

GRENZEN DER MESSBARKEIT BEI DER ANALYSE DES SCHALTENS VON HCN2-KANÄLEN

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dominik Kristof Lenz

geboren am 17.06.1988 in Oldenburg (Oldb)

Gutachter

1. Prof. Dr. Klaus Benndorf, Jena
2. Prof. Dr. Stefan Schulz, Jena
3. Prof. Dr. Angelika Lampert, Aachen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 22. Juni 2021

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung.....	2
2.1 Physiologische Bedeutung	2
2.2 Pathophysiologie.....	3
2.2.1 In Gehirn und Nervensystem	3
2.2.2 Herzerregung	4
2.3 Struktur und Aktivierung	5
2.4 Modelle zur Beschreibung des HCN-Kanals	8
2.5 Ansatzpunkte zur Messung von Gating-Strömen	10
3. Ziele der Arbeit	13
4. Material und Methoden	14
4.1 RNA-Präparation.....	14
4.2 Verwendete Lösungen und Chemikalien	14
4.3 Oozytenpräparation	15
4.4 Antikörper-Bindung HA-markierter Mutanten.....	15
4.5 Elektrophysiologie.....	16
4.5.1 Pipetten und Agar-Brücken	16
4.5.2 Verstärker und Setup	16
4.5.3 Datenerfassung.....	17
4.5.4 Messprotokolle	17
4.6 Datenauswertung.....	19
4.6.1 Elektrophysiologie	19
4.6.2 Fluoreszenz-Bilder	19
5. Ergebnisse	20
5.1 Charakterisierung des HCN2 wt -Kanals	20
5.2 Methoden zur Bestimmung der effektiven Gating-Ladung	24
5.2.1 Auswertung der Boltzmann-Funktion.....	24
5.2.2 Initial-slope-Methode	25
5.3 Simulation von Gating-Strömen	27
5.4 Block des HCN2 wt -Ionenstroms.....	29

5.4.1	Externer Block durch Cs ⁺	29
5.4.2	Einsatz nicht-leitender Kationen wie NMDG	30
5.4.3	Interner Block durch ZD7288.....	31
5.5	Messungen bei Spannungen in der Nähe des Umkehrpotentials	32
5.6	Mutationen zur Messung von Gating-Strömen	34
5.7	Charakterisierung der Mutanten HCN2-G402S und -G404S	36
5.7.1	Typisches Verhalten.....	36
5.7.2	Bestimmung der Gating-Ladung.....	38
5.7.3	Beschreibung der Tailströme.....	40
5.7.4	Modellierung der Tailströme	42
5.7.5	Identifikation der Leitfähigkeiten mittels blockierender Kationen	44
5.7.6	Modellierung der Aktivierungsströme	46
5.7.7	Einfluss der Dauer des Haltepotentials.....	49
5.7.8	Expressionsbestimmung durch fluoreszenz-markierte Antikörper.....	51
6.	Diskussion.....	56
6.1	Bestimmung von makroskopischen Gating-Parametern.....	56
6.2	Messung von Gating-Strömen.....	57
6.2.1	Methoden zur Messung von Gating-Strömen	57
6.2.2	Kinetik der Gating-Ströme	59
6.2.3	V _{1/2} der Gating-Ströme	60
6.3	Modelle	61
6.4	Mutationen am mutmaßlichen Selektivitätsfilter.....	63
7.	Schlussfolgerungen	67
8.	Literaturverzeichnis	68
9.	Anhang.....	77
I.	Die Cut-Open-Voltage-Clamp-Technik.....	77
II.	Einfluss eines möglichen Leckstroms auf das Umkehrpotential.....	79
III.	Globale Modellierung	81
	Danksagung.....	83
	Ehrenwörtliche Erklärung	84

Abkürzungsverzeichnis

ANAP	3-(6-acetylnaphthalen-2-ylamino)-2-aminopropansäure
BSA	Bovines (Rinder-) Serum-Albumin
cAMP	Cyclisches Adenosin-Monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	Cyclisches Guanosin-Monophosphat
CHO-Zellen	Chinese Hamster Ovary-Zellen
Ci-VSP	Spannungsgesteuerte Phosphatase aus <i>Ciona intestinalis</i>
CNBD	“Cyclic nucleotide Binding Domain“ – Bindungsstelle für cyclische Nucleotide
CNG-Kanal	“Cyclic nucleotide gated channel“ – durch cyclische Nucleotide modulierter Kanal
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
drHCNL-Kanal	“HCN-like proton channel“ – hyperpolarisationsaktivierter Protonenkanal, aus <i>danio rerio</i> (Zebrafisch)
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
erg-Kanal	“ether-a-go-go-related gene“
F	Faraday-Konstante: 96485 C/mol
fcAMP	Fluoreszenz-markiertes cAMP
HA-Tag	Hämagglutinin-Tag
HCN-Kanal	“Hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide modulated channel“ – durch Hyperpolarisation aktivierter und durch cyclische Nucleotide modulierter Kanal
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
I_f, I_h	“funny channel current“; Hyperpolarisationsaktivierter Kationenstrom
ILT	Dreifach-Mutation V369I/I372L/S376T
K_v-Kanal	Spannungsabhängiger Kalium-Kanal
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
MES	Methansulfonat
mM	Millimolar (mmol/l)

MVP-Kanal	“methanococcal voltage-gated potassium channel” – Methanococccen-spannungsgesteuerter Kalium-Kanal
MTSET	2-(Trimethylammonium)-ethylmethanthiosulfonat
MWC-Modell	Monod-Wyman-Changeux-Modell
Nav-Kanal	Spannungsabhängiger Natrium-Kanal
NMDG	<i>N</i> -Methyl- <i>D</i> -glucamin
PI(4,5)P₂; PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
Q	(Gating-)Ladung
Q_{max}	Maximale (Gating-)Ladung
R	Elektrischer Widerstand; Universelle Gaskonstante: 8,3144598(48) J/mol · K
r.m.s.	“root mean square” – quadratischer Mittelwert
s.e.m.	Standard-Fehler des arithmetischen Mittels
spHCN-Kanal	HCN-Kanal des Seeigel-Spermiums
TEVC	“Two Electrode Voltage-Clamp” – Zwei-Elektroden-Spannungs-Klemme
TMRM	Tetramethylrhodamin-5-maleimid
TRIP8b	“Tetratricopeptide repeat-containing Rab8b interacting protein”
V_{1/2}	Halb-Maximal-Spannung
VCF	Voltage-Clamp-Fluorometrie
wt	Wildtyp
zδ	Effektive Gating-Ladung
ΔG	Freie Reaktionsenthalpie
γ	Einzelkanalleitfähigkeit
τ	Zeitkonstante
nicht aufgeführt	Abkürzungen und Präfixe, die im <i>Système international d'unités (SI)</i> , im <i>Periodensystem der Elemente (PSE)</i> sowie entsprechend der Aminosäuren-Nomenklatur der <i>Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN)</i> der <i>International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)</i> definiert werden.

1. Zusammenfassung

HCN (*hyperpolarisation activated and cyclic nucleotide-modulated*)-Kanäle sind Kationenkanäle und in zahlreiche rhythmisch ablaufende physiologische Prozesse involviert. Über ihren tetrameren Aufbau und die langsame Aktivierung durch Hyperpolarisation sowie die Modulation durch cAMP ist bereits viel bekannt, während die Kinetik des spannungsabhängigen Schaltens – dem sog. Gating-Prozess – bisher noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte. Grundsätzlich sollte die Bewegung der positiv geladenen S4-Helix wie bei strukturell verwandten Na_V- und K_V-Kanälen auch beim HCN-Kanal als Gating-Strom gemessen werden können.

Zur Messung von Gating-Strömen mithilfe der Cut-Open-Voltage-Clamp-Technik wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst u. a. der Einsatz von Cs⁺ als HCN-spezifischer Blocker und der Austausch der permeablen Kationen durch NMDG untersucht, um den Ionenstrom vollständig zu eliminieren. Beide Verfahren konnten den Ionenstrom allerdings nicht komplett eliminieren, sodass Gating-Ströme auf diese Weise nicht gemessen werden konnten.

Daraufhin wurde versucht, den Ionenstrom durch Messungen mit Spannungen nahe des Umkehrpotentials zu verringern, wobei Ströme gemessen wurden, die möglicherweise auf Off-Gating-Ströme zurückzuführen sind. Da jedoch mit dieser Methode die Messung von On-Gating-Strömen nicht möglich war, wurde versucht, nicht-leitende Porenmutanten des HCN2-Kanals zu konstruieren.

Dabei wurde zwar festgestellt, dass alle untersuchten Porenmutanten weiterhin Ionenströme zeigten, allerdings war insbesondere bei den beiden Mutanten *mHCN2-G402S* und *-G404S* ein charakteristisches Verhalten aus Aktivierung, Inaktivierung und zusätzlicher langsamer Aktivierung zu beobachten, das zum besseren Verständnis des HCN2-Kanals tiefergehend analysiert wurde. Durch verschiedene Aktivierungsprotokolle, Applikation spezifischer Blocker, globale Modellierung der Aktivierung und Analyse der Reaktivierung im Tailstrom wurde gezeigt, dass die Ströme aus zwei unterschiedlichen und voneinander unabhängigen Leitfähigkeiten stammen. Dabei können die ersten Komponenten auf die mutierten HCN-Kanäle, die späte Aktivierung hingegen auf unsystematisch auftretende endogene Chlorid-Kanäle zurückgeführt werden. Die Membranlokalisierung der mutierten HCN-Kanäle wurde durch den Einsatz fluoreszenz-markierter Anti-HA-Antikörper belegt.

2. Einleitung

2.1 Physiologische Bedeutung

Viele rhythmisch ablaufende Prozesse im menschlichen Körper werden durch Schrittmacherströme gesteuert. Diese werden als I_f oder I_h abgekürzt und durch sogenannte „funny channels“ vermittelt, die im Laufe der 1990er Jahre als HCN-Kanäle (Hyperpolarization-activated and cyclic-nucleotide-modulated channels) identifiziert wurden (Santoro et al., 1998; Ludwig et al., 1998; Santoro und Tibbs, 1999). Der Name „funny channel“ leitet sich davon ab, dass diese Kanäle nicht wie die meisten anderen spannungsgesteuerten Kationenkanäle bei Depolarisation, sondern bei Hyperpolarisation öffnen. Ihre Hauptbedeutung haben diese Schrittmacherströme dabei im Gehirn sowie im Herzen. Neben den Kanälen HCN1 bis HCN4, die bei Wirbeltieren vorkommen, wurden z. B. in Seeigel-Spermien der spHCN-Kanal (Gauss et al., 1998) und in Methanococcus-Bakterien der MVP-Kanal entdeckt (Sesti et al., 2003; Randich et al., 2014). In Zebrafisch-Spermien wurden kürzlich strukturell ähnliche, hyperpolarisationsaktivierte Protonenkanäle identifiziert (Wobig et al., 2020).

Die Rolle des I_h -Stroms im Gehirn umfasst die Schrittmachertätigkeit und die Modulation der Erregbarkeit, da bei Ruhemembranpotential geöffnete HCN-Kanäle durch den depolarisierenden Kationen-Einstrom die Erregbarkeit senken (DiFrancesco, 1991; Craven und Zagotta, 2006; Biel et al., 2009; Stoenica et al., 2013; He et al., 2014; DiFrancesco und DiFrancesco, 2015), dabei werden neuronal primär die Subtypen HCN1 und HCN2 sowie Heteromere daraus exprimiert.

Im Herzen sind die HCN-Kanäle für die Entstehung der autonomen Erregung verantwortlich, hier werden HCN4 und HCN2 (Much et al., 2003; Wahl-Schott und Biel, 2009) exprimiert. HCN-Kanäle sind dabei vor allem im Sinusknoten zu finden, der die Herzerregung auslöst (Alig et al., 2009; DiFrancesco, 2010; Li et al., 2015). Dabei sorgen sie nach einem erfolgreichen Aktionspotential und daran anschließende Repolarisation durch ihre langsame diastolische Depolarisation dafür, dass kein stabiles Ruhemembranpotential aufgebaut, sondern die Erregungsschwelle der Ca^{2+} -Kanäle überschritten wird, woraufhin diese öffnen und das schnell depolarisierende Aktionspotential initiieren (Schmidt/Lang/Heckmann, 2010, S. 525–526). Dadurch wird über das Erregungsleitungssystem die Aktivierung des Ventrikelmyokards und damit der Herzschlag ausgelöst (Craven und Zagotta, 2006). Anschließend werden die Zellen durch Kalium-Ströme wieder repolarisiert, der HCN-Kanal aktiviert erneut und startet eine neue Herzaktion (Abbildung 1).

Weiterhin wurde gezeigt, dass HCN-Kanäle auch in nicht-erregbarem Gewebe wie Bauchspeicheldrüse (El-Kholy et al., 2007), Darm (Shahi et al., 2013), Leber und Niere (Calejo et al., 2014; León-Aparicio et al., 2019) exprimiert werden. Auch in Schrittmacherzellen von Blase

und Harnleiter (Liu et al., 2018; He et al., 2018) sowie in der Phototransduktion (Jiang et al., 2018) wurde eine Beteiligung von HCN-Kanälen nachgewiesen. Eine weitere Rolle spielen HCN4-Kanäle bei der lateral differenzierten Organentwicklung in frühen *Xenopus laevis*-Embryonen (Pai et al., 2017; Pitcairn et al., 2017).

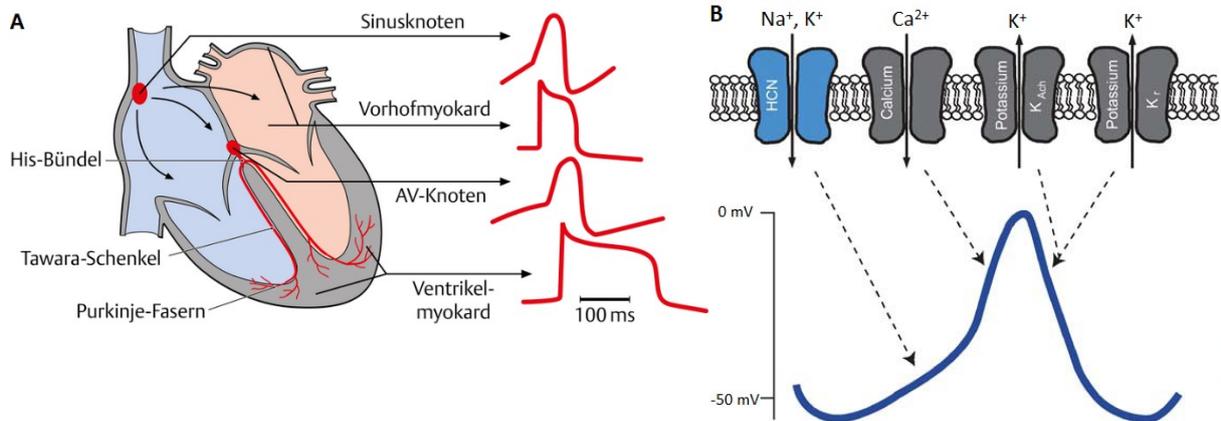


Abbildung 1: Physiologische Rolle von HCN-Kanälen. **A:** Lage von Sinusknoten im Herzen und typische Aktionspotentiale (Huppelsberg und Walter, 2013). **B:** Einfluss der verschiedenen Ströme/Kanäle während des Aktionspotentials (Craven und Zagotta, 2006).

Prinzipiell werden HCN-Kanäle durch Hyperpolarisation aktiviert. Die Öffnung wird dabei aber durch verschiedenste Mechanismen moduliert. Eine direkte Modulation findet z. B. durch cyclische Nukleotide, im Wesentlichen cAMP, statt. Die Freisetzung von cAMP erfolgt physiologisch durch Aktivierung des Sympathikus, woraufhin über einen GPCR-Signalweg Adrenalin freigesetzt wird. Durch Bindung an β_1 -Adrenorezeptoren, Freisetzung eines stimulierenden G-Proteins und Aktivierung der Adenylatzyklase A wird in der Folge der intrazelluläre cAMP-Spiegel erhöht. Dadurch kann der HCN-Kanal leichter und schneller aktiviert werden und die Herzfrequenz wird erhöht (Brown et al., 1979; Guimarães und Moura, 2001). Auch durch Cholesterin werden verschiedene HCN-Isoformen moduliert (Fürst und D'Avanzo, 2015). Weiterhin werden HCN-Kanäle durch das Protein TRIP8b, das sowohl die Expression als auch die neuronale Erregbarkeit beeinflusst (Santoro et al., 2004; Lewis et al., 2010; DeBerg et al., 2015), sowie durch eine N-Glycosylierung (Much et al., 2003) und eine Phosphorylierung (Lewis et al., 2010) moduliert. Beide Mechanismen wirken dabei nicht auf die eigentliche Kanalfunktion, sondern auf die Modulation der Expression.

2.2 Pathophysiologie

2.2.1 In Gehirn und Nervensystem

Bei der Untersuchung verschiedenster neuronaler Krankheiten wurden Zusammenhänge zu gestörten HCN-Kanälen entdeckt (Herrmann et al., 2007). Epileptische Anfälle können beispielsweise durch eine Störung des HCN-Kanals bzw. der Erregbarkeits-Modulation

verursacht werden, indem unkontrollierte Aktionspotentiale ausgelöst werden (Brennan et al., 2016). Eine mögliche Mutation wurde vor wenigen Jahren an der Position Glu515 identifiziert. Die Mutation *hHCN2-E515K* sorgt hier für einen nahezu kompletten Funktionsverlust, der zu einer deutlich gesteigerten Erregbarkeit führt (DiFrancesco und DiFrancesco, 2015). Ebenso erschweren die Mutationen *hHCN4-E153G* und *-P1117L* die Aktivierung von HCN-Kanälen, weshalb T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle nicht im inaktivierten Zustand gehalten werden, sondern spontan aktivieren und epileptische Anfälle auslösen können (Becker et al., 2017). Weitere pathologische Mutationen entlang des gesamten *hHCN1*-Proteins wurden in einer Übersichtsarbeit von Marini et al. (2018) vorgestellt. Diese Mutationen führen allerdings nur zu epileptischen, nicht zu kardiovaskulären Krankheitsbildern (Marini et al., 2018).

Auch im Bereich der Schmerzforschung ist der HCN-Kanal in den letzten Jahren in den Fokus gerückt. Der Nachweis bestimmter Mutationen oder Fehl-Expressionen blieb bisher aus, aber aufgrund der Wirkung von HCN-spezifischen Wirkstoffen konnte auf eine Beteiligung von HCN1- bzw. HCN2-Kanälen geschlossen werden (Young et al., 2014; Tsantoulas et al., 2016). Ein weiterer Bereich, in dem HCN-Kanäle möglicherweise eine Rolle spielen, ist die Parkinson-Krankheit. Hier wird eine Herunterregulation von HCN-Kanälen in Folge eines Verlustes an nigrostriatalen Dopamin-Neuronen angenommen (Good et al., 2011). Dies führt wiederum zu einer erhöhten neuronalen Erregbarkeit, wodurch sich die Kontrolle über die Muskelbewegung verschlechtert.

