, welche Zustände des Kanals durch die Titration beeinflusst werden? Man kann versuchen, anhand des Markov-Modells für HCN-Kanäle (Altomare et al., 2001) die Änderung der Parameter auf Änderungen ganz bestimmter Übergänge oder Zustände zurückzuführen.

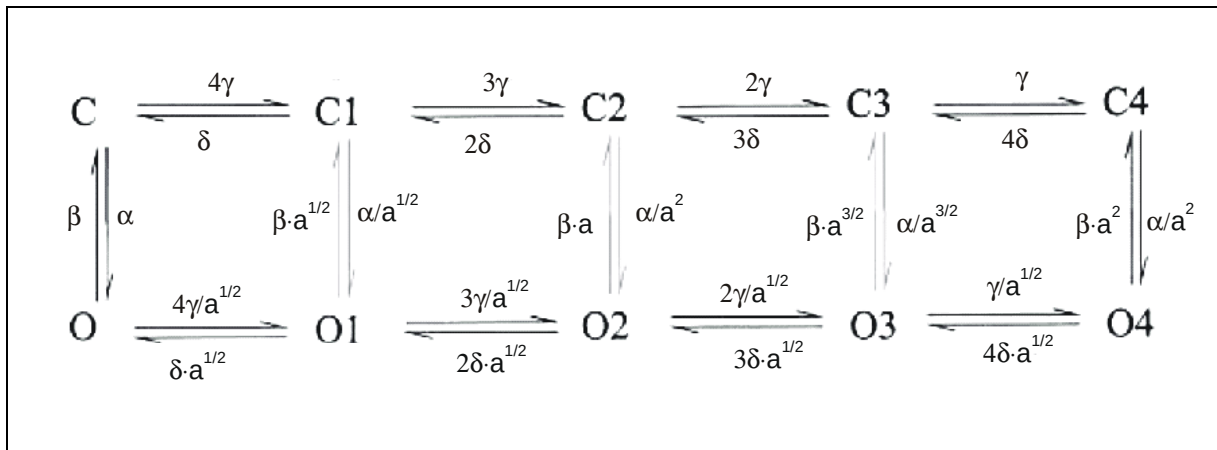


Abbildung 4-1: Zustandsmodell für HCN-Kanäle (Altomare et al, 2001). Zur Erläuterung siehe Abbildung 2-5. Die weniger häufig auftretenden Übergänge sind grau eingezeichnet. Da die Aktivierung vorwiegend entlang $C \rightarrow C1 \rightarrow C2 \rightarrow C3 \rightarrow C4 \rightarrow O4$ stattfindet, kann man C auch als „tief deaktivierten“ Zustand bezeichnen. In diesem Sinne ist C4 einem Offenzustand unmittelbar benachbart. Für die Zustände C bis C3 gilt das nicht, da die Übergänge $C \rightarrow O$, $C1 \rightarrow O1$ usw. viel weniger wahrscheinlich sind als $C4 \rightarrow O4$.

Dabei gehe ich auch an dieser Stelle davon aus, dass die Aktivierung vorwiegend durch den Übergang $C4 \rightarrow O4$ stattfindet und die Deaktivierung überwiegend durch den Übergang $O \rightarrow C$ stattfindet (siehe auch Abbildung 4-1). Ich beginne mit dem ersten postulierten Titrationschritt. Im Kapitel 3.1.2 wurde bereits diskutiert, dass der Wert des Parameters z abnimmt, wenn die Aktivierung eines Kanals im Mittel von immer weniger tief deaktivierten Zuständen aus stattfindet. Beim ersten Titrationschritt nimmt z ab. Bei einer festen Haltespannung sind demnach immer weniger Kanäle in den Zuständen C und C1 und dafür immer mehr Kanäle in den Zuständen C3 und C4. Übergänge, die vom tief deaktivierten Zustand C in Richtung des weniger tief deaktivierten Zustandes C4 führen, laufen bei einer festen Haltespannung also leichter ab, wenn die erste Gruppe protoniert ist. Die Kinetik des Öffnungsschrittes $C4 \rightarrow O4$