Der neuronale Modulator TRIP8b interagiert an zwei verschiedenen Bindungsstellen mit den verschiedenen HCN-Kanälen. Im Bereich der CNBD moduliert es die Spannungs- und cAMP-Abhängigkeit des HCN-Kanals (Bankston et al., 2017), am C-terminalen Ende moduliert es das „Trafficking“, den Transport zur und Einbau in die Zellmembran (Santoro et al., 2004; Santoro et al., 2011; Bankston et al., 2012). Diese Modulation wird durch Verhaltensforschung an TRIP8b-Knockout-Mäusen auch in Zusammenhang mit schweren Depressionserkrankungen gebracht (Lyman et al., 2017).

2.2.2 Herzerregung

Neben ihrer Funktion als Schrittmacherströme werden HCN-Kanäle auch im Rahmen der ventrikulären Repolarisation diskutiert. Hier scheinen sie physiologisch die durch K-Kanäle getragene Repolarisation zu verlangsamen und senken somit auch die Höhe der T-Welle im EKG (Fenske et al., 2011). Eine Überexpression von HCN-Kanälen in den Ventrikeln durch Hochregulation der entsprechenden Gene kann dagegen zu ektopten Zentren und ventrikulären Arrhythmien führen (Stillitano et al., 2008).

Pathologisch sind für den HCN-Kanal u. a. das Brugada-Syndrom und einige Formen des Sick-Sinus-Syndrom bekannt (Herrmann et al., 2007). Beim Brugada-Syndrom liegt eine Störung

Der grundlegende Aufbau als Tetramer aus Monomeren mit sechs Transmembran-Helices findet sich bei vielen anderen Kationenkanälen wie z. B. den verschiedenen spannungsabhängigen K_V -Kanälen oder den nicht spannungsgesteuerten, sondern nur durch cyclische Nukleotide aktivierten CNG-Kanälen. In Form einer großen α -Untereinheit, die aus den insgesamt 24 Transmembran-Helices besteht, liegt der Grundaufbau so auch bei Na_V - und Ca_V -Kanälen vor (Yu und Catterall, 2004; Abbildung 3). Spannungsgesteuerte Phosphatasen (Ci-VSP) besitzen einen ähnlichen Aufbau, statt der porenbildenden S5- und S6-Domäne schließt sich an die S4-Helix jedoch das katalytisch aktive Zentrum an (Li et al., 2014).

Spezifisch für HCN-Kanäle ist außerdem die zwischen dem prolinreichen Teil und den sechs Transmembrandomänen liegende sogenannte HCN-Domäne, ein etwa 45 Aminosäuren umfassender Abschnitt N-terminal der S1-Helix, der das Zusammenspiel von C-Linker, S4-Helix und CNBD entscheidend beeinflusst (Lee und MacKinnon, 2017; Porro et al., 2019).

Ähnlich wie bei den K_V - und Na_V -Kanälen dient wahrscheinlich die durch die Aminosäuren Arginin und Lysin positiv geladene S4-Helix als Spannungssensor (Bezanilla, 2000; Chen et al., 2000; Vemana et al., 2004). In Ci-VSPs dient die S4-Helix ebenso als Spannungssensor (Li et al., 2014), deren Aktivierung die katalytische Aktivität beeinflusst (Villalba-Galea, 2012).

*Tabelle 1: Sequenzvergleich von mHCN1-4, spHCN, drHCNL1 und Shaker im Bereich der S4-Helix. Unterstrichen sind die positiv geladenen Aminosäuren. Die Symbole * und + beschreiben Sequenz-Homologien zwischen allen dargestellten bzw. den Säugetier-HCN-Kanälen.*

HCN1	238- <u>K</u> T <u>A</u> R <u>A</u> L <u>R</u> I <u>V</u> R <u>F</u> T <u>K</u> I <u>L</u> S <u>L</u> L <u>R</u> L <u>L</u> R <u>L</u> S <u>R</u> L-263
HCN2	291- <u>K</u> T <u>A</u> R <u>A</u> L <u>R</u> I <u>V</u> R <u>F</u> T <u>K</u> I <u>L</u> S <u>L</u> L <u>R</u> L <u>L</u> R <u>L</u> S <u>R</u> L-316
HCN3	201- <u>K</u> T <u>A</u> R <u>A</u> L <u>R</u> I <u>V</u> R <u>F</u> T <u>K</u> I <u>L</u> S <u>L</u> L <u>R</u> L <u>L</u> R <u>L</u> S <u>R</u> L-226
HCN4	369- <u>K</u> T <u>A</u> R <u>A</u> V <u>R</u> I <u>V</u> R <u>F</u> T <u>K</u> I <u>L</u> S <u>L</u> L <u>R</u> L <u>L</u> R <u>L</u> S <u>R</u> L-394
spHCN	323- <u>E</u> V <u>S</u> R <u>A</u> L <u>K</u> I <u>L</u> R <u>F</u> A <u>K</u> L <u>L</u> S <u>L</u> L <u>R</u> L <u>L</u> R <u>L</u> S <u>R</u> L-348
drHCNL1	160- <u>L</u> A <u>S</u> K <u>M</u> V <u>R</u> I <u>L</u> M <u>F</u> A <u>R</u> <u>F</u> L <u>S</u> M <u>I</u> R <u>L</u> L <u>R</u> V <u>P</u> K <u>L</u> -185
Shaker	353- <u>N</u> Q <u>A</u> M <u>S</u> L <u>A</u> I <u>L</u> R <u>V</u> I <u>R</u> L <u>V</u> R <u>V</u> F <u>R</u> I <u>F</u> K <u>L</u> S <u>R</u> H-378

+++++ +*+*+++++ ++*++++

Neueste Simulationen und kryoelektronenmikroskopisch gewonnene Strukturen zeigten für den HCN-Kanal, dass die S4-Helix bei der Aktivierung an der intrazellulär gelegenen Aminosäure mHCN2-Ser314 (s. Sequenzvergleich in Tabelle 1, grau unterlegt) gebrochen wird (Kasimova et al., 2019; Lee und MacKinnon, 2019). In den strukturell verwandten und ebenfalls durch cyclische Nukleotide modulierten, aber kaum spannungsabhängigen CNG-Kanälen ist dieses Segment ebenfalls stark gebogen und nimmt keine rein helicale Struktur ein (Li et al., 2017). Analog zu den CNG-Kanälen wird auch der HCN-Kanal durch cGMP moduliert, jedoch ist die Sensitivität um das 10- bis 30-fache geringer als für cAMP (Zagotta et al., 2003).

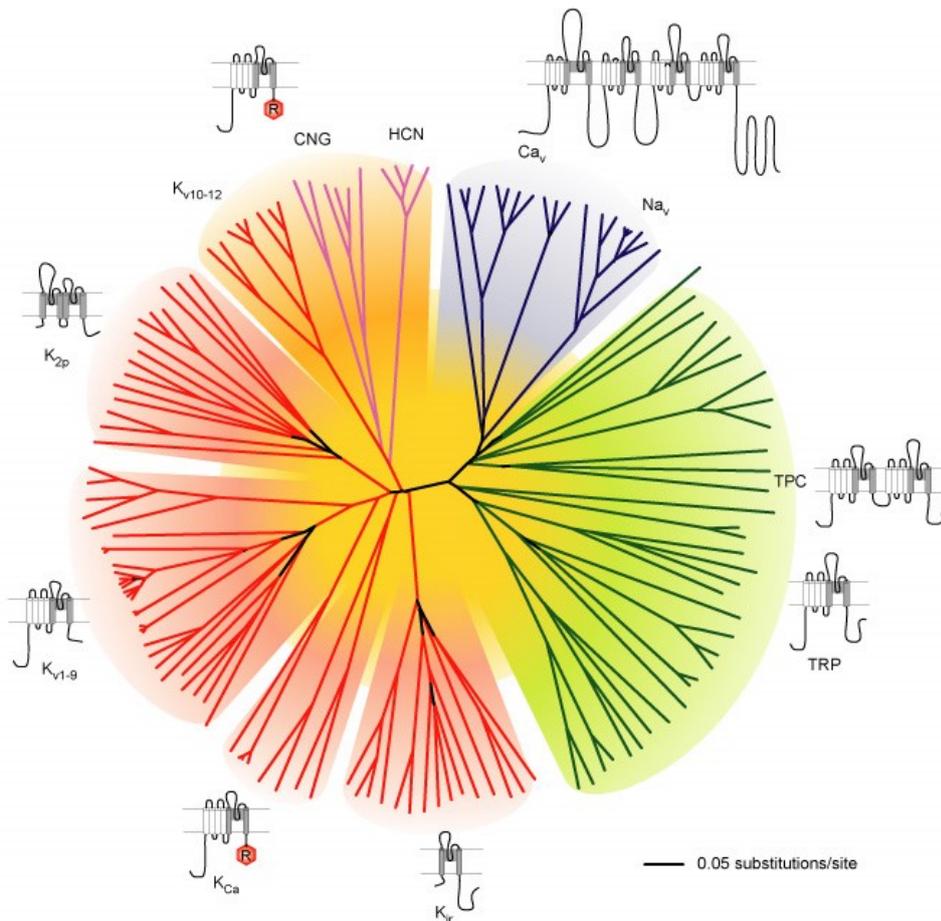


Abbildung 3: Phylogenetischer Baum verschiedener Kationen-Kanäle (Yu und Catterall, 2004).

Zwischen den porenbildenden S5- und S6-Helices befindet sich das in Kaliumkanälen häufig auftretende GYG-Motiv (Abbildung 4), das in anderen spannungsgesteuerten Kaliumkanälen den sogenannten Selektivitätsfilter darstellt (So et al., 2001).

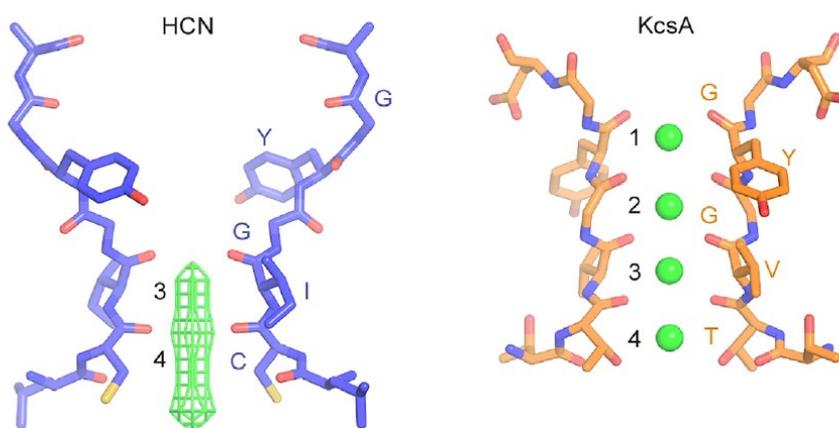


Abbildung 4: Struktur des hHCN1-Kanals sowie des KcsA-Kanals am Selektivitätsfilter (Lee und MacKinnon, 2017). Die Aminosäure-Sequenz ist über alle HCN-Isoformen konserviert (vgl. Tabelle 3), die C-terminalen Aminosäuren hHCN1-Gly362 bzw. KcsA-Gly79 sind jedoch um 180° verdreht.

Nach der kryoelektronenmikroskopisch bestimmten Struktur des hHCN1-Kanals ist das GYG-Motiv an der Koordination der den Kanal passierenden Kationen aber nicht so stark beteiligt

wie bei selektiveren Kaliumkanälen, vielmehr dienen die Carbonyl-Sauerstoffe der weiter innen liegenden Aminosäuren *mHCN2*-Cys398 und Ile399 als Koordinationsstellen für die Kationen (Lee und MacKinnon, 2017), nicht aber die Aminosäuren-Reste selbst (Macri et al., 2012).

Charakteristisch für HCN-Kanäle ist außerdem die C-terminal gelegene CNBD, die Bindungsstelle für cyclische Nukleotide wie cAMP oder cGMP. Diese wirkt im nicht-aktiven Zustand inhibierend auf den HCN-Kanal (Wainger et al., 2001). Die Bindung von cAMP kann diese Auto-Inhibition aufheben, wodurch sowohl die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung als auch die Geschwindigkeit von Aktivierung und Deaktivierung beeinflusst werden (Akimoto et al., 2014; VanSchouwen et al., 2015; DeBerg et al., 2016; VanSchouwen und Melacini, 2016; Page et al., 2020). Durch eine Deletion der CNBD kann diese Auto-Inhibition sogar komplett eliminiert werden (Magee et al., 2015). Alternativ kann mithilfe der Mutation R591E die Affinität für cAMP herabgesetzt werden, was genauere Untersuchungen des Einflusses der Anzahl der funktionalen CNBD ermöglicht (Ulens und Siegelbaum, 2003; Sunkara et al., 2018).

Die Aktivierung des HCN-Kanals findet primär durch eine einwärts gerichtete Bewegung der positiv geladenen S4-Helix als Reaktion auf die Applikation hyperpolarisierender Spannungen statt (Chen et al., 2002; Bezanilla, 2008). Dies ist ein entscheidender Gegensatz zu den spannungsgesteuerten Nav- und Kv-Kanälen, die als Reaktion auf depolarisierende Spannungen und eine daraus resultierende Auswärtsbewegung der S4-Helix öffnen.

Bei dieser Gating-Bewegung bricht die – im Vergleich zu den Nav- und Kv-Kanälen um zwei Helixwindungen längere – S4-Helix des HCN-Kanals an der innerhalb aller HCN-Subtypen konservierten Position *mHCN2*-Ser314 in zwei um etwa 40 bis 50° geneigte Teil-Helices. Der C-terminale Teil der S4-Helix entspricht dann in etwa dem S4-S5-Linker der depolarisations-aktivierten Kationenkanäle (Chen et al., 2001) und verschiebt sich nahezu parallel zur Membran (Lee und MacKinnon, 2019; Kasimova et al., 2019). Daran schließt sich eine Bewegung von S5- und S6-Helix an, die dann das intrazelluläre Tor des HCN-Kanals weitet. Diese Öffnung des Kanals wird sowohl durch die HCN-Domäne als auch durch die CNBD moduliert (Wainger et al., 2001; Porro et al., 2019).

2.4 Modelle zur Beschreibung des HCN-Kanals

Durch den tetrameren Aufbau des HCN-Kanals können bis zu vier Gating-Schritte notwendig sein, um die Öffnung des Kanals zu initiieren. Zur Beschreibung dieses Verhaltens und des Einflusses der cAMP-vermittelten Wirkung der CNBD wurden verschiedenste Modelle entwickelt, die jedoch die Gating-Bewegung der S4-Helix nur indirekt berücksichtigen konnten. Inwiefern sich die einzelnen Untereinheiten – sowohl die S4-Helices als auch die CNBDs – dabei gegenseitig beeinflussen, wird durch die Kooperativität und den Kooperativitätskoeffizienten H ausgedrückt. Die Größe der Kooperativität hat dabei primär Einfluss auf die

kinetische Beschreibung der Stromkurven, insbesondere auf den sigmoiden Anfangsbereich der Aktivierungs- bzw. Deaktivierungsprozesse.

Um sowohl die cAMP- als auch die Spannungsabhängigkeit der Öffnung zu beschreiben, kann das Gating-Verhalten durch ein kubisches Modell gemäß Abbildung 5 formuliert werden. In den drei Achsen werden das Gating der S4-Helices, die cAMP-Bindung an die vier Monomere und die Kanalöffnung aufgetragen, wobei das Gating der S4-Helices gemäß der Beschreibung aus Hummert et al. (2018) hier durch zwei Schritte (drei Zustände) beschrieben wurde.

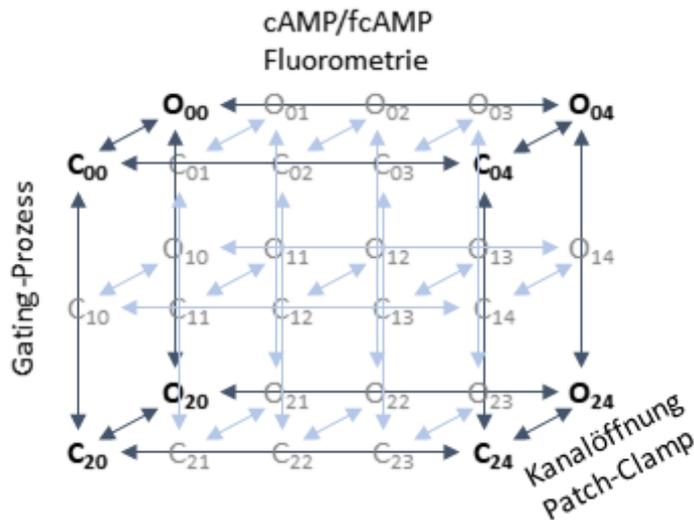


Abbildung 5: Gating-Schema des HCN-Kanals. C und O stehen für closed (geschlossen) und open (geöffnet), die Indizes x und y für die Gating-Schritte bzw. die Anzahl der besetzten cAMP-Bindungsstellen. Der Flip-Zustand wurde hier der Übersichtlichkeit halber nicht gezeigt, er würde in der C_{1y} -Ebene nach vorne ragen und bei zunehmender cAMP-Bindung stärker besetzt (Thon et al., 2015; Hummert et al., 2018).

Da es kaum möglich ist, alle Parameter gleichzeitig zu bestimmen, wurden einzelne Teile des Modells separat beschrieben. Die Öffnung des Kanals wurde bereits 2001 ohne Berücksichtigung der cAMP-Bindung durch elektrophysiologische Messungen charakterisiert und mithilfe von aus 10 Zuständen bestehenden MWC-Modellen (Monod et al., 1965; Altomare et al., 2001) grob mit konstanten Kooperativitäten beschrieben.

Durch Variation von Aktivierungs- und Deaktivierungsspannung bzw. -dauer in An- und Abwesenheit von cAMP und Modellierung durch *hidden-Markov-Modelle* wurde das Aktivierungs-Gating – die „Seitenwände“ des Modells – mit zwei spannungsabhängigen Gating-Schritten und einem spannungsunabhängigen Poren-Öffnungs-Schritt sowie einer transienten Besetzung des „Flip“-Zustands beschrieben, sodass nur 6 bis 7 Zustände ohne konstante Kooperativitäten notwendig sind, um das spannungsabhängige Gating und die Öffnung des HCN2-Kanals unter Einfluss von cAMP zu beschreiben (Hummert et al., 2018).