sollte sich allein dadurch aber nicht verändern. Um zu erklären, warum τ_{akt} bei der Titration der ersten Gruppe kleiner wird, muss man zusätzlich annehmen, dass auch der Übergang $\text{C4} \rightarrow \text{X}$ durch die Titration begünstigt wird. Wie schon in Kapitel 3.1.2 steht X hier für den „angeregten“ Übergangszustand, über den der Kanal den Zustand O4 erreicht. Warum wird nun $\text{C4} \rightarrow \text{X}$ durch die Titration begünstigt? Nimmt die Energie des Kanals im Zustand C4 zu, so dass dieser Zustand „instabiler“ wird? Oder ändern sich die energetischen Verhältnisse des Zustands C4 nicht – wird vielmehr die Energie im Zustand X verringert? Bei der Beantwortung dieser Frage hilft es, die pH-Abhängigkeit der Deaktivierungskinetik zu betrachten. Im ersten Titrationsschritt wird τ_{deakt} nicht verändert, d.h. β hängt nicht vom pH-Wert ab. Unter der Annahme, dass der Parameter a , der die Kooperativität des Öffnungsschrittes beschreibt, auch nicht vom pH-Wert abhängt, ist auch $\beta \cdot a^2$ konstant. Mit anderen Worten, die Differenz der inneren Energie des Kanals im Zustand X und der inneren Energie des Kanals im Zustand O4 ändert sich beim Titrieren nicht. Wahrscheinlich ist also die innere Energie im Zustand X auch nicht pH-abhängig und die Abnahme von τ_{akt} im Verlauf der Titration wird über eine Erhöhung der inneren Energie des deaktivierten Zustands O4 verursacht. Man könnte auch sagen, bei der Titration der ersten Gruppe, oberhalb von pH 6 werden die deaktivierten Zustände destabilisiert. Auch die Verschiebung von $V_{1/2}$ zu weniger negativen Spannungen lässt sich dadurch erklären.

Die Ladung $z \cdot q_e$, die im Mittel bei der Aktivierung eines Kanals über die Membran bewegt wird, ändert sich im zweiten Abschnitt der Titration nicht mehr. Man könnte das so interpretieren, dass alle deaktivierten Kanäle bereits in dem deaktivierten Zustand sind, der einem aktivierten Zustand unmittelbar benachbart ist (Zustand C4). Mit anderen Worten: es ist nicht möglich, die Schaltladung noch weiter zu verschieben, ohne den Kanal zu öffnen. Ebenso wie z , ist auch τ_{akt} beim zweiten Schritt der Titration stabil. Die Energie, die aufgebracht werden muss, um den Kanal von C4 in den Übergangszustand X zu bringen bleibt demnach konstant. Der Anstieg von τ_{deakt} und die starke Verschiebung von $V_{1/2}$ zu positiveren Spannungen lässt sich deshalb nur durch eine Stabilisierung des aktivierten Zustandes erklären.

Die Ergebnisse für die Mutante HCN1-N168D können so gedeutet werden, dass mindestens zwei protonierbare Gruppen existieren. Eine protonierbare Gruppe wird oberhalb von pH 6 titriert, die Titration führt zur Destabilisierung der deaktivierten Zustände. Eine weitere Gruppe wird unterhalb von pH 6 titriert und diese Titration stabilisiert die aktivierten Zustände. Was kann man noch über diese protonierbaren Gruppen aussagen? Handelt es sich um die Gruppen, die auch im Wildtypkanal titriert werden? Oder spiegelt die pH-

Abhängigkeit der Parameter möglicherweise die Titration der eingefügten Aminosäure (D168) wider? Es wurde bereits im Resultatteil erwähnt, dass die Seitenketten der Asparaginsäure (D) und des Asparagins (N) ähnlich groß sind. Würde jetzt durch die Protonierung der Säure auch noch der Ladungsunterschied beseitigt, dann sollten sich die Eigenschaften von HCN1-Wildtyp und HCN1-N168D einander annähern. Das Gegenteil wird aber beobachtet. Je niedriger der pH-Wert ist, desto deutlicher unterscheiden sich Mutante und Wildtyp. Ich vermute daher nicht, dass sich die Eigenschaften der Mutante ändern, weil D168 protoniert wird. Vielmehr werden wahrscheinlich in der Mutante die gleichen Gruppen protoniert wie im Wildtyp. Dabei ist allerdings der apparente pK_S -Wert mindestens einer der Gruppen durch den Aminosäureaustausch erhöht worden. Welche Gruppe könnte das sein? Und wieso zieht der Aminosäureaustausch N168E keine so starken Änderungen der pK_S -Werte nach sich?