Zur direkten Beschreibung der Bindung von cAMP bzw. fcAMP und Aktivierung des HCN-Kanals – also der Unter- bzw. Oberseite des Würfel-Modells – ist dagegen die Kombination

2.5 Ansatzpunkte zur Messung von Gating-Strömen

mit Fluoreszenz-Messungen, die sogenannte Patch-Clamp-Fluorometrie, notwendig (Zheng und Zagotta, 2003; Biskup et al., 2007; Zhou und Siegelbaum, 2007; Kusch et al., 2010; Lolicato et al., 2011). Ein Markov-Modell, das strukturell dem Altomare-Modell ähnelt, bei dem jedoch keine konstanten Kooperativitäten zwischen den 10 Zuständen erzwungen wurden, lieferte dabei eine bessere Beschreibung für die cAMP-abhängige Aktivierung als klassische MWC-Modelle (Kusch et al., 2012; Benndorf et al., 2012a; Benndorf et al., 2012b). Durch den zusätzlichen „Flip“-Zustand wurde noch ein außerhalb des Aktivierungspfades liegender Zustand angenommen, der erst nach dem ersten Gating-Schritt und kooperativ, d.h. durch eine konzertierte Bewegung aller vier Untereinheiten, besetzt wird (Thon et al., 2015).

Die Modulation durch cAMP ist somit in einigen Aspekten erforscht, zum vollständigen Verständnis des HCN-Kanals ist jedoch der Gating-Prozess, also die Bewegung der S4-Helix durch die Membran, entscheidend. Diese Bewegung der positiven Ladungen durch das elektrische Feld kann als transienter Gating-Strom gemessen werden (Hodgkin und Huxley, 1952). Pro tetramerem HCN-Kanal sollten dabei etwa 8 bis 12 e_0 übertragen werden, da pro Untereinheit etwa 2 bis 3 positive Ladungen die Membran passieren.

Aus den *hidden-Markov*-Modellen wurden Gating-Ladungen und -Ströme für den HCN2-Kanal simuliert, dabei wurden Gating-Ladungen in Höhe von 5,1 bzw. 8,1 e_0 in An- bzw. Abwesenheit von cAMP ermittelt (Hummert et al., 2018). Für ein genaueres Verständnis des Gating-Modells, insbesondere der senkrechten Wände, ist jedoch eine konkrete Messung der Gating-Ströme notwendig. Diese beschreiben die Bewegung einer elektrischen Ladung durch ein Feld und sind als zeitliche Ableitung der Ladung umso größer, je schneller diese Bewegung abläuft. Vergleicht man die Geschwindigkeit des Gating-Prozesses mit der Geschwindigkeit des Öffnens bzw. Schließens eines Ionenkanals, so kann untersucht werden, welcher Teil der Gesamtbewegung geschwindigkeitsbestimmend ist.

2.5 Ansatzpunkte zur Messung von Gating-Strömen

Zur Messung der sehr kleinen Gating-Ströme kann nicht die Patch-Clamp-Technik verwendet werden, da dabei nur ein sehr kleines Membran-Stück vermessen wird. Stattdessen ist eine Ganzzell-Technik zu bevorzugen, um ein ausreichend großes Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen. Bei der TEVC-Technik treten allerdings zu große kapazitive Spitzen auf, weswegen in den 1990er-Jahren die Cut-Open-Voltage-Clamp-Technik entwickelt wurde (Taglialetela et al., 1992; im Folgenden als „Cut-Open-Technik“ bezeichnet). Eine genauere Erläuterung dieser Technik findet sich in Anhang I.

Außerdem ist es zur Messung der Gating-Ströme notwendig, den Ionenstrom komplett zu eliminieren. Das Entfernen des Ionenstroms am HCN2wt-Kanal kann mithilfe verschiedener Methoden versucht werden: Durch Blockieren der Pore mittels Cs^+ -Ionen (Moroni et al., 2000),

2.5 Ansatzpunkte zur Messung von Gating-Strömen

durch Ersetzen der extrazellulären K⁺-Ionen durch das aufgrund seiner Größe nicht-leitende Kation NMDG (Piper et al., 2003) oder durch Inkubation im HCN-spezifischen organischen Blocker ZD7288 (BoSmith et al., 1993; Männikkö et al., 2002). Eine weitere Methode besteht darin, bei Spannungen nahe des Umkehrpotentials zu messen, bei denen aufgrund der fehlenden elektrochemischen Triebkraft kein Ionen-, sondern nur Gating-Strom sichtbar sein sollte (Ishida et al., 2015).

Tabelle 2: Vergleich der Mutationen am Selektivitätsfilter zur Messung von Gating-Strömen. Fett markiert ist das weitgehend konservierte GYG/GFG-Motiv, unterstrichen ist die Position der jeweiligen Mutation.

Kanal	Sequenz	Mutation	Quelle
spHCN	423-LSHMLCI GYG KFPQSI-439	P435Y	Männikkö et al., 2005
mHCN2	395-MSHMLCI GYG <u>RQ</u> APESM-411	G404S	Macri et al., 2002
K _V 7.4 (KCNQ4)	278-TITLTTI GYG DKTPHTW-294	G285S	Kubisch et al., 1999
K _V 10.1	458-MTSLTSV GFG NIAPSTD-474	G440S	Tomczak und Stühmer, 2015
K _V 11.1 (erg1)	621-FSSLTSV GFG NVSPNTN-637	G630S	Wimmers et al., 2001
K _V 11.2 (erg2)	471-FSSLTSV GFG NVSPNTN-487	G480S	Wimmers et al., 2001
K _{ir} 2.1	137-IETQTTI GYG FRCVTDE-153	Y145A	So et al., 2001

Alternativ dazu können auch nicht-leitende Mutanten genutzt werden. Verschiedenste Mutationen am oder in der Nähe des Selektivitätsfilters (Tabelle 2) wurden genutzt, um den Ionenstrom zu eliminieren (Macri et al., 2002; Kubisch et al., 1999; Wimmers et al., 2001; So et al., 2001) oder sogar Gating-Ströme zu messen (Männikkö et al., 2005; Tomczak und Stühmer, 2015). Die Sequenzunterschiede zwischen den verschiedenen Kanälen sind aber teilweise so groß, dass nicht-leitende HCN2-Kanäle nicht sicher erwartet werden können.

Tabelle 3: Sequenzvergleich von spHCN, HCN1 bis HCN4 und Shaker im Bereich des Selektivitätsfilters. Fett markiert: konserviertes GYG-Motiv, unterstrichen: Position der ShakerIR-W434F-Mutation.

Kanal	Sequenz
spHCN	420-FKALSHMLCI GYG KFPQSI-439
mHCN1	339-FKAMSHMLCI GYG AQAPVSM-358
mHCN2	392-FKAMSHMLCI GYG RQAPESM-411
mHCN3	302-FKAMSHMLCI GYG QQAPVGM-321
mHCN4	470-FKAMSHMLCI GYG RQAPVGM-489
Shaker	434- <u>W</u> WAVVTMTTV GYG DMTPVGV-453

Für den Shaker-Kanal wurden Gating-Ströme der nicht-leitenden Shaker/IR-W434F-Mutante gemessen und mit diesen Daten das Gating-Verhalten modelliert (Perozo et al., 1993; Hoshi et al., 1994; Zagotta et al., 1994a; Zagotta et al., 1994b). Für diese Mutation wird angenommen, dass sie den Shaker/IR-Kanal direkt C-Typ-inaktiviert (Hoshi und Armstrong, 2013). Eine zur Shaker/IR-W434F analoge Mutationsstelle ist für den HCN2-Kanal jedoch nicht

2.5 Ansatzpunkte zur Messung von Gating-Strömen

zu definieren, da sich der entsprechende Bereich – zwischen den Transmembran-Domänen S5 und S6 gelegen – in den beiden Kanälen deutlich unterscheidet (Tabelle 3) und eine C-Typ-Inaktivierung am HCN-Kanal bisher nicht beschrieben wurde.

Somit scheint es zielführend zu sein, in der Erwartung nicht-leitender Mutanten die Mutationen G402S (SYG), Y403S (GSG), Y403A (GAG) und G404S (GYS) in *Xenopus laevis*-Oozyten zu exprimieren. Das Problem all dieser Mutanten ist jedoch, dass die Expression in *Xenopus laevis*-Oozyten nicht sicher ist und nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine Mutation in der Porenregion eine Auswirkung auf den Gating-Prozess hat, sodass die Vermessung des HCN2*wt*-Kanals präferiert werden sollte.

Andere Möglichkeiten, die Bewegung der S4-Einheit, aber auch z. B. des S4-S5-Linkers zu untersuchen, bieten optische Verfahren wie z. B. eine Markierung mit umgebungsabhängigen Fluorophoren, wobei u. a. Cystein-gekoppelte Fluoreszenz-Label in Kombination mit Voltage-Clamp-Fluorometrie (Bruening-Wright et al., 2007; Villalba-Galea et al., 2008; Magee et al., 2017) oder die Verwendung der unnatürlichen Aminosäure Anap (Kalstrup und Blunck, 2013) zum Einsatz kommen können. Dabei wird aber nicht der eigentliche Gating-Strom gemessen, außerdem muss ein Einfluss des Fluorophors auf die Bewegung der S4-Helix angenommen werden, sodass die entsprechenden Ergebnisse noch weniger repräsentativ für den Gating-Prozess des *wt*-Kanals wären.

3. Ziele der Arbeit

Zum besseren Verständnis der HCN-Kanäle soll in dieser Arbeit das spannungsabhängige Gating-Verhalten genauer untersucht werden. Hierbei sollen insbesondere Gating-Ströme gemessen werden und die Gating Ladung bestimmt werden. Aufgrund des besseren Signal-Rausch-Verhältnisses müssen die Messungen mithilfe der Cut-Open-Voltage-Clamp-Technik durchgeführt werden. Zur Validierung des Cut-Open-Messstandes sollen die Ionenströme des *mHCN2wt*-Kanals unter Patch-Clamp- und unter Cut-Open-Bedingungen verglichen werden.

Aus den Ionenströmen des *mHCN2wt*-Kanals soll die effektive Gating-Ladung bestimmt werden. Dabei soll sowohl die Boltzmann-Auswertung der *I/V*-Kurven als auch die „initial-slope“-Methode zur Anwendung kommen.

Um Gating-Ströme messen zu können, muss der Ionenstrom komplett eliminiert werden. Dies soll mithilfe der Applikation anorganischer oder organischer Blocker wie Cs^+ oder ZD7288 oder durch Austausch der permeablen Kationen durch das weitestgehend impermeable organische Kation NMDG versucht werden. Außerdem soll anhand der Gating-Ströme die reale Gating-Ladung ermittelt werden.

Zusätzlich oder falls die Messung von Gating-Strömen an *mHCN2wt*-Kanälen nicht erfolgreich sein sollte, sollen nicht-leitende Porenmutanten generiert werden, um die Bewegung der S4-Helix ohne daraus induzierten Ionenstrom beobachten zu können. Charakteristische Eigenschaften dieser Mutanten sollen analysiert werden.

4. Material und Methoden

4.1 RNA-Präparation

Alle Experimente wurden mit dem HCN2*wt*-Kanal der Maus (*Mus musculus*) bzw. darauf basierender Mutanten durchgeführt. Die cDNA des *mHCN2wt*-Kanals wurde von Prof. Dr. Ulrich Benjamin Kaupp (Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt. Diese wurde in einen Oozytenvektor (pGEMHENEw; Liman et al., 1992) transferiert. Mithilfe des „mMessage mMachine T7 Transcription Kit“ (Invitrogen, Carlsbad, USA) wurde cRNA *in vitro* transkribiert. Die cRNAs wurden in einer Konzentration von 0,1 µg/µl bei -80° C gelagert.

Die Porenmutanten wurden mithilfe rekombinanter PCR-Technik und den Restriktionsenzymen *Pst*I und *Bgl*II hergestellt. Die nach der Position Gly284 (zwischen der S3- und der S4-Helix; Vorgehen analog zu Hardel et al., 2008) HA-markierten Porenmutanten wurden mithilfe der Restriktionsenzyme *Bse*CI und *Not*I aus den Porenmutanten selbst und einer bereits zuvor in der Arbeitsgruppe hergestellten HCN2*wt*-HA-Sequenz zusammengefügt. Die Protein-Sequenz des HA-Epitops lautet: YPYDVPDYA.

Die molekularbiologischen Arbeiten wurden von Prof. Dr. Thomas Zimmer, Karin Schoknecht, Dr. Tina Schwabe und Claudia Ranke vom Institut für Physiologie II des Universitätsklinikums Jena durchgeführt.

4.2 Verwendete Lösungen und Chemikalien

Für die elektrophysiologischen Messungen am Cut-Open-Setup und die Reaktion der Anti-HA-markierten Proteine mit fluoreszenz-markierten primären HA-spezifischen Antikörpern wurden folgende Lösungen verwendet:

Badlösung: 107 mM KMES, 2 mM Ca(MES)₂, 10 mM HEPES, pH 7,4 mittels HMES

NMDG-MES-Stocklösung: 1 M NMDG, 1 M HMES

Pipettenlösung: 3 M KCl

Badlösung für Pellets und Agarbrücken: 1 M NMDG-Cl

Fülllösung für Agarbrücken: 3 % Agar in einer 1 M NMDG-Cl- bzw. NMDG-MES-Lösung

Vaseline-Mischung: 1/3 Vaseline und 1/3 Mineralöl erhitzt, dann 1/3 Parafilm (Angaben in Massenprozent) untergerührt und eingeschmolzen

Saponin-Lösung: 0,1 % in Badlösung

Barth-Medium: 84 mM NaCl, 1 mM KCl, 2,4 mM NaHCO₃, 0,82 mM MgSO₄, 0,41 mM CaCl₂, 0,33 mM Ca(NO₃)₂, 7,5 mM TRIS, Cefuroxim, Penicillin/Streptomycin, pH 7,4 mittels HCl

BSA-Lösung: 1 % BSA in Barth-Medium

Antikörper HA-550: DyLight 550 (1mg/ml; ThermoFisher Scientific, Waltham, USA)
Verdünnung 1:500 in BSA-Lösung

Für die elektrophysiologischen Messungen am Patch-Clamp-Setup wurden folgende Lösungen verwendet:

Badlösung: 100 mM KCl, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7,2

Pipettenlösung: 120 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM CaCl₂, pH 7,2

Zur Bestimmung der cAMP-Abhängigkeit des Gatings wurden der Badlösung 10 µM cAMP zugegeben.

4.3 Oozytenpräparation

Die chirurgische Entnahme von Oozyten aus südafrikanischen Krallenfröschen (*Xenopus laevis*, Nasco, Fort Atkinson, WI, USA) erfolgte nach Betäubung mit Tricain. Anschließend wurden die entnommenen Oozyten in Ca²⁺-freiem Barth-Medium mit Kollagenase (3 mg/ml Kollagenase Typ A; Roche, Grenzach-Wyhlen) 105 min bei 30 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Nach mehrfachem Spülen mit Barth-Medium wurden die Oozyten manuell vereinzelt, die Follikelmembran mithilfe von Pinzetten entfernt und nur Oozyten des Reifestadiums V (Dumont, 1972) zur weiteren Verwendung ausgewählt. Teilweise wurden entsprechend behandelte Oozyten der Firma Ecocyte Bioscience (Castrop-Rauxel) verwendet, zwischen den Oozyten von Nasco und Ecocyte wurde jedoch kein signifikanter Unterschied bezüglich des Kanalverhaltens festgestellt.

Spätestens 24 Stunden nach Entnahme der Oozyten wurde diesen etwa 100 nl \pm 10 ng cRNA-Lösung injiziert. Die Oozyten wurden dann in Barth-Medium entweder zwei bis vier Tage bei 18° C oder sechs bis acht Tage bei 4° C inkubiert. Auch zwischen beiden Inkubationsmethoden wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Kanalverhaltens festgestellt.

4.4 Antikörper-Bindung HA-markierter Mutanten

Nach Injektion der entsprechenden cRNA und Inkubation in Barth-Medium für zwei Tage bei 18° C wurden ausgewählte Oozyten für 30 min in 1%iger BSA-Lösung bei 4° C inkubiert. Anschließend wurden sie für 30 bis 45 min in einer 1:500 verdünnten Antikörper-Lösung bei 4° C inkubiert. Nach erneuter Inkubation für 30 min in 1%iger BSA-Lösung bei 4° C wurden diese Oozyten an einem Zeiss LSM510 fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei wurde die Laserleistung des 543 nm-Helium-Neon-Lasers auf 50 % gestellt und das Fluoreszenzsignal durch einen BP560-615-Filter geleitet. Zur Quantifizierung der Lichtausbeute wurde

unter Verwendung eines 10x0,3-Objektivs eine konfokale Schichtdicke von 50 μm in einer Höhe von 100 μm unterhalb der scheinbaren Äquator-Ebene vermessen, wobei stets der animalische Pol der Oozyte nach oben positioniert wurde. Dieselben Oozyten wurden anschließend elektrophysiologisch vermessen.

4.5 Elektrophysiologie

Sofern nicht anders vermerkt, wurden die Messungen am Cut-Open-Setup durchgeführt. Jede Oozyte wurde nur einmal vermessen, von jedem Frosch gingen maximal zwei Messungen in die Auswertung ein.

4.5.1 Pipetten und Agar-Brücken

Als Pipetten wurde Borosilikat-Glas, das ein Filament enthielt, mit einem Durchmesser von 1,50 mm (außen) und 0,86 mm (innen) verwendet. Pipetten wurden mit einem Narishige-Vertikalpuller PP-83 gezogen und vor der Messung mit Pipettenlösung gefüllt. Der Pipettenwiderstand betrug etwa 0,2 M Ω .

Agar-Brücken wurden aus Borosilikat-Glas mit einem Durchmesser von 2,00 mm (außen) und 1,60 mm (innen) hergestellt, indem sie über einem Gasbrenner erhitzt und passend zurechtgebogen wurden. Dann wurde in einer Mikrowelle erhitzte Agar-Lösung mit einer Eppendorf-Pipette in die Agar-Brücken gefüllt, anschließend ein Platin-Draht (Pt-5W, Firma Science Products GmbH, Hofheim) durch die Agar-Brücke geschoben und so zurechtgeschnitten, dass die Enden von der Agar-Masse bedeckt waren.

Für die Patch-Pipetten wurde Quarz-Glas der Firma vitocom (Mountain Lake, NJ, USA) mit einem Durchmesser von 1,00 mm (außen) und 0,70 mm (innen) verwendet. Die Pipetten wurden mit einem Laserpuller Sutter P-2000 gezogen und mit der entsprechenden Pipettenlösung gefüllt. Der Widerstand betrug etwa 1,2 bis 1,9 M Ω .