Wie oben erwähnt, kann der apparente pK_S -Wert eines Protonensensors durch enge Nachbarschaft zur eingeführten negativen Ladung D168 erhöht werden. Die Tatsache, dass der Austausch N168E keine signifikante Verschiebung der apparenten pK_S -Werte verursacht, weist in die gleiche Richtung. Die Seitenkette der Glutaminsäure ist eine Methylgruppe länger als die der Asparaginsäure. Wahrscheinlich reicht diese Verlängerung aus, um die Carboxylgruppe am Ende der Seitenkette weiter weg von abstoßenden, benachbarten negativen Gruppen zu positionieren. Die Carboxylgruppe der Glutaminsäure kommt dem sicherlich ebenfalls negativen Protonensensor wahrscheinlich nicht so nahe wie die Carboxylgruppe der Asparaginsäure. Das reicht aus, um die Verschiebung des apparenten pK_S -Wertes des Protonensensors signifikant zu verringern. Der betreffende Protonensensor muss also ganz in der Nähe der Position 168 liegen. Sucht man in der Abbildung 3-14 nach negativ geladenen Aminosäuren, die im Protein in der Nähe der Position 168 liegen könnten, fällt sofort D172 auf. Sollte das S2 Segment eine α -Helix bilden, dann liegt D172 nur eine Windung nach D168, beide Aminosäuren befinden sich auf derselben Seite der Helix. Der Abstand der α -Kohlenstoffatome der beiden Aminosäuren beträgt damit weniger als 0,7 nm. Die Verwandtschaft zwischen HCN- und EAG-Kanälen liefert Hinweise auf eine weitere möglicherweise benachbarte Asparaginsäure. Im EAG-Kanal befindet sich an der Stelle in S2, die homolog zur Position 172 im rHCN1 ist, auch eine Asparaginsäure. Diese bildet im EAG gemeinsam mit einer Asparaginsäure im S3 (homolog zu D222 in rHCN1) eine Bindestelle für Mg^{2+} -Ionen. Ein Mg^{2+} -Ion wird dabei durch die beiden negativen Ladungen koordiniert (Silvermann et al., 2000). Die Ladungen können sich also sehr nahe kommen. Es ist durchaus möglich, dass sich die entsprechenden negativen Ladungen auch im HCN-Kanal sehr nahe

kommen können. Damit wäre also möglicherweise D222 in der Nähe von D172 und damit auch in der Nähe von D168. Alle anderen Protonensensor-Kandidaten befinden sich im Kanal vermutlich weiter weg von der Position 168. Die besten Kandidaten für den gesuchten Protonensensor sind damit die Aminosäuren D172 und D222. Leider führte der Austausch dieser Asparaginsäuren gegen andere Aminosäuren zu nicht-funktionellen Kanälen. Die Auswirkungen dieser Aminosäureaustausche konnten daher nur indirekt, in den Rettungsmutanten HCN1-D172N/R259Q und HCN1-D222N/R259Q untersucht werden.

4.2 Die Rettungsmutanten

Bevor die Eigenschaften der Rettungsmutanten im Hinblick auf die Aminosäureaustausche D222N und D172N bewertet werden können, muss geklärt werden, welchen Einfluss der Aminosäureaustausch R259Q hat. Leider konnte im Rahmen dieser Arbeit die Mutante HCN1-R259Q nicht untersucht werden. Chen und Mitarbeiter untersuchten jedoch die entsprechende Mutante des HCN2 (Chen et al., 2000). Es stellte sich heraus, dass der Austausch R312Q auf dem verwendeten Hintergrund ($\Delta 2-130$ -HCN2) nur zu einer leichten Verschiebung von $V_{1/2}$ (+10 mV) und einer Reduktion von z (von 3,3 auf 2,4) führt. Die Zweifachmutante HCN1-D222N/R259Q war demgegenüber im untersuchten Spannungsbereich stets geöffnet. Auch bei der zweiten Rettungsmutante HCN1-D172N/R259Q waren bei einer Haltespannung von +60 mV noch mehr als 80 % der Kanäle geöffnet. Es konnte nicht geklärt werden, ob es durch Depolarisation der Membran überhaupt möglich ist, diese Mutanten zu schließen. Aus den geringen Änderungen der Kanaleigenschaften, die der Aminosäureaustausch R312Q bei mHCN2 (homolog zu R259Q bei rHCN1) hervorruft, schließe ich, dass die Aminosäureaustausche D172N bzw. D222N dazu führen, dass ein Großteil der Mutanten-Kanäle bei +60 mV geöffnet ist. Weist das darauf hin, dass D172 und D222 die gesuchten Protonensensoren des HCN1-Kanals sind? Bei den Rettungsmutanten hängt die Offenwahrscheinlichkeit kaum von der Spannung ab. Deshalb konnte auch nicht untersucht werden, ob der pH-Wert einen Einfluss auf die P_O -V-Relation hat. Es lässt sich daher nicht direkt entscheiden, ob die Aminosäureaustausche D172N und D222N den gesuchten Protonensensor entfernt haben. Wäre das der Fall, dann sollten die Rettungsmutanten etwa die gleichen Eigenschaften haben wie der vollständig protonierte Wildtyp-Kanal. Bei solchen pH-Werten, bei denen elektrophysiologische Messungen an HEK 293-Zellen möglich sind ($\text{pH} > 4$), ist der Protonensensor des HCN1-Kanals leider nicht vollständig protoniert. Die Beschleunigung der Aktivierung und die Verschiebung von $V_{1/2}$ zu positiveren Spannungen durch extrazelluläre Protonen zeigen aber beim Wildtyp auch bei pH 4,3 noch kein Sättigungsverhalten. Es ist daher durchaus möglich, dass die vollständige Titration des

Protonensensors zu Kanälen führt, die so wie die Rettungsmutanten, bei +60 mV kaum geschlossen sind.

Im letzten Abschnitt hatte ich die Vermutung aufgestellt, dass bei der Mutante HCN1-N168D die gleichen Gruppen protoniert werden, wie beim Wildtyp, und dass mindestens eine dieser Gruppen in der Mutante bei größeren pH-Werten titriert wird als das beim Wildtyp der Fall ist. Dementsprechend wäre HCN1-N168D bei pH 4,3 ein gutes „Modell“ für den vollständig protonierten Wildtyp. Die Ströme durch HCN1-N168D-Kanäle bei pH 4,3 sind denen durch die Mutante HCN1-D172N/R259Q sehr ähnlich. In beiden Fällen ist ein Großteil der Kanäle bei +60 mV geöffnet. Der kleine Anteil geschlossener Kanäle wird nach einem Spannungssprung zu -90 mV relativ schnell aktiviert.

Sowohl die Eigenschaften von HCN1-N168D als auch die der Rettungsmutanten weisen darauf hin, dass die Aminosäuren D172 und D222 zum gesuchten Protonensensor des HCN1-Kanals gehören.

5 Zusammenfassung

Hyperpolarisationsaktivierte und zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle (HCN-Kanäle) spielen eine wichtige Rolle bei der Erzeugung rhythmisch aktiver Prozesse im Herzen und in vielen Nervenzellen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass diese Kanäle auch in einer Gruppe von Geschmackszellen vorkommen und dort an der depolarisierenden Antwort auf saure Stimuli beteiligt sind. Unter Sauerstimulation ($< \text{pH } 6$) aktivieren HCN-Kanäle schneller und bei weniger negativen Spannungen. Die molekularen Grundlagen dieser pH-Abhängigkeit sind noch unbekannt. Es war das Ziel dieser Arbeit, diese Fragestellung zu untersuchen.

Durch zielgerichtete Mutagenese wurden neun verschiedene negativ geladene Aminosäuren im HCN1-Kanal neutralisiert. Die Eigenschaften der Mutanten wurden in einem heterologen Expressionssystem elektrophysiologisch untersucht. Die Aktivierungseigenschaften wurden anhand der Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit sowie anhand der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik charakterisiert. Nicht alle dieser Mutanten bildeten funktionelle Kanäle. Die Untersuchung ergab, dass die funktionellen Mutanten im Vergleich zum Wildtypkanal ähnlich stark durch Protonen beeinflusst werden. Für zwei der nichtfunktionellen Mutanten konnte die Kanalfunktion „gerettet“ werden, indem ein weiterer Aminosäureaustausch im S4-Segment vorgenommen wurde. Es handelt sich dabei um die Aminosäuren D172 (in S2) und D222 (in S3), die jeweils zusammen mit dem Arginin R259 (in S4) neutralisiert wurden. Die Doppelmutanten waren funktionell, ihre Aktivierungseigenschaften unterschieden sich jedoch massiv von denen des Wildtypkanals. Tatsächlich waren diese Mutanten über den gesamten untersuchten Spannungsbereich fast vollständig geöffnet, ein Zustand, der dem des vollständig protonierten Wildtypkanals entsprechen könnte. Diesen können wir leider experimentell nicht erfassen, da die Zellen pH-Werte unterhalb von 4 nicht tolerieren. Die Ergebnisse machen es aber wahrscheinlich, dass D172 und D222 Teile des gesuchten Protonensensors darstellen.

In einem zweiten Ansatz, die pH-Abhängigkeit der HCN-Kanäle zu untersuchen, wurde das Asparagin N168 in S2 durch eine zusätzliche negativ geladene Aminosäure ersetzt, einmal durch Asparaginsäure (N168D) und einmal durch Glutaminsäure (N168E). In diesen Mutanten sind Spannungsabhängigkeit und auch pH-Abhängigkeit einiger Parameter deutlich verschieden von denen des Wildtypkanals. Schätzt man pK_S -Werte aus den verschiedenen pH-Abhängigkeiten ab, so erhält man größere Werte als beim Wildtyp. Ich interpretiere diese Ergebnisse so, dass die neu eingeführte negative Ladung die dielektrischen Eigenschaften in der Umgebung des Protonensensors so verändert, dass sich dessen pK_S -Wert verschiebt. Der gesuchte Protonensensor sollte also in der Nähe der Position 168 liegen. Das ist für D172 der Fall, wahrscheinlich auch für D222. Ich schließe aus den Ergebnissen, dass D172 und D222 mit großer Wahrscheinlichkeit den gesuchten Protonensensor des HCN1-Kanals bilden.