4.5.2 Verstärker und Setup

Alle Cut-Open-Messungen wurden mit dem Verstärker CA-1B der Firma Dagan Corp (Minneapolis, MN, USA) durchgeführt. Das Setup befand sich in einem Faraday-Käfig auf einem schwingungsarmen Tisch. Als Elektrode wurde ein chlorierter Silber-Draht verwendet, der in einem zum Setup gehörenden Pipettenhalter befestigt wurde. Als Messkammer wurde ein System aus Kunststoff-Kammern verwendet, die Bohrlöcher in der Unterseite des *Guard* bzw. *Top Pools* hatten einen Durchmesser von 0,5 bzw. 0,6 mm. Die Kammern wurden über Agar-Brücken mit den Ag/AgCl-Pellets verbunden, die in die Badlösung für Pellets getaucht

wurden (Abbildung 6). Mithilfe der Vaseline-Mischung wurde die Oozyte nach Positionierung im *Guard Pool* fixiert. An der Unterseite des *Top Pools* wurde keine Vaseline verwendet.

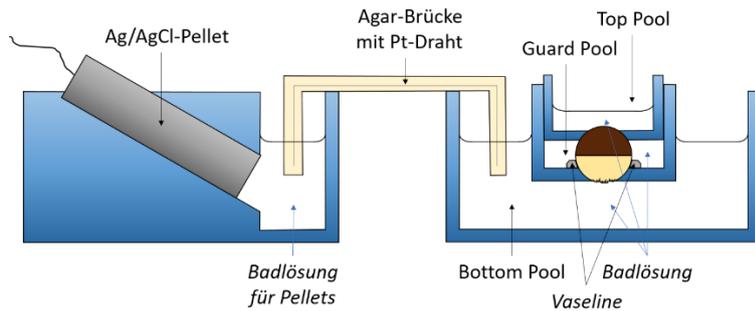


Abbildung 6: Schematische Seitenansicht der Cut-Open-Messkammer inkl. einer Agar-Brücke.

Zum Anspülen der NMDG- bzw. Blocker-Lösungen wurden *PHD-Ultra*-Pumpen der Firma Harvard Apparatus (Holliston, MA, USA) verwendet. Hierbei wurden jeweils zwei 20 ml-Spritzen pro Gerät verwendet, die mit Geschwindigkeiten von maximal 2 ml/min eine NMDG-/Blocker-Lösung in *Top* und *Guard Pool* einspülten, während das gleiche Volumen gleichzeitig auf der anderen Seite des jeweiligen Pools mit einer *Pump11 PicoPlusElite*-Pumpe der Firma Harvard Apparatus abgesaugt wurde.

Patch-Clamp-Messungen wurden mit dem Verstärker Axopatch 200B der Firma Axon Instruments (Foster City, CA, USA) entsprechend der Angaben in der Arbeit von Hummert et al. (2018) durchgeführt.

4.5.3 Datenerfassung

Die Signale wurden üblicherweise bei 2 bis 5 kHz gefiltert, die Sampling-Rate betrug 2 bis 10 kHz. Die Daten wurden mit dem Hard- und Softwarepaket ISO3 (MFK, Niedernhausen, Deutschland) bzw. dem Interface LIH 8+8 von HEKA und der Software HEKA Patchmaster (Lambrecht/Pfalz, Deutschland) aufgenommen. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Daten nicht Leck-subtrahiert, zur Online-Kapazitätskompensation wurde das entsprechende Modul des Verstärkers genutzt. Die Fluoreszenz-Bilder wurden mit der Software des LSM 510 aufgenommen.

4.5.4 Messprotokolle

Zur Bestimmung von kinetischen wie auch von Steady-State-Parametern wurden Spannungsprotokolle gemäß Abbildung 7 verwendet. Es wurde davon ausgegangen, dass Umkehr- und Pipettenpotential vernachlässigbar waren, das Pipettenpotential wurde in der Puffer-Lösung immer auf 0 mV abgeglichen.

Für die Bestimmung der Ionen-Leitfähigkeit bzw. des Umkehrpotentials wurden außerdem langsame Rampen-Protokolle gemäß Abbildung 8 A bzw. schnelle Rampen-Protokolle gemäß Abbildung 8 B genutzt. Haltepotential und Tailspannung lagen bei 0 bzw. -50 mV.

4.5.4.1 Steady-State-Messungen

Üblicherweise wurde bei Cut-Open-Messungen ausgehend von einem Haltepotential von 0 mV gemessen. Zur Aktivierung wurden dann Spannungen zwischen -50 mV und -150 mV angelegt, die Aktivierungszeit betrug üblicherweise 2 s (wenn nicht anders angegeben). Anschließend wurde für $1,5$ bis $2,5$ s eine Tailspannung von -50 mV angelegt, danach wurde wieder auf das Haltepotential geklemmt (Abbildung 7 A). Tailspannungen von -50 mV wurden genutzt, um den relativen Strom bei konstantem elektrochemischem Gradienten und gleichzeitig die Deaktivierung bei dieser Spannung auszuwerten.

Bei Patch-Clamp- und TEVC-Messungen wurden nach einem Haltepotential von -30 mV Pulsprotokolle entsprechend Abbildung 7 B und C appliziert.

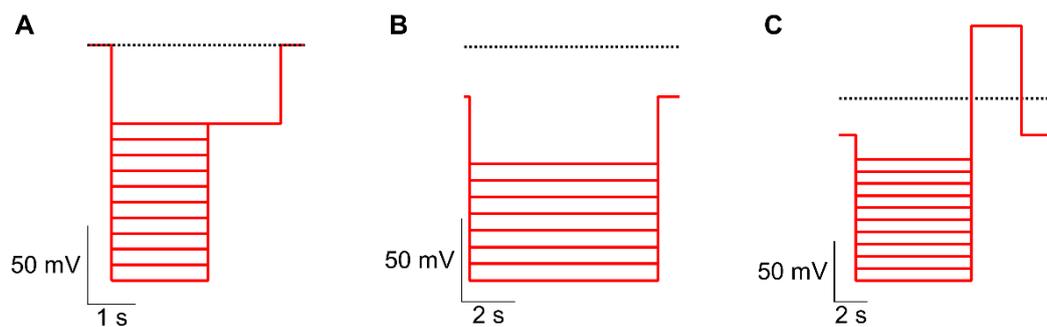


Abbildung 7: Typische Pulsprotokolle für Cut-Open-Messungen (A), Patch-Clamp-Messungen (B) und TEVC-Messungen (C) zur Bestimmung von Kinetiken und steady-state-Parametern.

4.5.4.2 Rampen-Protokolle

Für die Bestimmung der effektiven Gating-Ladung wurden außerdem langsame Rampen-Protokolle genutzt. Dazu wurde die Spannung von einem Haltepotential von $+50$ mV aus in Zeiten von 1.000 bis 4.000 ms auf eine Zielspannung von -150 mV gesenkt. Anschließend wurde die Spannung in der gleichen Zeit wieder zurück auf $+50$ mV erhöht (Abbildung 8).

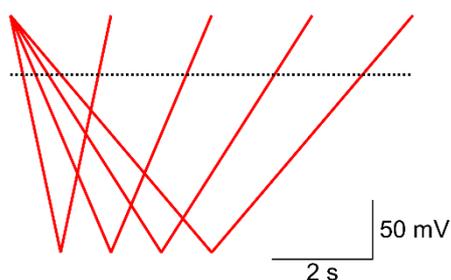


Abbildung 8: Puls-Protokolle für langsame Rampen zur Bestimmung der Gating-Ladung.

4.6 Datenauswertung

4.6.1 Elektrophysiologie

Die steady-state-Aktivierung wurde zur Bestimmung von Strom-Spannungs-Kurven mithilfe eines Tailstroms bei -50 mV gemessen, um die Leitfähigkeit unabhängig von der elektrochemischen Triebkraft zu bestimmen. Alle Tailströme wurden dann relativ zum maximalen Tailstrom bei -150 mV Aktivierung (wenn nicht anders angegeben) normiert. Thermodynamische sowie kinetische Daten wurden gemäß modifizierter Boltzmann-Kurven bzw. Hodgkin-Huxley-Modellen beschrieben.

Alle Daten wurden mit Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) sowie IGOR Pro 6 bzw. IGOR Pro 8 (Wavemetrics, Portland, OR, USA) verarbeitet. Für IGOR Pro wurden *Igor Procedure Files* zur halb-automatisierten Datenauswertung geschrieben. Die Angabe von gemittelten Daten erfolgt üblicherweise als *Mittelwert \pm s.e.m.*, die Fehlerfortpflanzung wurde mithilfe folgender Formel berechnet:

$$\Delta(A \cdot B) = (A \cdot B) \cdot \left(\frac{\Delta A}{A} + \frac{\Delta B}{B} \right) \quad (1)$$

Für thermodynamische und kinetische Daten wurden die Kurven einzeln modelliert und die erhaltenen Parameter gemittelt. Statistische Signifikanz-Tests wurden mit IGOR Pro und dem Student's T-Test durchgeführt. Dabei steht * für ein Signifikanz-Niveau von $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,005$. Wenn notwendig, wurden Stromdaten binomial geglättet (Marchand und Marmet, 1983).

4.6.2 Fluoreszenz-Bilder

Für die Auswertung von Fluoreszenz-Bildern wurde die Software IGOR Pro (Wavemetrics, Portland, OR, USA) in Verbindung mit dem LSM-Reader (Ikeda, 2008) sowie einem in der Arbeitsgruppe (durch Dr. Ralf Schmauder) entwickeltem *Igor Procedure File* verwendet. Zur Quantifizierung der Fluoreszenz wurde das Produkt aus der Anzahl beleuchteter Bildpunkte oberhalb einer definierten Minimal-Leuchtkraft und der um den Median des gesamten Bildes korrigierten Licht-Intensität im entsprechenden Bereich verwendet.

5. Ergebnisse

5.1 Charakterisierung des HCN2wt-Kanals

Um die Aussagekraft von Messungen am Cut-Open-Setup zu validieren, wurden mithilfe verschiedener elektrophysiologischer Techniken Stromkurven des HCN2wt-Kanals nach Expression in *Xenopus laevis*-Oozyten aufgenommen (Abbildung 9) und in Bezug auf die spannungsabhängige Aktivierung ausgewertet und verglichen (Abbildung 10).

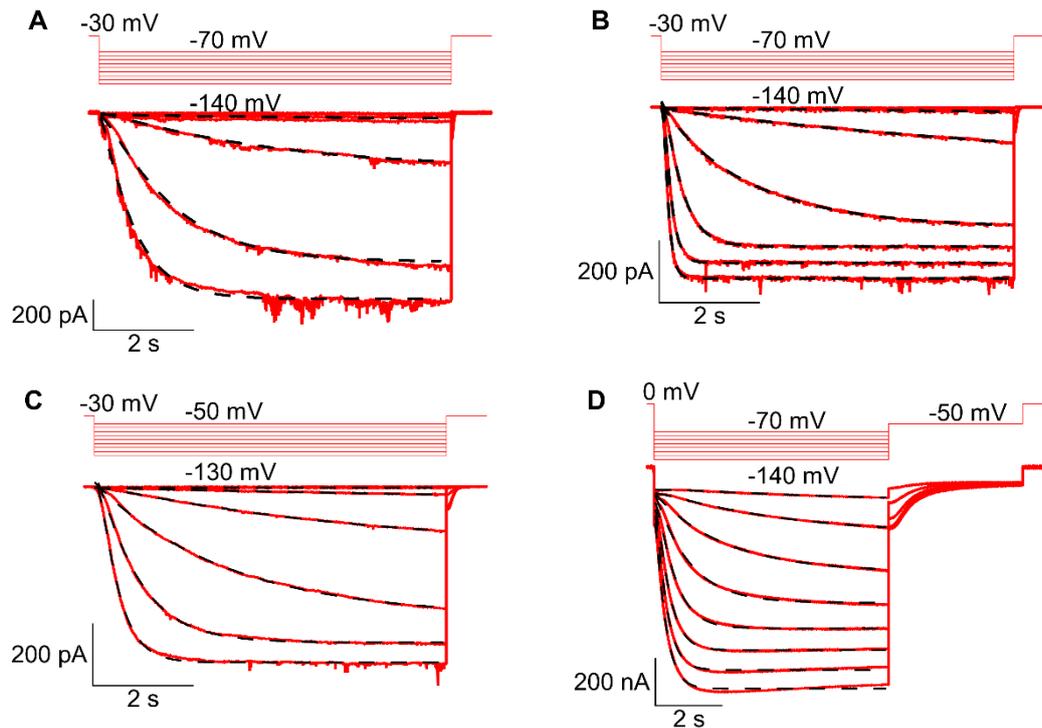


Abbildung 9: Repräsentative Stromkurven des HCN2wt mithilfe verschiedener elektrophysiologischer Techniken und Messbedingungen nach Expression in *Xenopus laevis*-Oozyten. Schwarz gestrichelt sind Fit-Kurven entsprechend Gleichung (3). **A:** Inside-out-Patch, 0 μM cAMP. **B:** Inside-out-Patch, 10 μM cAMP. **C:** Cell-attached-Patch. **D:** Cut-Open.

Die normierten Tailströme wurden gemäß einer modifizierten Boltzmann-Gleichung (2) als Funktion der applizierten Spannung V beschrieben (Kusch et al., 2010; Hille, 2001, S. 55):

$$\frac{I}{I_{max}} = \frac{1}{\left(1 + e^{\left(\frac{z\delta F(V - V_{1/2})}{RT}\right)}\right)} \quad (2)$$

I_{max} beschreibt dabei den maximalen Tailstrom, $z\delta$ die effektive Gating-Ladung – d. h., die Ladung, die zur Öffnung des Kanals notwendig ist – und $V_{1/2}$ die Spannung bei halbmaximalem Effekt. T beschreibt die Temperatur ($T = 298 \text{ K}$), R die allgemeine Gaskonstante und F die Faraday-Konstante.

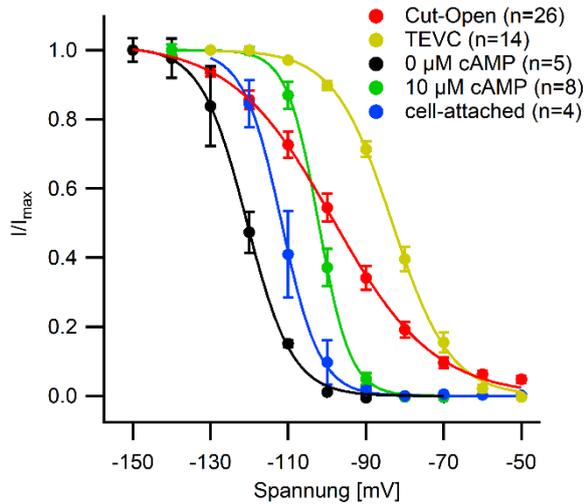


Abbildung 10: *I/V*-Kurven aus verschiedenen elektrophysiologischen Messbedingungen. Alle Messungen wurden separat normiert. Aktivierungszeit zwischen 2 und 7 s (vgl. Pulsprotokolle in Abbildung 7); TEVC-Messungen durch Jana Kusch (Institut für Physiologie II) zur Verfügung gestellt.

Dabei zeigten sich zwischen den *I/V*-Kurven der verschiedenen Setups zwar Unterschiede, das native Verhalten des HCN2*wt*-Kanals kann aber dennoch durch alle Techniken qualitativ gut beschrieben werden (Abbildung 10). Bei Patch-Clamp-Messungen ohne cAMP-Applikation lag der maximale Strom analog zu literaturbekannten Offenwahrscheinlichkeiten (Kusch et al., 2010) bei $72,1 \pm 3,4$ % des Stroms bei sättigender cAMP-Konzentration.

Die Auswertung der $V_{1/2}$ zeigte dabei für Cut-Open-Messungen mit $-98,2 \pm 1,9$ mV Werte, wie sie unter Patch-Clamp-Bedingungen unter Zugabe von sättigender cAMP-Konzentration erreicht werden ($-102,3 \pm 1,1$ mV; Abbildung 11 A). Die effektive Gating-Ladung war bei Patch-Clamp-Messungen deutlich größer als bei Ganzzell-Messungen, allerdings konnte bei ersteren kein Einfluss von cAMP festgestellt werden (Abbildung 11 B).

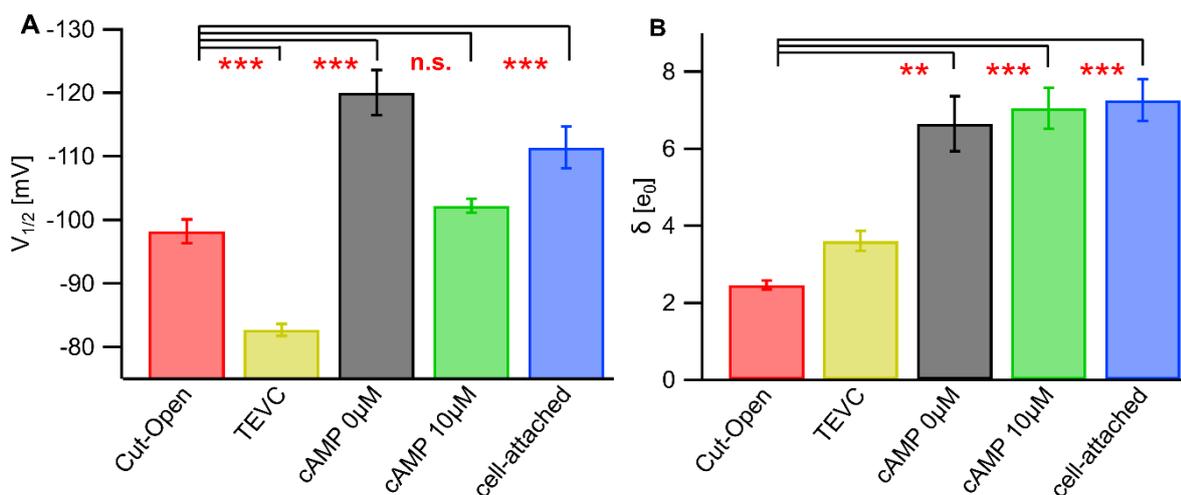


Abbildung 11: Vergleich von $V_{1/2}$ (A) und effektiver Gating-Ladung (B).

Neben den Gleichgewichtsparametern wurden auch kinetische Parameter mittels eines Hodgkin-Huxley-Modells (Hodgkin und Huxley, 1952) ausgewertet. Dieses Modell wurde dabei genutzt, um die verschiedenen Messbedingungen quantitativ vergleichen zu können, ohne explizite mechanistische Aussagen zu treffen. Auch wenn das Modell mit seinen vereinfachenden Grundannahmen mittlerweile von moderneren Modellen abgelöst wurde, kann es mit relativ einfachen Mitteln eine plausible Beschreibung und Vergleichbarkeit der elektro-physiologischen Messbedingungen liefern.