6 Abstract

Hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated ion channels (HCN) mediate an inward cation current that contributes to spontaneous rhythmic activity in the heart and the brain. In a subset of taste cells HCN channels contribute to the depolarizing response evoked by sour stimuli. The gating properties of HCN channels are dramatically altered if extracellular pH drops below 6. Channel activation at low pH is much faster and occurs at less negative potentials than at neutral pH. The underlying molecular mechanism of the pH sensitivity has not been determined. The aim of this work was to identify the proton sensor(s) of the rHCN1 channel and to elucidate the mechanism that couples proton binding to the alteration of gating properties.

Site-directed mutagenesis was employed to neutralize nine different negatively charged amino acids that could serve as pH-sensor. Mutants were heterologously expressed in HEK293 cells and characterized with electrophysiological methods. Gating properties were quantified by the voltage dependence of open probability (P_O -V-relation) and time constants of activation and deactivation. For none of the functional mutants the pH dependence of these parameters was abolished. Five of the nine targeted residues could not be changed without a loss of function. For D172N in S2 and D222N in S3 this loss was reversed by a second amino acid exchange in S4 (R259Q). The double mutants were functional. However, their P_O -V-relation and activation kinetics were significantly different from wildtype properties in a way that resembles the effect of complete protonation of the wildtype channel. Unfortunately it is not possible to protonate the pH-sensor in wildtype channels completely within the pH-range that is tolerated by the HEK293 cells ($pH > 4.0$). Although a direct comparison between a completely protonated wildtype and the double mutants is therefore not possible, these results indicate that D172 and D222 are part of the proton sensor in HCN1 channels.

In a further attempt to alter the pH dependence of the channel, N168 in S2 was replaced by an aspartate or a glutamate. Again the pH dependence of the P_O -V-relation and the pH dependence of activation and deactivation time constants was quantified and apparent pK_S values were estimated. For some of the parameters the apparent pK_S values estimated for the mutant HCN1-N168D were significantly larger than those estimated for the wildtype. I conclude that the introduced negative charge influenced the apparent pK_S value of a nearby proton sensor. This effect might be caused by local accumulation of protons around the negative group of the aspartate's side chain. Based on that interpretation a proton sensor should be close to N168 in the wildtype channel. The aspartate D172 is located very close to position 168 and so is probably also D222. Based on the results of two different approaches, residues D172 and D222 are probably proton sensors of HCN-wildtype channels.

7 Literaturverzeichnis

(1993) *The Axon Guide* Axon Instruments Inc., Foster City.

Aggarwal,S.K. & MacKinnon,R. (1996) Contribution of the S4 segment to gating charge in the *Shaker* K⁺ channel. *Neuron*, **16**, 1169-1177.

Almers,W. (1978) Gating currents and charge movements in excitable membranes. In Adrian,R.H., Helmreich,E., Holzer,H., Jung,R., Kraye,O., Linden,R.J., Lynen,F., Miescher,P.A., Piiper,J., Rasmussen,H., Renold,A.E., Trendelenburg,U., Ullrich,K., Vogt,W. & Weber,A. (eds), *Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 96-190.

Altomare,C., Bucchi,A., Camatini,E., Baruscotti,M., Viscomi,C., Moroni,A. & DiFrancesco,D. (2001) Integrated allosteric model of voltage gating of HCN channels. *J.Gen.Physiol.*, **117**, 519-532.

Attwell,D. & Wilson,M. (1980) Behavior 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 the 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. *Nature Neurosci.*, **3**, 133-141.

Bell,D.C., Yao,H., Saenger,R.C., Riley,J.H. & Siegelbaum,S.A. (2004) Changes in Local S4 Environment Provide a Voltage-sensing Mechanism for Mammalian Hyperpolarization-activated HCN Channels. *J Gen Physiol*, **123**, 5-20.

Brown,H. & DiFrancesco,D. (1980) Voltage-clamp investigations of membrane currents underlying pace-maker activity in rabbit sino-atrial node. *J Physiol*, **308**, 331-351.

Brown,H.F., DiFrancesco,D. & Noble,S.J. (1979) How does adrenaline accelerate the heart? *Nature*, **280**, 235-236.

Chen,J., Mitcheson,J.S., Lin,M. & Sanguinetti,M.C. (2000) Functional roles of charged residues in the putative voltage sensor of the HCN2 pacemaker channel. *J.Biol.Chem.*