Durch Anpassen von Gleichung (3) an die Ionenströme konnten Zeitkonstanten und Kooperativitätskoeffizienten für die Aktivierung bei verschiedenen Spannungen ermittelt werden:

$$I(t) = A \cdot \left(1 - e^{\left(\frac{-(t-t_0)}{\tau} \right)} \right)^H + C \quad (3)$$

Hierbei beschreibt A einen von der Kanalanzahl abhängigen Vorfaktor, t_0 ist der Zeitpunkt des Spannungssprungs, H ist der Kooperativitätskoeffizient, also die Anzahl der effektiv kooperierenden Untereinheiten, und τ beschreibt die Zeitkonstante. Die anschließende Deaktivierung bei einer Spannung von -50 mV konnte durch Anpassen von Gleichung (4) an die Tailströme beschrieben werden:

$$I(t) = A \cdot \left(1 - \left(1 - e^{\left(\frac{-(t-t_0)}{\tau} \right)} \right)^H \right) \quad (4)$$

Die Aktivierung des HCN2wt-Kanals lief dabei bei Ganzzell-Messungen deutlich schneller ab als unter Patch-Clamp-Bedingungen. Dabei nahm die Aktivierungsgeschwindigkeit mit stärkerer Aktivierungsspannung unter allen Messbedingungen deutlich zu (Abbildung 12 A). Die Deaktivierung verlief ohne sichtbare Abhängigkeit von der Aktivierungsspannung unter Cut-Open- deutlich langsamer als unter Patch-Clamp-Bedingungen (Abbildung 12 B).

Der Kooperativitätskoeffizient lag spannungsunabhängig unter allen Messbedingungen für die Aktivierung bei Werten zwischen 1 und 2 und für die Deaktivierung zwischen 3 und 4 (Abbildung 12 C-D). Die marginalen Unterschiede zwischen den Methoden resultieren wahrscheinlich aus der Einfachheit des Modells und können daher vernachlässigt werden.

Sämtliche Befunde – d. h. die verschobene $V_{1/2}$, die geringere effektive Gating-Ladung und die veränderte Kinetik – sprechen dafür, dass der offene Zustand unter Ganzzell-Bedingungen energetisch leichter erreicht wird als unter Patch-Clamp-Bedingungen. Die Hodgkin-Huxley-Modellierung lieferte dabei durchaus plausible Werte, konnte den Strom jedoch insbesondere im sigmoiden Anfangsbereich der Aktivierung nicht exakt beschreiben (Abbildung 9). Dieses Ergebnis ist konsistent mit dem initialen Befund von Altomare et al. (2001), die daraufhin ein komplexeres Modell zur Beschreibung der Spannungsabhängigkeit entwickelten.

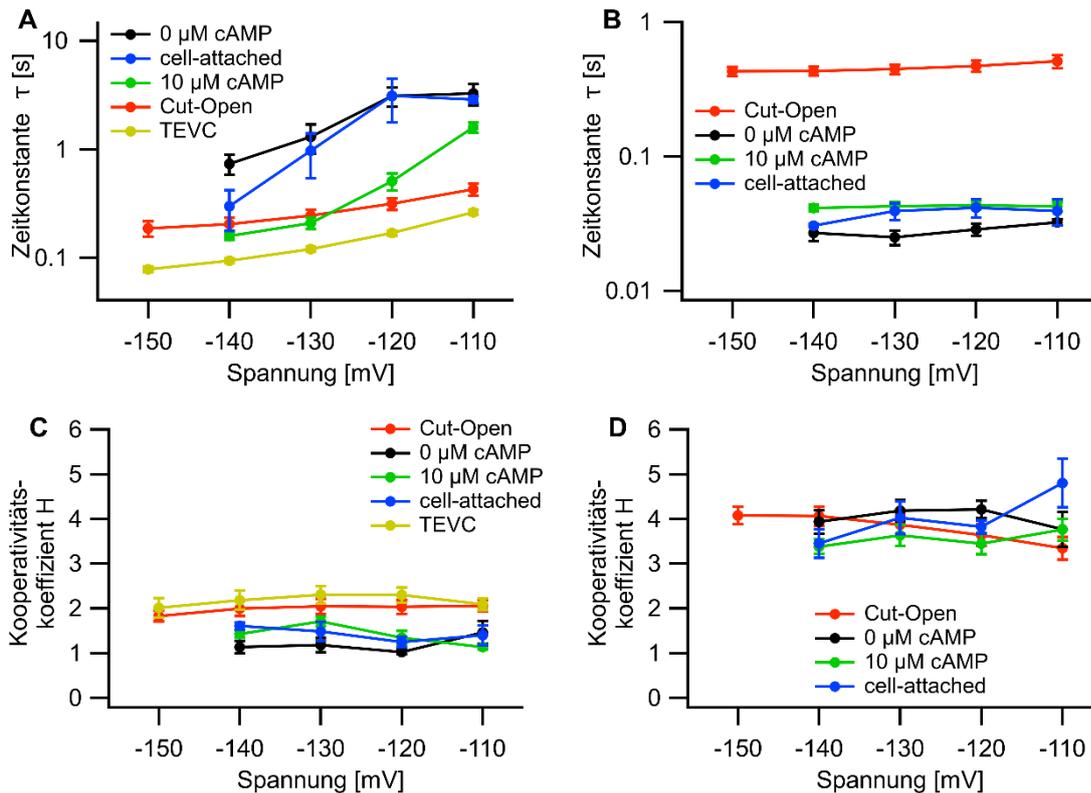
5.1 Charakterisierung des HCN2 wt -Kanals

Abbildung 12: Zeitkonstanten (A, B) und Kooperativitätskoeffizienten (C, D) für Aktivierung (links) und Deaktivierung (rechts) gemäß Gleichungen (3) und (4) unter verschiedenen electrophysiologischen Messbedingungen. Daten sind Mittelwerte aus 4 bis 14 Messungen \pm s.e.m. Für die TEVC-Messungen konnte die Deaktivierung aufgrund positiver Tailspannungen nicht vergleichbar ausgewertet werden.

Außerdem wurde der Einfluss der Tailspannung nach einer Aktivierung bei -130 mV am Cut-Open-Setup untersucht (Abbildung 13 A). Gleichung (4) wurde durch globale Modellierung angepasst, wobei die Kooperativitätskoeffizienten über alle Tailspannungen konstant gehalten und zu $3,3 \pm 0,1$ bestimmt wurden. Dabei zeigte sich eine Abnahme der Deaktivierungszeitkonstante mit positiveren Tailspannungen (Abbildung 13 B). Dieses Verhalten ist durch den stärkeren elektrostatischen Einfluss auf die S4-Helix erklärbar.

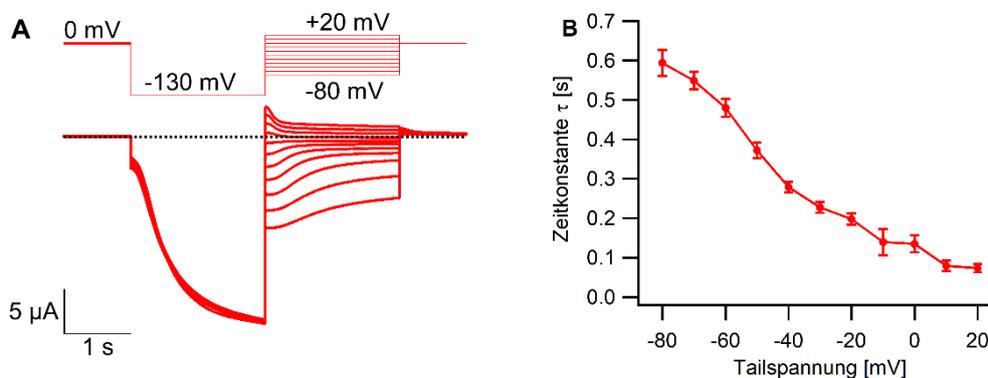


Abbildung 13: Einfluss der Tailspannung unter Cut-Open-Bedingungen. A: Repräsentative Stromkurven des HCN2 wt -Kanals nach Aktivierung bei -130 mV und Deaktivierung bei Tailspannungen zwischen -80 mV und $+20$ mV. B: Deaktivierungszeitkonstante. Daten sind Mittelwerte aus 6 Messungen \pm s.e.m.

5.2 Methoden zur Bestimmung der effektiven Gating-Ladung

Insgesamt konnten alle hier untersuchten Messbedingungen das native Verhalten des HCN2wt-Kanals qualitativ gut beschreiben und können somit für die Charakterisierung und den Vergleich mit Mutationen oder anderen spannungsgesteuerten Ionenkanälen herangezogen werden. Quantitativ unterscheiden sich die Methoden zwar hinsichtlich der Gleichgewichtsparameter ($V_{1/2}$ und effektive Gating-Ladung) und der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken, dennoch liegen alle Werte im erwartbaren Rahmen. Vergleichbare Unterschiede zwischen den verschiedenen Messkonfigurationen wurden bspw. auch am spHCN-Kanal beobachtet (Shin et al., 2004; Vemana et al., 2004).

5.2 Methoden zur Bestimmung der effektiven Gating-Ladung

5.2.1 Auswertung der Boltzmann-Funktion

Aus den oben gezeigten, aus Tailströmen gewonnenen I/V -Kurven (Abbildung 10) können entsprechend Gleichung (2) die effektiven Gating-Ladungen $z\delta$ bestimmt werden, die notwendig sind, um den Kanal zu öffnen. Diese ergeben sich aus der Steilheit der Kurve und betragen für die Messungen am Cut-Open-Stand $2,5 \pm 0,1 e_0$, für TEVC-Messungen $3,6 \pm 0,3 e_0$, für Patch-Clamp-Messungen jedoch 6,7 bis 7,3 e_0 (Abbildung 11 B).

Auch in anderen publizierten Arbeiten wurden unter TEVC-Bedingungen ähnlich flache I/V -Kurven für den HCN2wt gemessen (Magee et al., 2015). In dieser Publikation wurde die Steilheit als *slope* [mV] des Boltzmann-Fits angegeben. Um die Werte zu vergleichen, müssen sie durch Gleichsetzen der beiden Terme ineinander umgerechnet werden:

$$\frac{1}{1 + e^{\left(\frac{(V-V_{1/2})}{slope}\right)}} = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{(z\delta F(V-V_{1/2}))}{RT}\right)}} \quad (5)$$

$$z\delta = \frac{RT}{slope \cdot F} = \frac{25,68 e_0}{slope [mV]} = \frac{25,68 e_0}{14,4} = 1,8 e_0 \quad (6)$$

Mithilfe dieser Umrechnung kann der durch Magee et al. gemessene *slope* des Boltzmann-Fits zu einer effektiven Gating-Ladung von 1,8 e_0 bestimmt werden.

Die Gating-Parameter aus der Boltzmann-Funktion können dagegen auch aus den Aktivierungsleitfähigkeiten nach verschiedenen Zeitpunkten der Aktivierung bestimmt werden:

$$\frac{G}{G_{max}} = \frac{1}{\left(1 + e^{\left(\frac{(z\delta F(V-V_{1/2}))}{RT}\right)}\right)} \quad (7)$$

Um aus den Stromkurven die Leitfähigkeit G zu erhalten, kann durch die Division des Stroms durch die elektrochemische Triebkraft – also die Differenz der applizierten Spannung und des Umkehrpotentials – gemäß folgender Gleichung die „chord conductance“ erhalten werden

5.2 Methoden zur Bestimmung der effektiven Gating-Ladung

(Helman und Thompson, 1982), wobei das Umkehrpotential V_{Rev} aufgrund der extra- und intrazellulär annähernd identischen K^+ -Konzentration als 0 mV angenommen wurde:

$$G_{chord} = \frac{I}{(V - V_{Rev})} \quad (8)$$

Aus Stromkurven einer Aktivierung von 2 s am Cut-Open-Setup wurden gemäß Gleichung (8) alle 0,5 s Leitfähigkeiten und anschließend daraus gemäß Gleichung (7) die Gating-Parameter $V_{1/2}$ und $z\delta$ bestimmt (Abbildung 14). Die Gating-Ladung war dabei mit $2,5 e_0$ unabhängig vom Zeitpunkt der Aktivierung. Im Gegensatz dazu würde die $V_{1/2}$ nach kurzen Aktivierungen zu negativ bestimmt, da diese Zeiten nicht ausreichen, um den Steady-State zu erreichen. Dies deckt sich mit den aus Patch-Clamp-Messungen gewonnenen Befunden von Hummert et al. (2018).

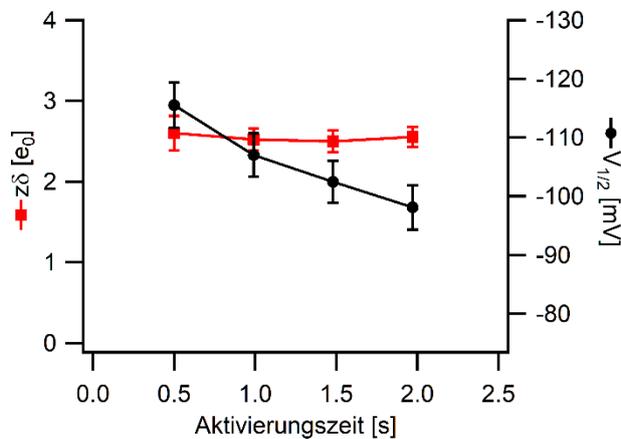


Abbildung 14: Abhängigkeit der Gating-Parameter vom Aktivierungszeitpunkt.

5.2.2 Initial-slope-Methode

Alternativ zur Boltzmann-Funktion kann die Gating-Ladung auch mithilfe der „initial slope“-Methode bestimmt werden. Diese basiert auf der Auswertung eines langsamen Rampen-Protokolls (Noceti et al., 1996; Ishida et al., 2015) und beschreibt die Gating-Ladung, die beim ersten spannungsabhängigen Schritt übertragen wird. Dabei wird bewusst kein Steady-State-Zustand erreicht, sondern die angelegte Spannung kontinuierlich variiert (Abbildung 15).

Aus den Stromkurven wurde gemäß Gleichung (8) die Leitfähigkeit G als „chord conductance“ erhalten. Diese Methode kann bei Spannungen nahe des Umkehrpotentials – welches zudem bei Cut-Open-Messungen nicht immer exakt bestimmt werden kann (vgl. Anhang II) – aufgrund der Division durch Null bzw. sehr kleine Spannungen unbrauchbare Werte liefern. Da das Umkehrpotential hier um 0 mV liegt und der HCN2-Kanal erst ab etwa -70 mV öffnet, beeinflusst diese Problematik die Auswertung allerdings nicht.

5.2 Methoden zur Bestimmung der effektiven Gating-Ladung

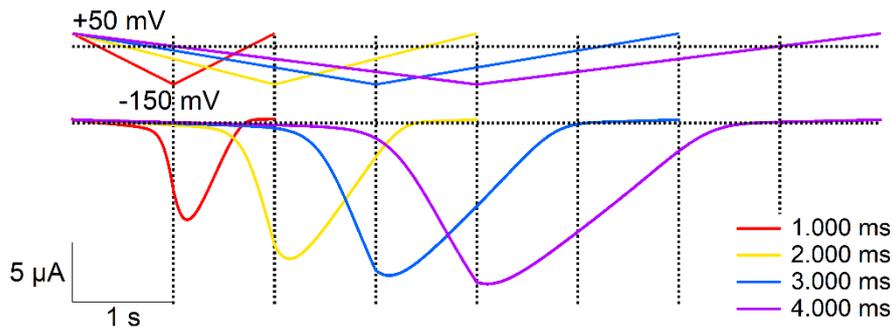


Abbildung 15: Repräsentative Stromkurven des HCN2wt als Reaktion auf langsame Spannungsrampen von +50 mV über -150 mV zurück zu +50 mV in Zeiten von 1.000 bis 4.000 ms pro Schenkel (\triangleq Geschwindigkeiten von 200 bis 50 mV/s). Gitterlinien zur Verdeutlichung der Spannungsumkehr.

Alternativ könnte zur Bestimmung der Leitfähigkeit auch das Konzept der „slope conductance“ verwendet werden, das die Leitfähigkeit gemäß Gleichung (9) als Tangente des Stroms bei einer bestimmten Spannung definiert (Thompson, 1986). Aufgrund der Produktregel der Differenzialrechnung gibt die „slope conductance“ jedoch nicht die eigentliche Leitfähigkeit wieder, sondern die Summe aus Leitfähigkeit und mit der Triebkraft multiplizierten Änderung der Leitfähigkeit. Quantitativ aussagekräftig ist diese Methode daher nur bei konstanten Leitfähigkeiten.

$$G_{slope} = \frac{dI}{dV} = G(V) + \frac{dG(V)}{dV} \cdot (V - V_{Rev}) \quad (9)$$

Außerdem ist die „slope conductance“ noch abhängiger von der Qualität der Daten, da bei stark verrauschten Daten die Bestimmung einer lokalen Ableitung zu großen Ungenauigkeiten führen wird. Daher wurde diese Methode zur Bestimmung der Gating-Ladung nicht weiter berücksichtigt.

Die gemäß Gleichung (8) als „chord conductance“ bestimmte Leitfähigkeit kann durch Anpassen von Gleichung (10) beschrieben werden (Noceti et al., 1996). Dabei wird in dieser Arbeit zusätzlich eine gewisse, sehr kleine Leck-Leitfähigkeit (im fS/Kanal-Bereich) angenommen, um der nicht perfekt möglichen Leck-Kompensation Rechnung zu tragen (Abbildung 16 A):

$$G(V) = A \cdot e^{\left(\frac{-z\delta \cdot V \cdot e_0}{k_B \cdot T}\right)} + G_{Leck} \quad (10)$$

Der Parameter A ist ein amplitudenabhängiger Vorfaktor, der Parameter $z\delta$ ist die Steigung bei logarithmischer Auftragung und entspricht für einfache Zustands-Änderungen der Gating-Ladung (Noceti et al., 1996).

Mit zunehmender Rampendauer stieg die ermittelte Gating-Ladung von $2,0 \pm 0,2 e_0$ bis auf $2,4 \pm 0,2 e_0$ (Abbildung 16 B) und näherte sich damit dem Bereich dessen, was aus der Boltzmann-Beschreibung der Steady-State-Messungen ermittelt wurde (Abbildung 11 B),

während deutlich wird, dass eine zu schnelle Rampe die Spannungsabhängigkeit des Gating-Prozesses des relativ langsam öffnenden HCN2wt-Kanals nicht ausreichend widerspiegelt.

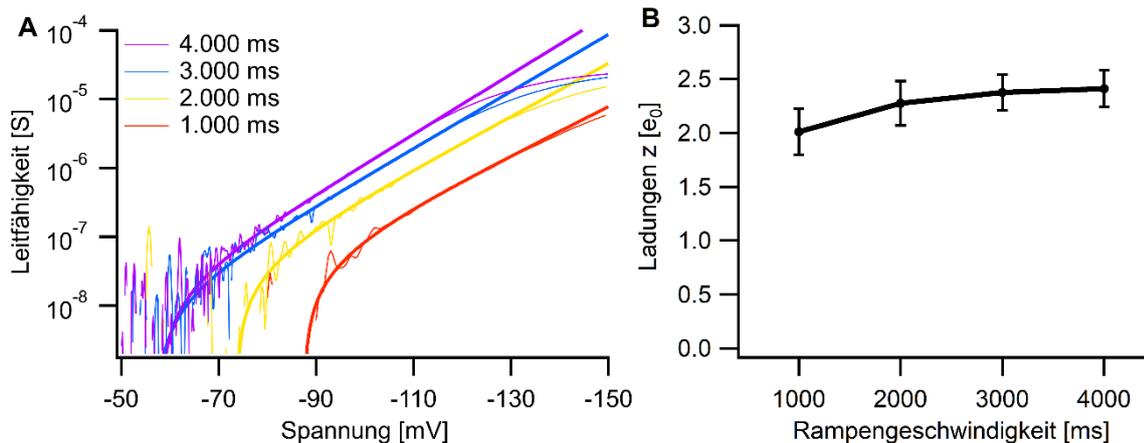


Abbildung 16: Bestimmung der effektiven Gating-Ladung mit der „initial-slope“-Methode. **A:** Dünn: logarithmisch aufgetragene Leitfähigkeit (als „chord conductance“ aus den Stromkurven in Abbildung 15 erhalten); fett: Fit gemäß Gleichung (10). **B:** Effektive Gating-Ladungen $z\delta$ in Abhängigkeit von der Rampengeschwindigkeit ($n=7$).

Aus beiden Methoden zur Bestimmung der effektiven Gating-Ladung ergibt sich, dass zur Öffnung des HCN2wt-Kanals nur etwa $2,5 e_0$ notwendig sind. Da aus der Struktur des Kanals eine gesamte Gating-Ladung von 8 bis $12 e_0$ zu erwarten wäre, soll zum besseren Verständnis des Gating-Prozesses versucht werden, diese aus dem Gating-Strom zu bestimmen.

5.3 Simulation von Gating-Strömen

Die Schwierigkeit bei der Messung von Gating-Strömen besteht darin, dass diese sehr klein sind, da pro Kanal (in der tetrameren Form) maximal nur etwa 8 bis 12 elektrische Ladungen transportiert werden. Bei einer Einzelkanalleitfähigkeit von $1,67 \text{ pS}$ (Thon et al., 2013) passieren jeden Kanal bei einer Spannung von -150 mV innerhalb einer Sekunde dagegen etwa 1,5 Millionen Ionen. Je langsamer der Gating-Prozess abläuft, desto kleiner wird die Amplitude des Gating-Stroms und umso schwieriger wird dieser daher zu messen sein. Aus den in Tabelle 4 vorgestellten Kanälen lässt sich abschätzen, dass für die Dauer des Gating-Prozesses des HCN2-Kanals ein Wert zwischen 10 und 100 ms wahrscheinlich ist. Auch die Modelle von Hummert et al. (2018) weisen auf eine solche Größenordnung hin.

Tabelle 4: Beispielhafte Kinetiken aus vergleichbaren Modellierungen der Ionenströme diverser Kationen-Kanäle bei je zwei applizierten Spannungen. Für die Kinetik der Gating-Ströme wurde der Abfall dieser Ströme modelliert. Mit * markierte Daten stammen aus VCF-Messungen.

Kanal	Aktivierung			Deaktivierung		
	Applizierte Spannung	Ionenstrom	Gating-Strom	Applizierte Spannung	Ionenstrom	Gating-Strom
HCN2	-90 mV	1.100 ms	—	-75 mV	1.000 ms	—
	-125 mV	200 ms	—	-35 mV	200 ms	—
(Moroni et al., 2000)						
spHCN	-80 mV	500 ms	—	-40 mV	400 ms	—
	-120 mV	70 ms	45 ms*	-10 mV	90 ms	10 ms
(Elinder et al., 2006; Mistrik und Torre, 2004; Bruening-Wright et al., 2007)						
HCNL1	-70 mV	200 ms	—	—	—	—
	-135 mV	40 ms	4 ms	-135 mV	—	5 ms
(Wobig et al., 2020; Wolfenstetter, 2020)						
Shaker	-40 mV	4 ms	5,3 ms	-60 mV	2,5 ms	35 ms
	0 mV	2 ms	2 ms	-100 mV	0,8 ms	4 ms
(Lacroix et al., 2013; Stefani et al., 1994)						
Nav1.4	-40 mV	0,6 ms	2,2 ms	-60 mV	—	—
	0 mV	0,3 ms	0,8 ms	-100 mV	—	—
(Lacroix et al., 2013)						

Für die Simulation von Gating-Strömen wurde in dieser Arbeit die 1. Ableitung von Gleichung (3) nach der Zeit verwendet. Dies ergab folgende Gleichung:

$$I'(t) = A \cdot \left(\frac{H}{\tau}\right) \cdot \frac{\left(1 - e^{-\left(\frac{t-t_0}{\tau}\right)}\right)^H}{e^{\left(\frac{t-t_0}{\tau}\right)} - 1} \quad (11)$$

Hierbei beschreiben A , t_0 und H die gleichen Parameter wie in Gleichung (3), τ beschreibt die Zeitkonstante des Gating-Stroms. Zur Simulation von Gating-Strömen muss der Faktor A bestimmt werden, der als Produkt aus der Anzahl der Kanäle N multipliziert mit der übertragenen Gating-Ladung z definiert werden kann. Für eine hypothetische Messung mit einem Ionenstrom von $20 \mu\text{A}$ bei einer Spannung von -150 mV kann gemäß Gleichung (12) eine Anzahl N von etwa $8 \cdot 10^7$ Kanälen ermittelt werden:

$$N = \frac{I}{V \cdot \gamma} = \frac{-20 \mu\text{A}}{-150 \text{ mV} \cdot 1,67 \text{ pS}} = 8 \cdot 10^7 \quad (12)$$

V entspricht dabei der angelegten Spannung, I dem resultierenden Strom, γ der Einzelkanalleitfähigkeit und z der Anzahl an Elementarladungen, die die Membran passieren. Bei einer Gating-Ladung z von $12 e_0$ ergibt sich für den Faktor A ein Wert von $0,15 \text{ nC}$:

$$A = N \cdot z = 8 \cdot 10^7 \cdot 12 \cdot 1,609 \cdot 10^{-19} \text{ C} = 0,15 \text{ nC} \quad (13)$$

Auf Basis dieser Berechnungen können in Abhängigkeit von der Zeitkonstante τ und dem Kooperativitätskoeffizienten H die in Abbildung 17 gezeigten Ionenströme gemäß Gleichung (3) und die Gating-Ströme gemäß Gleichung (11) simuliert werden.

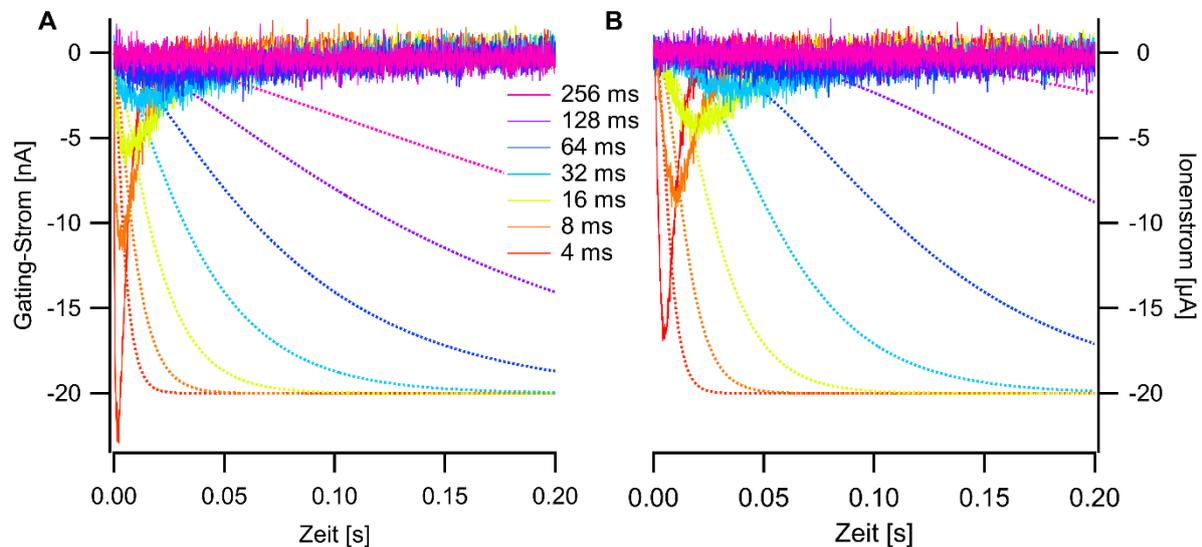


Abbildung 17: Simulation von Ionen- (gepunktete Linien) und Gating-Strömen (durchgezogene Linien) mit einem Kooperativitätskoeffizienten H von 1,5 (A) bzw. 3,5 (B) und Zeitkonstanten τ von 4 bis 256 ms. Zu beachten ist die um Faktor 1.000 unterschiedliche Skalierung. Zusätzlich wurde ein Gauß-verteilttes Rauschen mit einem r.m.s. von 1 nA addiert.

Das Rausch-Niveau des Verstärkers Dagan CA-1B liegt laut Spezifikation bei einer Filterfrequenz von 3 kHz bei 1 nA r.m.s. und wurde so auch experimentell bestätigt. Aus den simulierten Daten lässt sich ablesen, dass Gating-Ströme nur messbar sein werden, wenn die Zeitkonstante kleiner als etwa 20 ms ist und der Gating-Prozess mit einer niedrigen Kooperativität abläuft. Da die Amplitude des Gating-Stroms maximal etwa 0,1 % des Ionenstroms betragen wird, muss die Oozyte den HCN2-Kanal sehr gut exprimieren – der Ionenstrom sollte in einer Größenordnung von mindestens 20 μA liegen – und dieser Ionenstrom dann für die Messung des Gating-Stroms komplett blockiert werden.

5.4 Block des HCN2wt-Ionenstroms

5.4.1 Externer Block durch Cs^+

Um den Gating-Strom zu messen, wurde versucht, den Ionenstrom mithilfe verschiedener Blocker zu eliminieren. Ein klassischer literaturbekannter Blocker ist das Cs^+ -Ion, das mit einem Ionenradius von 1,69 Å wesentlich größer als K^+ ist (Ionenradius 1,33 Å) und damit die Pore blockiert. Für alle HCN-Subtypen und auch einzelne K_{ir} - und K_{V} -Kanäle ist dieser Block beschrieben (Makhina et al., 1994; Becchetti et al., 2002; Stieber et al., 2005).

Die Applikation von 2 mM Cs^+ reicht jedoch nicht aus, um den Ionenstrom des HCN2wt-Kanals komplett zu blockieren (Abbildung 18). Der restliche, nicht blockierbare Strom von etwa 5 %

entspricht publizierten Werten (Moroni et al., 2000; Yu et al., 2004), ist aber immer noch zu groß, um einen Gating-Strom zu messen. Zudem konnte anschließendes Auswaschen der Cs⁺-Ionen den Strom nicht vollständig wiederherstellen.

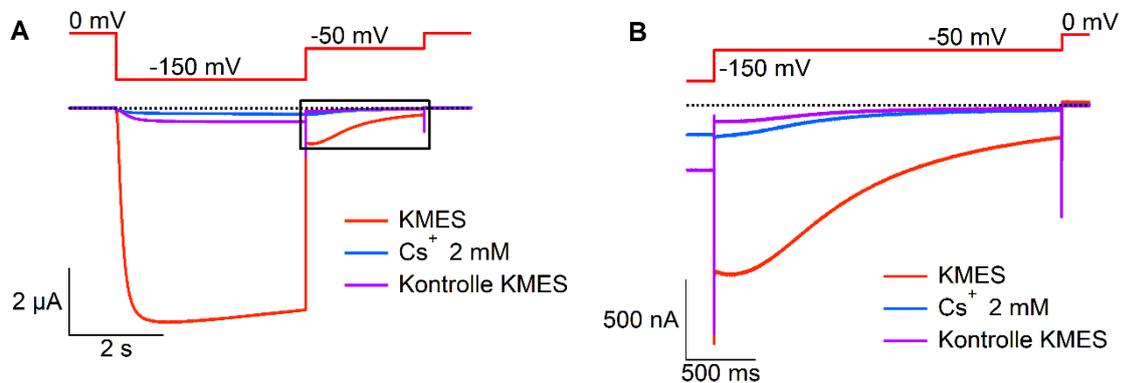


Abbildung 18: **A:** Block des HCN2wt-Stroms durch Cs⁺. **B:** Zoom in den in A markierten Bereich.

Der Tailstrom bei Cs⁺-Block ist im Vergleich zum Aktivierungsstrom deutlich höher (Abbildung 18 B), da Cs⁺ durch elektrostatische Effekte in erster Linie den Einwärtsstrom bei hyperpolarisierenden Spannungen blockiert (Gauss et al., 1998). Durch einen bei stärker depolarisierenden Spannungen auftretenden K⁺-Ausstrom wäre der Off-Gating-Strom zudem noch stärker überlagert.

5.4.2 Einsatz nicht-leitender Kationen wie NMDG

Eine weitere Variante, den Ionenstrom zu eliminieren, besteht in der Verwendung des großen organischen Kations NMDG, das die Pore des HCN-Kanals nicht passieren können sollte. Um beim Anspülen der NMDG-MES-Lösung einen konstanten Flüssigkeitsspiegel zu halten und somit mechanischen Stress zu reduzieren, wurde ein Flusssystem konstruiert, bei dem in *Guard* und *Top Pool* durch elektrische Pumpen definierte Mengen an NMDG-MES-Lösung auf der einen Seite angespült werden, während auf der anderen Seite der Pools die gleiche Menge an Badlösung entfernt wird.

Dabei zeigte sich das Anwaschen von NMDG-MES direkt verantwortlich für das Abnehmen des Ionenstroms auf bis zu 1 % des Initial-Stroms (Abbildung 19 A). Die 90/10-Zeit dieser Abnahme lag für 7 Messungen bei $6,8 \pm 1,3$ s. Durch die geänderte Ionenzusammensetzung wird allerdings das Umkehrpotential so stark in Richtung negativer Spannungen verschoben, dass im Tailstrom schon bei -50 mV ein Kationen-Ausstrom gemessen werden kann. Der Block durch NMDG-MES ist durch Auswaschen mit KMES zum größten Teil reversibel (Abbildung 19 B). Insgesamt konnte der Ionenstrom durch externe Applikation von Cs⁺- oder NMDG-Ionen nur auf 5 bzw. 1 % reduziert werden, womit eine Messung von Gating-Strömen, deren Amplitude weniger als 0,1 % des Ionenstroms betragen sollte (Abbildung 17), nicht möglich war.

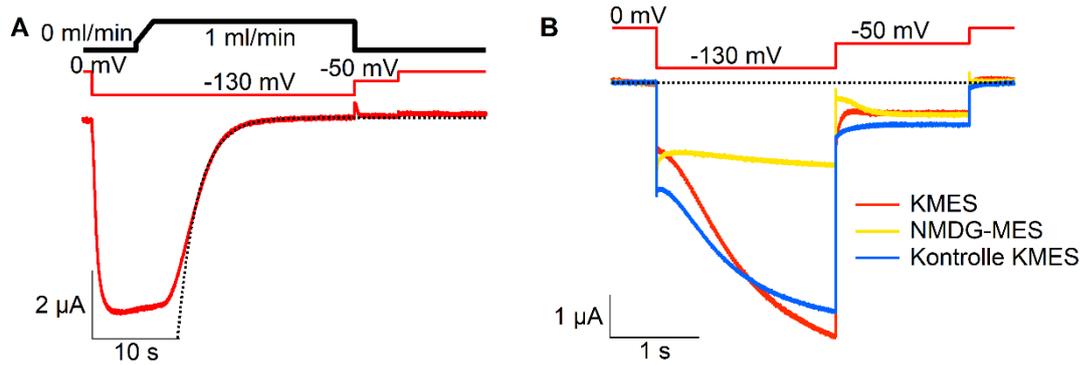


Abbildung 19: **A:** Anwaschen von NMDG-MES (schwarz) und Abnahme des HCN2wt-Ionenstroms (rot). Schwarz gestrichelt: monoexponentiell beschriebene Abnahme des Ionenstroms. **B:** Block durch NMDG-MES und anschließendes Auswaschen durch KMES.

5.4.3 Interner Block durch ZD7288

Das kleine organische Molekül ZD7288 wurde 1993 als HCN-spezifischer Blocker beschrieben (Marshall et al., 1993; BoSmith et al., 1993) und bindet an der Innenseite des Kanals an der S6-Helix (Harris und Constanti, 1995; Cheng et al., 2007; Wu et al., 2012). Aufgrund der Membranpermeabilität des Blockers konnten Gating-Ströme des spHCN-Kanals gemessen werden, indem die Oozyten für 3 Tage in einer 1 mM-Lösung inkubiert wurden (Männikkö et al., 2002; Männikkö et al., 2005). Analoge Versuche wurden in dieser Arbeit an HCN2wt-injizierten Oozyten durchgeführt. Diese überlebten allerdings nur zu etwa 20 % und waren dann nicht stabil genug, um Gating-Ströme zu messen.

Tabelle 5: Aminosäure-Sequenz an der Bindungsstelle für ZD7288.

Kanal	Sequenz	Reversibilität
spHCN	456-FALFI-460	Irreversibel
mHCN1	375-YAMFV-379	Reversibel
mHCN2	428-YAMFI-432	Reversibel
mHCN3	338-YAMFI-342	Irreversibel
mHCN4	506-YAMFI-510	Unbekannt

Dieses Verhalten lässt sich auf die Reversibilität der ZD7288-Bindung am HCN2wt-Kanal zurückführen, die auch am HCN1-Kanal beobachtet werden kann. Die daraus resultierende übermäßige Expression entlastet die Oozyte aber möglicherweise nicht, sondern führt sogar zu einer zusätzlichen Belastung. Auch frühere Versuche, den Gating-Strom des HCN1-Kanals z. B. mithilfe des Blockers ZD7288 zu messen, waren nicht erfolgreich (Bruening-Wright et al., 2007). Der Block durch ZD7288 ist dabei HCN-Isoformen-spezifisch, der spHCN- sowie der hHCN3-Kanal werden irreversibel blockiert (Shin et al., 2001; Stieber et al., 2005), die Kanäle HCN1 und HCN2 jedoch nur reversibel (Thon et al., 2013). Die Unterschiede lassen sich dabei

im Wesentlichen auf die spezifische Aminosäuren-Sequenz am intrazellulären Ende der S6-Helix zurückführen (Tabelle 5; Shin et al., 2001).