- Chen, J., Mitcheson, J.S., Tristani-Firouzi, M., Lin, M. & Sanguinetti, M.C. (2001) The S4-S5 linker couples voltage sensing and activation of pacemaker channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **98**, 11277-11282.
- Cho, W.J., Drescher, M.J., Hatfield, J.S., Bessert, D.A., Skoff, R.P. & Drescher, D.G. (2003) Hyperpolarization-activated, cyclic AMP-gated, HCN1-like cation channel: the primary, full-length HCN isoform expressed in a saccular hair-cell layer. *Neuroscience*, **118**, 525-534.
- Clapham, D.E. (1998) Not so funny anymore: pacing channels are cloned. *Neuron*, **21**, 5-7.
- Corey, D.P. & Stevens, C.F. (1983) Science and technology of patch-recording electrodes. In Sakmann, B. & Neher, E. (eds), *Single Channel Recording*. Plenum Press, New York and London, pp. 53-68.
- DiFrancesco, D. (1985) The cardiac hyperpolarizing-activated current, i_f . Origins and developments. *Prog.Biophys.Molec.Biol.*, **46**, 163-183.
- DiFrancesco, D. & Tortora, P. (1991) Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature*, **351**, 145-147.
- DiFrancesco, D. (1993) Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu.Rev.Physiol.*, **55**, 455-472.
- Edman, Å., Gestrelus, S. & Grampp, W. (1987) Current activation by membrane hyperpolarization in the slowly adapting lobster stretch receptor neurone. *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, Ca^{2+} blockage, and ionic selectivity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **91**, 1109-1113.
- Fain, G.L., Quandt, F.N., Bastian, B.L. & Gerschenfeld, H.M. (1978) Contribution of a caesium-sensitive conductance increase to the rod photoresponse. *Nature*, **272**, 467-469.
- 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.
- Graham, F.L. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adeno virus type 5. *J.Gen.Virol.*, **36**, 59-72.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.*, **391**, 85-100.
- 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.

- Henrikson,C.A., Xue,T., Dong,P., Sang,D., Marban,E. & Li,R.A. (2003) Identification of a surface charged residue in the S3-S4 linker of the pacemaker (HCN) channel that influences activation gating. *J Biol.Chem.*, **278**, 13647-13654.
- 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* Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- Hille,B. (2001) *Ionic channels of excitable membranes* Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- 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.
- Jiang,Y., Lee,A., Chen,J., Ruta,V., Cadene,M., Chait,B.T. & MacKinnon,R. (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, **423**, 33-41.
- 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. (1995) Family of cyclic nucleotide gated ion channels. *Curr.Opinion Neurobiol.*, **5**, 434-442.
- Kaupp,U.B. & Seifert,R. (2001) Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu.Rev.Physiol.*, **63**, 235-257.
- 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.
- Lesso,H. & Li,R.A. (2003) Helical secondary structure of the external S3-S4 linker of pacemaker (HCN) channels revealed by site-dependent perturbations of activation phenotype. *J Biol.Chem.*, **278**, 22290-22297.
- Liu,D.T., Tibbs,G.R. & Siegelbaum,S.A. (1996) Subunit stoichiometry of cyclic nucleotide-gated channels and effects of subunit order on channel function. *Neuron*, **16**, 983-990.
- Ludwig,A., Zong,X., Jeglitsch,M., Hofmann,F. & Biel,M. (1998) A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature*, **393**, 587-591.
- Ludwig,A., Zong,X., Stieber,J., Hullin,R., Hofmann,F. & Biel,M. (1999) Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J.*, **18**, 2323-2329.
- Lüthi,A. & McCormick,D.A. (1999) Modulation of a pacemaker current through Ca²⁺-induced stimulation of cAMP production. *Nature Neurosci.*, **2**, 634-641.

- MacKinnon,R. & Yellen,G. (1990) Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K⁺ channels. *Science*, **250**, 276-279.
- 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.
- Magee,J.C. (1998) Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J.Neurosci.*, **18**, 7613-7624.
- Mannikko,R., Elinder,F. & Larsson,H.P. (2002) Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages. *Nature*, **419**, 837-841.
- 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., Störtkuhl,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*. *Invertebrate Neurosci.*, **4**, 55-63.
- McCormick,D.A. & Bal,T. (1997) Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. *Annu.Rev.Neurosci.*, **20**, 185-215.
- Miller,C. (1991) 1990: Annus mirabilis of potassium channels. *Science*, **252**, 1092-1096.
- 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.
- Much,B., Wahl-Schott,C., Zong,X., Schneider,A., Baumann,L., Moosmang,S., Ludwig,A. & Biel,M. (2003) Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol.Chem.*, **278**, 43781-43786.
- Müller,F. & Kaupp,U.B. (1998) Signaltransduktion in Sehzellen. *Naturwissenschaften*, **85**, 49-61.
- Neher,E. & Sakmann,B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, **260**, 799-802.
- Noma,A., Morad,M. & Irisawa,H. (1983) Does the "pacemaker current" generate the diastolic depolarization in the rabbit SA node cells? *Pflugers Arch.*, **397**, 190-194.
- Numberger,M. & Dragun,A. (1996) *Patch-Clamp-Technik* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Opsahi,L.R. & Webb,W.W. (1994) Lipid-glass adhesion in giga-sealed patch-clamped membranes. *Biophys.J.*, **66**, 75-79.