5.5 Messungen bei Spannungen in der Nähe des Umkehrpotentials

In der Nähe des Umkehrpotentials fällt die Triebkraft für den Ionenstrom weg, weshalb im Idealfall als Reaktion auf einen Spannungssprung nur noch Gating-Ströme sichtbar sein sollten (Ishida et al., 2015). Daher wurde versucht, das Umkehrpotential für den HCN2wt-Kanal durch Messungen mit verschiedenen Tailspannungen (Abbildung 20) zu bestimmen. Aufgrund der Kinetik des Tailstroms und der Variabilität der Zellen konnte das Umkehrpotential allerdings nicht exakt ermittelt werden und lag im Bereich von -5 bis -10 mV. Eine komplette Eliminierung des Ionenstroms war daher nicht möglich.

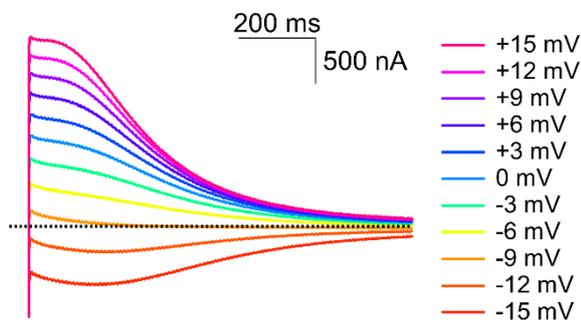


Abbildung 20: Repräsentativer Tailstrom nach Aktivierung auf -130 mV.

Allerdings konnte in wenigen Messungen bei leicht positiven Spannungen (etwa $+15$ bis $+20$ mV), bei denen der Tail-Ionenstrom ein mit der Zeit sigmoid abnehmender Auswärtsstrom ist, zusätzlich zum Ionenstrom eine kleine, ebenfalls auswärts gerichtete Komponente abgegrenzt werden (Abbildung 21), wie sie für einen Off-Gating-Strom zu erwarten wäre. Bei negativen Tailspannungen war diese Komponente im Verlauf der Sigmoidalität dagegen nicht separierbar (Abbildung 20).

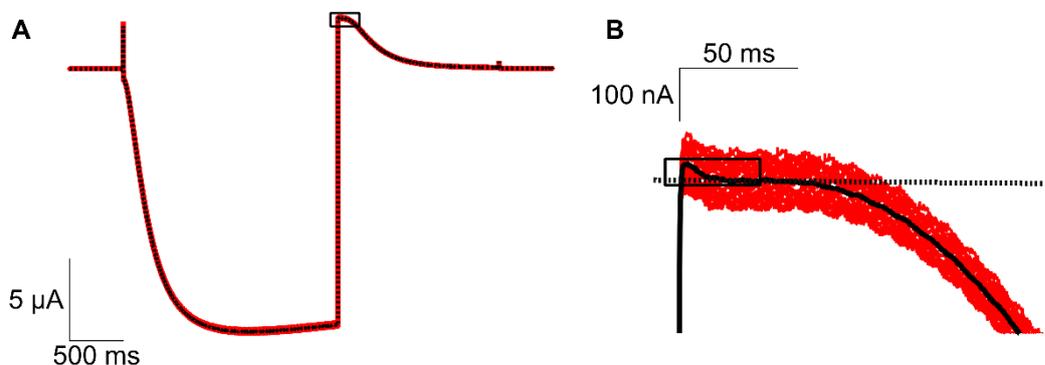


Abbildung 21: Abgrenzung des mutmaßlichen Gating-Stroms vom Ionenstrom. **A:** Mittelung (schwarz) von 20 einzelnen Stromkurven (rot) bei -130 mV, Tail bei $+20$ mV. **B:** Zoom in den in **A** schwarz markierten Bereich, Plateau linear modelliert (schwarz gepunktet).

5.5 Messungen bei Spannungen in der Nähe des Umkehrpotentials

Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses und zur genaueren Untersuchung dieses Stroms wurden je Spannung 20 einzelne Stromkurven gemittelt. Unter der Annahme, dass der Tailstrom zu Beginn der Deaktivierung aufgrund der Sigmoidalität linear verläuft, wurde der Strom zwischen etwa 20 und 50 ms nach dem Spannungssprung linear extrapoliert (Abbildung 21 B) und vom gesamten Tailstrom subtrahiert, um den mutmaßlichen Gating-Strom zu erhalten (Abbildung 22).

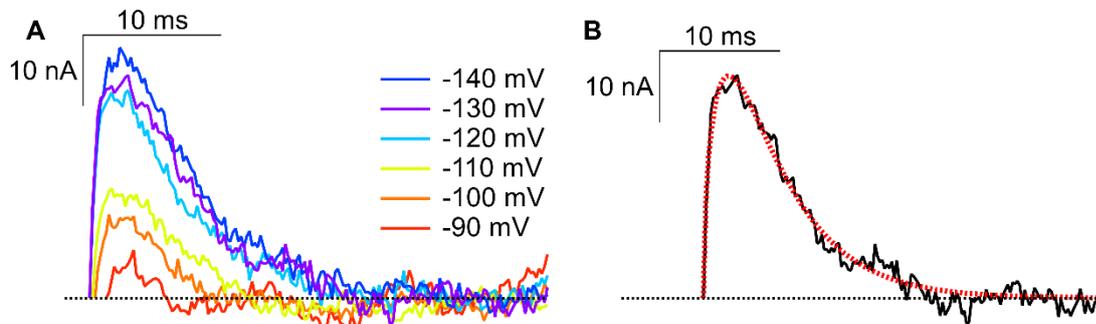


Abbildung 22: Mutmaßlicher Gating-Strom. **A:** Repräsentative Spannungsfamilie von -90 bis -140 mV nach Subtraktion des linear extrapolierten Tailstroms. **B:** Zoom in den in Abbildung 21 B schwarz markierten Bereich. Fit des mutmaßlichen Gating-Stroms bei -130 mV gemäß Gleichung (11).

Diese mutmaßlichen Gating-Ströme wurden gemäß Gleichung (11) beschrieben (Abbildung 22 B). Die Zeitkonstanten lagen dabei zwischen 3 und 4 ms, mit den langsamsten Off-Gating-Strömen bei starker Hyperpolarisation (Abbildung 23 A). Die kanalspezifische Gating-Ladung z wurde gemäß Gleichung (12) und (13) ermittelt, wobei I die Amplitude des Ionenstroms zum Ende des Aktivierungspulses und A die – durch Integration der Fläche unter der Kurve der mutmaßlichen Gating-Ströme erhaltene – gesamte übertragene Gating-Ladung einer Oozyte darstellt. Im Mittel lag die Gating-Ladung z pro tetramerem Kanal bei bis zu $10 \pm 6 e_0$ und damit im strukturell erwarteten Bereich (Abbildung 23 B). Durch anschließende Boltzmann-Modellierung wurden eine überraschend negative $V_{1/2}$ von $-113,8 \pm 4,6$ mV sowie eine schwach ausgeprägte Spannungsabhängigkeit der Gating-Ladung ($z\delta = 1,6 \pm 0,3 e_0$) ermittelt. Ein ähnlich geringe Spannungsabhängigkeit wurde auch für den spHCN-Kanal publiziert (Männikkö et al., 2002).

Die bei stärkerer Hyperpolarisation langsameren Gating-Ströme (Abbildung 23 A) könnten darauf hindeuten, dass die S4-Helix stark im aktiven Zustand arretiert ist und somit die Deaktivierung langsamer verläuft als bei weniger starker Aktivierung. Aufgrund der höheren Gating-Ladung (Abbildung 23 B) liegt allerdings die Interpretation näher, dass primär die zurückzulegende Strecke mit zunehmender Hyperpolarisation ansteigt. Daraus resultiert eine tendenziell spannungsunabhängige Geschwindigkeit der S4-Bewegung, deren Gesamtdauer dann aber von der zurückgelegten Strecke abhängt. Insgesamt verläuft der mutmaßliche Off-Gating-Prozess für den recht langsamen HCN2wt-Kanal aber überraschend schnell. Aus dem mit einer weitgehend spannungsunabhängigen Deaktivierungszeitkonstante von etwa 500 ms

5.6 Mutationen zur Messung von Gating-Strömen

(Abbildung 12 B) allerdings um Größenordnungen langsamer ablaufenden Schließen des Kanals lässt sich jedoch ableiten, dass nicht das Off-Gating, sondern die Kopplung zum Schließen des Kanals der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist.

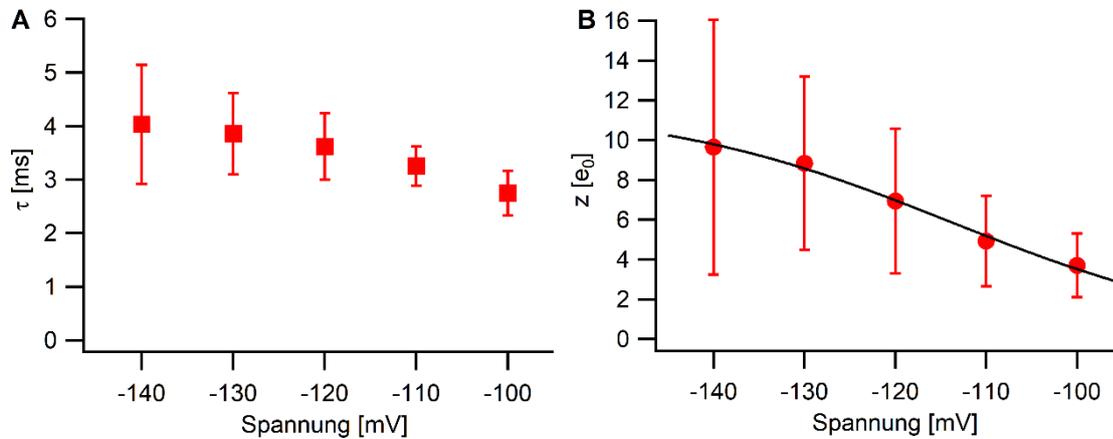


Abbildung 23: Gemäß Gleichung (11)-(13) erhaltene Zeitkonstanten (A) und Gating-Ladungen (B) des mutmaßlichen Gating-Stroms aus 4 verschiedenen Oozyten mit je 20 Kurven pro Spannung.

Als Kontrolle wurden auch nicht-injizierte Zellen nach dem gleichen Protokoll mit positiven Tailspannungen vermessen (Abbildung 24). Hierbei zeigte sich trotz Anwesenheit endogener K^+ -Kanäle zu Beginn der Aktivierung (Weber, 1999b) keine Tailstrom-Komponente, die mit dem in HCN2*wt*-injizierten Zellen gemessenen mutmaßlichen Gating-Strom vergleichbar wäre. Eine komplette Kapazitäts-Kompensation war zwar nicht möglich, trotzdem ist in den ersten 20 ms des Tailstroms deutlich die Abwesenheit weiterer Ströme zu erkennen.

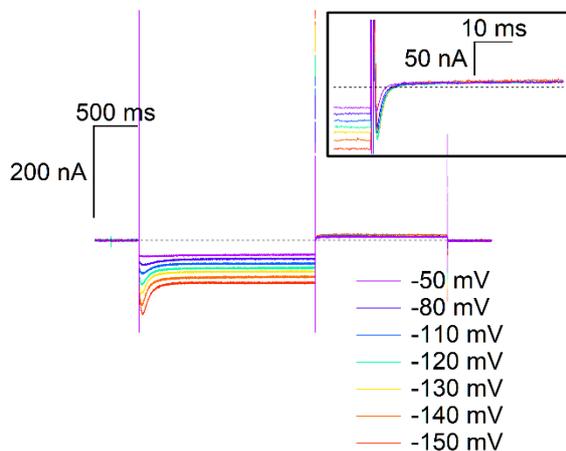


Abbildung 24: Nicht-injizierte Zellen zeigen keine mit dem mutmaßlichem Gating-Strom vergleichbare Komponente. Inset: Zoom in den Bereich des Tailstroms.

5.6 Mutationen zur Messung von Gating-Strömen

Da der Gating-Strom durch Blockieren des Ionenstroms nicht und durch Messungen in der Nähe des Umkehrpotentials nicht zuverlässig detektierbar war, wurde der HCN2-Kanal

5.6 Mutationen zur Messung von Gating-Strömen

zunächst etwas außerhalb des Selektivitätsfilters mutiert, um hier eine im Optimalfall komplett nichtleitende, bzgl. der S4-Bewegung jedoch funktionale Mutante zu vermessen.

Die Mutation A407Y sollte dabei entsprechend der P435Y-Mutation im spHCN (Tabelle 3, S. 11) zur Eliminierung des Ionenstroms führen. Da sich hier jedoch noch ein großer Strom mit HCN-artiger Kinetik und Spannungsabhängigkeit zeigte (Abbildung 25 A), sollte als nächstes die Doppelmutante Q406F/A407Y (QAFY) der Pore des erfolgreich vermessenen spHCN-Kanals näherkommen. Allerdings war auch hier noch ein großer Ionenstrom sichtbar, wenn auch mit langsamerer Kinetik als beim Wildtyp-Kanal (Abbildung 25 B). Somit waren beide Mutanten nicht geeignet, um Gating-Ströme zu messen.

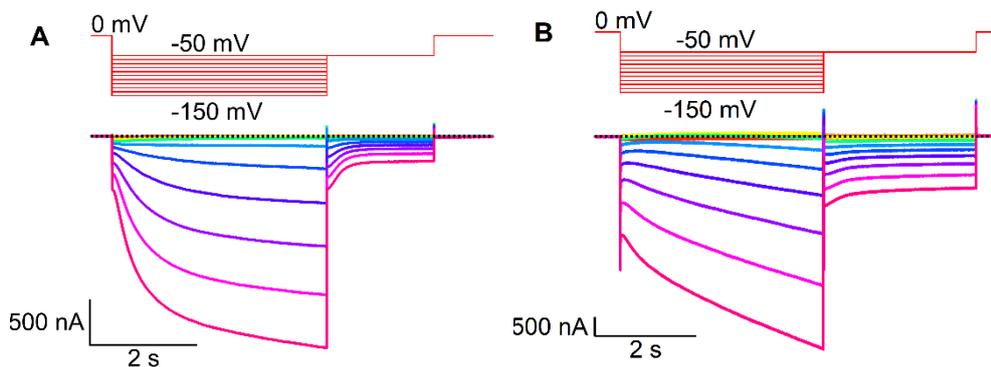


Abbildung 25: Leck-korrigierte Stromkurven der Mutanten A407Y (A) und Q406F/A407Y (QAFY; B).

Zusätzlich wurden auch Mutationen direkt am mutmaßlichen Selektivitätsfilter, dem GYG-Motiv, vorgenommen (Tabelle 3, S. 11). Die beiden Mutanten Y403A und Y403S zeigten dabei allerdings noch signifikante Ionenströme (Abbildung 26). Diese waren zwar bei ersterer recht klein, dennoch war eine Messung von Gating-Strömen auch bei diesen beiden Mutanten nicht möglich.

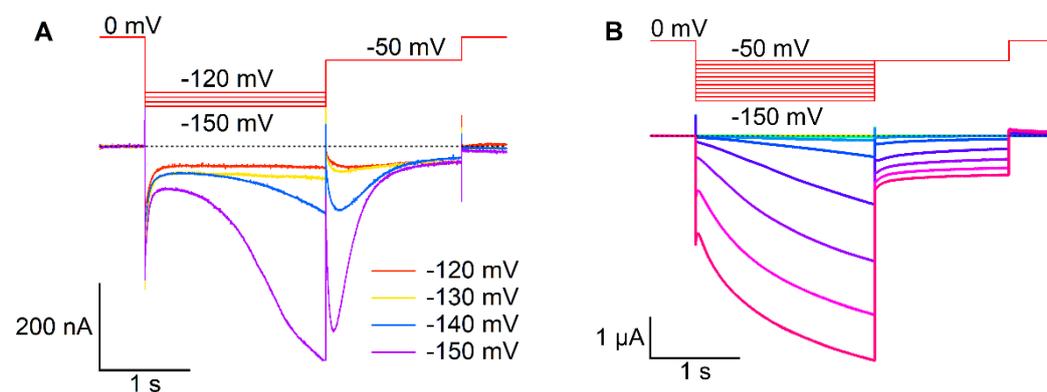


Abbildung 26: Repräsentative Stromkurven der Mutanten Y403A (A) und Y403S (B).

Auch die beiden Mutanten G402S und G404S zeigten noch signifikante Ionenströme, allerdings fielen die Messungen durch ein besonderes mehrphasiges Verhalten auf (Abbildung 27). Eine Messung von Gating-Strömen war somit auch bei diesen beiden Mutanten nicht möglich, aufgrund des auffälligen Verhaltens wurde jedoch eine genaue Charakterisierung vorgenommen.

5.7 Charakterisierung der Mutanten HCN2-G402S und -G404S

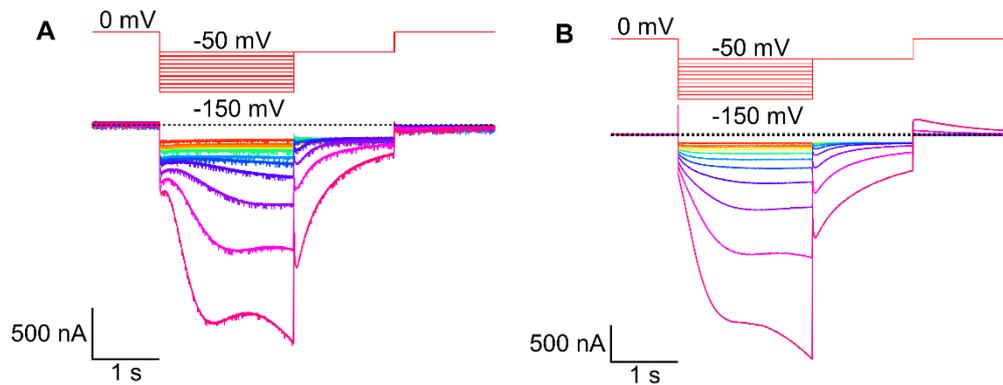


Abbildung 27: Repräsentative Stromkurven der Mutanten G402S (A) und G404S (B).