- 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.
- 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.
- Pongs, O. (1992) Structural basis of voltage-gated K⁺ channel pharmacology. *Trends Pharmacol.Sci.*, **13**, 359-365.
- Robinson, R.B. & Siegelbaum, S.A. (2003) Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu.Rev.Physiol.*, **65**, 453-480.
- 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., 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.
- Sato, Y., Sakaguchi, M., Goshima, S., Nakamura, T. & Uozumi, N. (2003) Molecular dissection of the contribution of negatively and positively charged residues in S2, S3, and S4 to the final membrane topology of the voltage sensor in the K⁺ channel, KAT1. *J Biol.Chem.*, **278**, 13227-13234.
- 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.
- Seoh, S.A., Sigg, D., Papazian, D.M. & Bezanilla, F. (1996) Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron*, **16**, 1159-1167.
- 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.
- Silverman, W.R., Roux, B. & Papazian, D.M. (2003) Structural basis of two-stage voltage-dependent activation in K⁺ channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **100**, 2935-2940.
- Solomon, J.S. & Nerbonne, J.M. (1993) Two kinetically distinct components of hyperpolarization-activated current in rat superior colliculus-projecting neurons. *J.Physiol.*, **469**, 291-313.

- Stevens,D.R., Seifert,R., Bufer,B., Müller,F., Kremmer,E., Gauss,R., Meyerhof,W., Kaupp,U.B. & Lindemann,B. (2001) Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature*, **413**, 631-635.
- Stryer,L. (1988) *Biochemistry* W.H. Freeman and Company, New York.
- 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.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.
- Terlau,H., Ludwig,J., Steffan,R., Pongs,O., Stühmer,W. & Heinemann,S.H. (1996) Extracellular Mg^{2+} regulates activation of rat *eag* potassium channel. *Pflügers Arch.*, **432**, 301-312.
- Tiwari-Woodruff,S.K., Schulteis,C.T., Mock,A.F. & Papazian,D.M. (1997) Electrostatic interactions between transmembrane segments mediate folding of Shaker K⁺ channel subunits. *Biophys.J.*, **72**, 1489-1500.
- Tiwari-Woodruff,S.K., Lin,M.A., Schulteis,C.T. & Papazian,D.M. (2000) Voltage-dependent structural interactions in the Shaker K(+) channel. *J Gen Physiol*, **115**, 123-138.
- Vemana,S., Pandey,S. & Larsson,H.P. (2004) S4 Movement in a Mammalian HCN Channel. *J Gen Physiol*, **123**, 21-32.
- 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.
- Yanagihara,K. & Irisawa,H. (1980) Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflugers Arch.*, **385**, 11-19.
- Yau,K.-W. (1994) Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.*, **35**, 9-32.
- 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.
- Zong,X., Stieber,J., Ludwig,A., Hofmann,F. & Biel,M. (2001) A single histidine residue determines the pH sensitivity of the pacemaker channel HCN2. *J Biol Chem*, **276**, 6313-9.

8 Anhang

In einem Zustandsmodell, dass aus einem Offenzustand O und einem Geschlossenzustand C besteht (Gleichung 2), die durch eine Energiebarriere (den „angeregten“ Zustand X) getrennt werden, sind die Raten α und β exponentiell von der Spannung abhängig. Die Summe der apparenten *gating*-Ladungen der Ratenkonstanten entspricht der apparenten *gating*-Ladung des gesamten Übergangs: $z = z_\alpha + z_\beta$

$$\alpha(V) = \alpha_0 \exp\left(-\frac{z_\alpha q_e V}{kT}\right)$$

$$\beta(V) = \beta_0 \exp\left(\frac{z_\beta q_e V}{kT}\right)$$

$$\frac{\alpha_0}{\beta_0} = \exp\left(\frac{-W_0}{kT}\right)$$

Die Zeitkonstante τ , mit der sich das Gleichgewicht nach einer Störung einstellt, ist ebenfalls von der Spannung abhängig. Es gilt:

$$\tau = \frac{1}{\alpha + \beta}$$

Der Übergang in ein neues Gleichgewicht findet also bei der Spannung am langsamsten statt, bei der $\alpha + \beta$ minimal wird. Die Extremwertaufgabe kann Differenzieren gelöst werden.

gesucht : Minimum für $\alpha(V) + \beta(V)$

$$\text{Extremwertaufgabe } \frac{d(\alpha + \beta)}{dV} \Big|_{V=V_{\max}} \stackrel{!}{=} 0$$

$$\alpha + \beta = \alpha_0 \exp[z_\alpha q_e V_{\max} / kT] + \beta_0 \exp[z_\beta q_e V_{\max} / kT]$$

$$\frac{d(\alpha + \beta)}{dV} = -\frac{z_\alpha q_e}{kT} \alpha_0 \exp\left[\frac{-z_\alpha q_e V_{\max}}{kT}\right] + \frac{z_\beta q_e}{kT} \beta_0 \exp\left[\frac{z_\beta q_e V_{\max}}{kT}\right] \stackrel{!}{=} 0$$

wenn $z_\alpha, z_\beta \neq 0$, dann gilt :

$$z_\alpha \alpha_0 \exp\left[\frac{-z_\alpha q_e V_{\max}}{kT}\right] = z_\beta \beta_0 \exp\left[\frac{z_\beta q_e V_{\max}}{kT}\right]$$

$$\text{mit } \frac{\alpha_0}{\beta_0} = \exp\left(\frac{-W_0}{kT}\right) \text{ folgt}$$

$$\frac{z_\alpha}{z_\beta} = \exp\left[\frac{z q_e V_{\max} - \Delta W_0}{kT}\right]$$

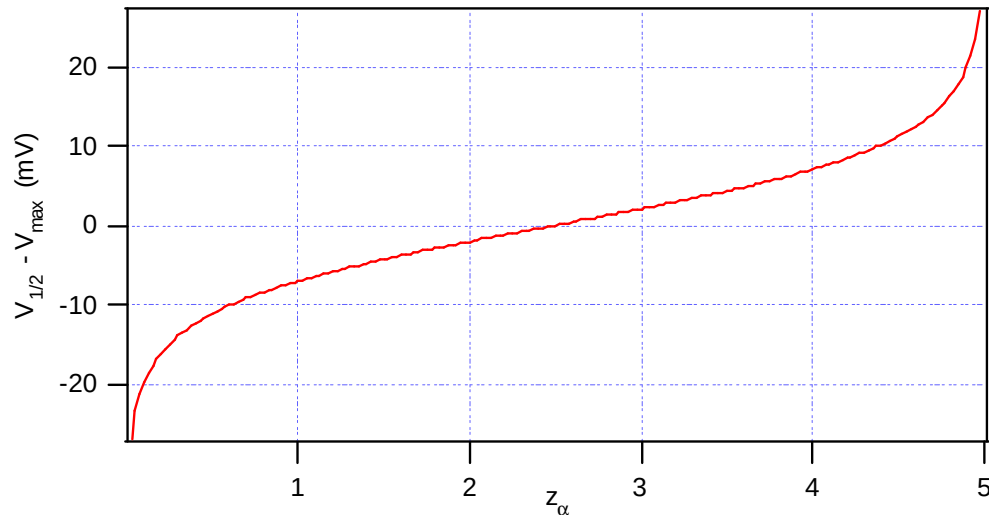
$$\ln\left(\frac{z_\alpha}{z_\beta}\right) = \frac{\Delta W_0 - z q_e V_{\max}}{kT} :$$

$$kT(\ln(z_\alpha) - \ln(z_\beta)) = \Delta W_0 - zq_e V_{\max}$$

$$\text{mit } V_{1/2} = \frac{\Delta W_0}{zq_e} \text{ folgt}$$

$$V_{\max} = V_{1/2} - \frac{kT}{zq_e} (\ln(z_\alpha) - \ln(z_\beta))$$

Bei 22°C gilt $kT/q_e = 25,4 \text{ mV}$. Für das Beispiel $z = 5 = z_\alpha + z_\beta$ ergibt sich die folgende Kurve:



Man kann ablesen, dass die Spannung $V_{\max}$, bei der die Zeitkonstante τ ihr Maximum annimmt, nur dann mehr als 10 mV von $V_{1/2}$ abweicht, wenn die Aktivierungsratenkonstante α wesentlich stärker oder wesentlich schwächer von der Spannung abhängt, als die Deaktivierungsratenkonstante β . Je Größer z ist, desto weniger weicht $V_{\max}$ von $V_{1/2}$ ab.

Danksagung

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

- Herrn Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp für die Überlassung des Themas, für inspirierende Diskussionen und die Möglichkeit an seinem Institut diese Arbeit anfertigen zu dürfen.
- Herrn Dr. Reinhard Seifert für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit. Sein persönliches Engagement und seine fortwährende Diskussionsbereitschaft haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Weiterhin danke ich ihm für seine geduldige Unterstützung bei der Niederschrift dieser Arbeit.
- Herrn PD Dr. Jörg Enderlein für die anregenden Diskussionen, seine große Hilfsbereitschaft und die Übernahme der Beurteilung dieser Arbeit.
- Herrn Dr. Wolfgang Bönigk für seine molekularbiologische Arbeit.
- Frau Mechthilde Bruns für die Unterstützung bei den zellbiologischen Arbeiten.
- Frau Anita Eckert und den Herren Daniel Portz und Rudolf Esser dafür, dass sie immer schnell und unkompliziert halfen, wenn es nötig war.