5.7 Charakterisierung der Mutanten HCN2-G402S und -G404S

5.7.1 Typisches Verhalten

Die Stromkurven der Mutanten G402S und G404S bei hyperpolarisierenden Spannungen lassen sich regelmäßig in folgende drei Komponenten aufteilen (Abbildung 28):

1. Komponente: HCN-artige Aktivierung, Dauer etwa 500 bis 1.000 ms
2. Komponente: leichte Inaktivierung, tritt nach etwa 1.000 bis 2.000 ms auf
3. Komponente: sehr langsame Aktivierung, tritt nach etwa 1.500 bis 2.500 ms auf

Zur Charakterisierung der beiden Porenmutanten sollen sowohl die I/V -Kurve als auch die Kinetik untersucht werden. Die normierten Tailströme weisen allerdings – abweichend vom HCN2 wf -Kanal – auch bei Spannungen von bis zu -150 mV kein sättigendes Verhalten auf (Abbildung 29 A), weshalb keine $V_{1/2}$ bestimmt werden konnte.

Bei Messung mehrerer Stromkurven nacheinander fielen bei gleicher Aktivierungsspannung Veränderungen der Strom- und Tailstrom-Amplituden auf, die selbst nach einer Wartezeit von 50 s noch zu beobachten waren. Um zu identifizieren, ob diese Effekte auf eine langsame Kinetik oder auf einen dauerhaften Effekt, wie z. B. eine Leck-Veränderung, zurückzuführen sind, wurde systematisch die Aktivierungszeit von 500 auf 4.000 ms erhöht (Abbildung 28). Die beiden porenmutierten Kanäle G402S und G404S öffneten dabei umso schneller und stärker, je länger die vorhergehende Aktivierung war (Abbildung 28 A-B), während ein solcher Effekt beim HCN2 wf -Kanal nicht zu beobachten war (Abbildung 28 C).

5.7 Charakterisierung der Mutanten HCN2-G402S und -G404S

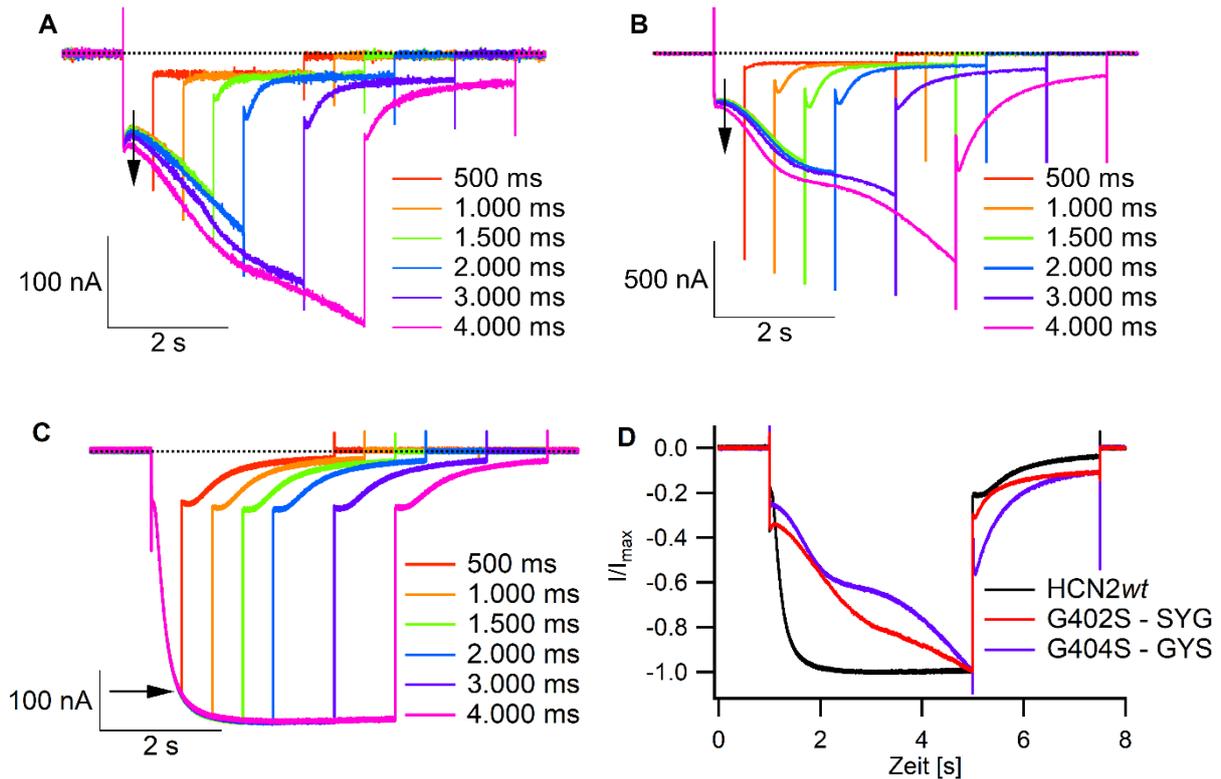


Abbildung 28: Repräsentative Stromkurven nach verschiedenen langen Aktivierungen bei -140 mV für die Mutanten G402S (A) und G404S (B) bzw. den HCN2wt (C). Die Pfeile deuten die Änderung der Aktivierung schon nach 500 ms an. D: Vergleich beispielhafter normierter Stromkurven bei -140 mV und 4 s Aktivierung.

Die quantitative Auswertung dieses Verhaltens soll durch Gleichung (14) erfolgen:

$$I_t(i)_{norm.} = \frac{I_t(i) - I_{50}(0)}{I_{500}(0) - I_{50}(0)} \quad (14)$$

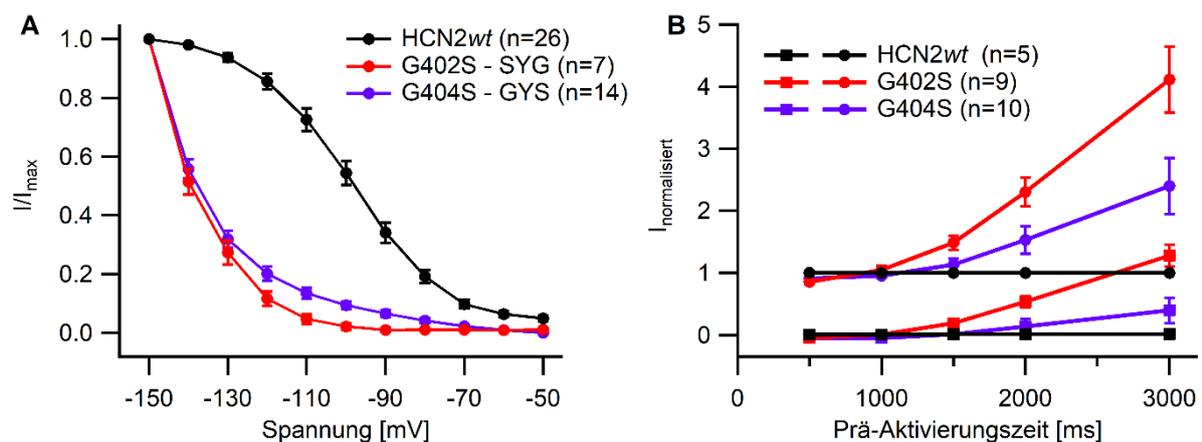


Abbildung 29: Vergleich der Porenmutanten G402S und G404S mit dem HCN2wt. A: I/V-Kurven nach einer Aktivierung über 2 s. B: Vergleich der normierten Ströme nach 50 ms (Quadrate) bzw. 500 ms der Aktivierung (Kreise) in Abhängigkeit von der Dauer der vorhergehenden Aktivierung bei -140 mV. Aufgetragen wurde der gemäß Gleichung (14) bestimmte normierte Strom gegen die Aktivierungsdauer i der vorhergehenden Messung, die Pause zwischen den Pulsen betrug 50 s.

5.7 Charakterisierung der Mutanten HCN2-G402S und -G404S

Durch Subtraktion des Stroms nach 50 ms der ersten Aktivierung vom Strom (nach $t = 50$ bzw. 500 ms) nach einer Prä-Aktivierung ($i = 500$ bis 3.000 ms) und anschließende Normierung soll die Stärke der Öffnung beschrieben werden. So ergibt sich beispielsweise für die Mutante G402S bei einer Prä-Aktivierung von 3.000 ms ein Strom nach 500 ms, der etwa 4-mal so groß ist wie bei einer Prä-Aktivierung von lediglich 500 ms (Abbildung 29 B).

Dieses auffällige Verhalten könnte durch die langsame, spät auftretende Aktivierung (dritte Komponente) verursacht werden, wodurch das Schließen potentiell langsamer abläuft und die erneute Aktivierung begünstigt wird oder die Kanäle sogar unmittelbar offen sind. Dieser Hypothese soll durch eine Analyse der Tailströme in Kapitel 5.7.3 nachgegangen werden.

Aufgrund der Porenveränderung sollte außerdem überprüft werden, inwiefern sich die Rektifizierung der Porenmutanten vom HCN2 wt -Kanal unterscheidet. Dazu wurden nach 4 s Aktivierung die Spannung von -150 mV innerhalb von 50 ms durch ein schnelles Rampen-Protokoll auf $+50$ mV gesteigert (Abbildung 30 A). Bei beiden Porenmutanten zeigte sich ein Verlust der für den HCN2 wt -Kanal typischen (Vemana et al., 2008) Einwärtsrektifizierung (Abbildung 30 B).

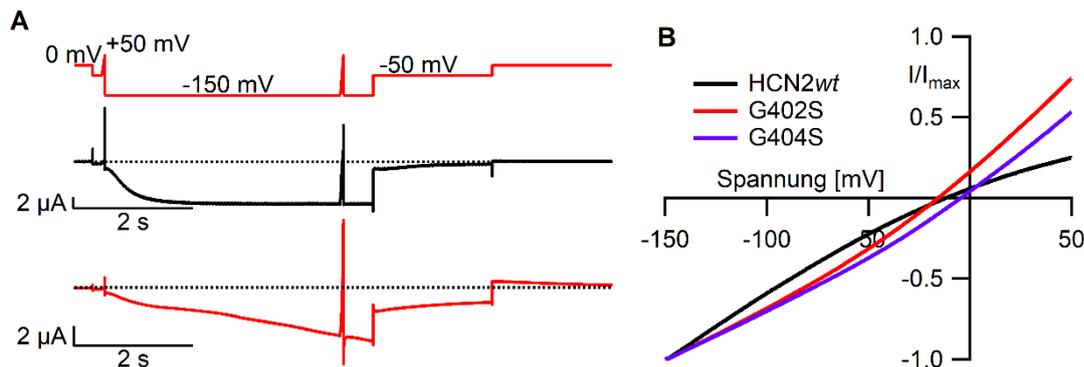


Abbildung 30: Schnelle Rampen-Protokolle. **A:** Repräsentatives Rampen-Protokoll mit Spannungs-Rampe von -150 zu $+50$ mV für den HCN2 wt (schwarz) und die Mutante G402S (rot). **B:** Vergleich der Ströme schneller Rampen nach 4 s Aktivierungsdauer für die Kanäle HCN2 wt , -G402S und -G404S.

5.7.2 Bestimmung der Gating-Ladung

Da aus der nicht-sättigenden I/V -Kurve weder $V_{1/2}$ noch eine Gating-Ladung bestimmt werden konnten (Abbildung 29 A), wurde mit der in Abschnitt 5.2.2 vorgestellten „initial-slope“-Methode (Noceti et al., 1996) auch für die Mutante G404S versucht, aus langsamen Rampen-Protokollen die effektive Gating-Ladung zu bestimmen (Abbildung 31).

5.7 Charakterisierung der Mutanten HCN2-G402S und -G404S

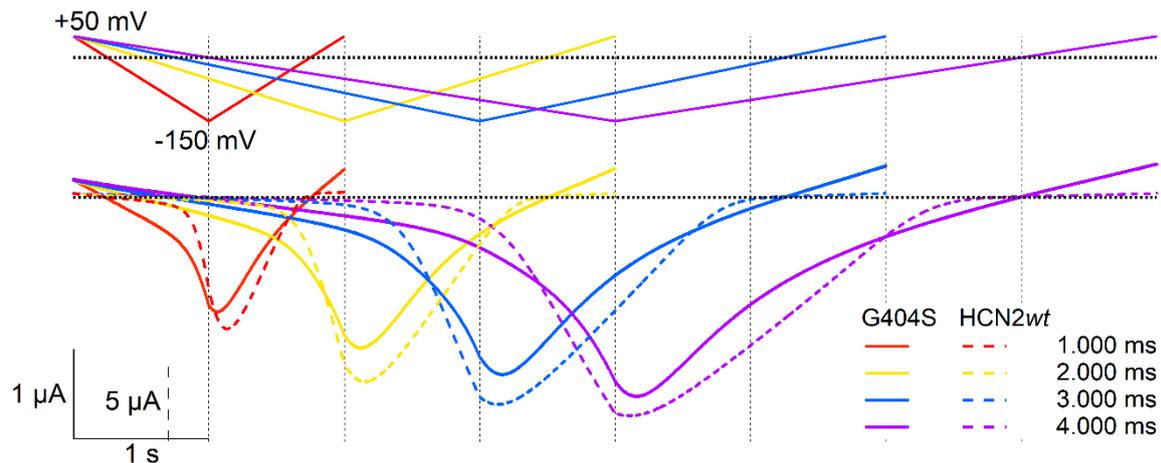


Abbildung 31: Repräsentative Stromkurven als Reaktion auf Spannungsrampen von +50 über -150 mV zurück zu +50 mV in Zeiten von 1.000 bis 4.000 ms pro Schenkel (\cong Geschwindigkeiten von 200 bis 50 mV/s). Vergleichsdaten für den HCN2wt aus Abbildung 15.

In Abbildung 32 A wurde die als „chord conductance“ erhaltene Leitfähigkeit semi-logarithmisch gegen die Spannung aufgetragen. Die aus der scheinbaren Steigung dieser Kurven bestimmte effektive Gating-Ladung (Noceti et al., 1996) lag mit $1,2 \pm 0,2 e_0$ deutlich unter den Werten, die analog für den HCN2wt-Kanal bestimmt wurden (2,0 bis 2,4 e_0 , Abbildung 16), war aber unabhängig von der Dauer der Rampen-Protokolle (Abbildung 32 B).

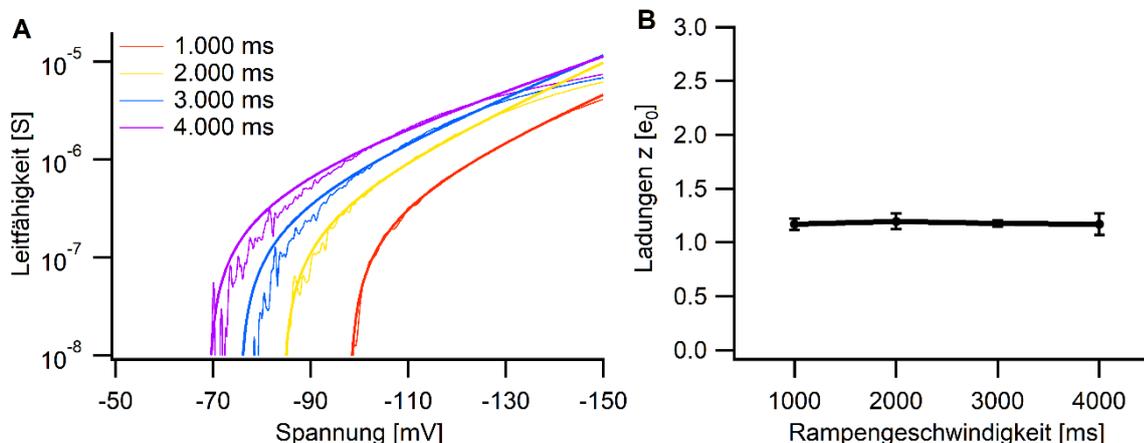


Abbildung 32: Bestimmung der effektiven Gating-Ladung mit der „initial-slope“-Methode für die Mutante G404S. **A:** Logarithmisch aufgetragene Leitfähigkeit (dünn) und Fit (fett) gemäß Gleichung (10). **B:** Effektive Gating-Ladungen $z\delta$ in Abhängigkeit von der Rampengeschwindigkeit ($n=5$).

Zusätzlich wurden die langsamen Rampen-Ströme in Abbildung 31 lokal differenziert, um die Leitfähigkeit als slope conductance zu erhalten. Eine quantitative Auswertung ist dabei nicht möglich (vgl. Kapitel 5.2.2), qualitativ zeigte sich jedoch, dass die Leitfähigkeit aus zwei Komponenten besteht, von denen die erste bei -90 mV und die zweite bei -125 mV einsetzt (Abbildung 33). Analog zu den Daten aus Abbildung 29 wird keine maximale Aktivierung erreicht.

5.7 Charakterisierung der Mutanten HCN2-G402S und -G404S

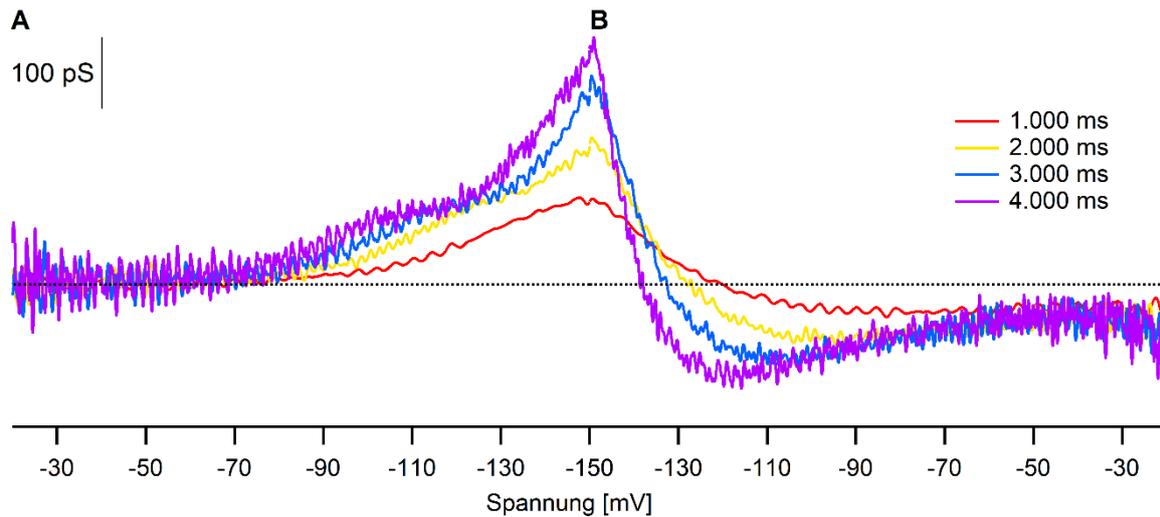


Abbildung 33: Leitfähigkeit während der Aktivierung (A) bzw. der Deaktivierung (B), erhalten als Ableitung des Stroms nach der Spannung für die Mutante G404S. Das starke Rauschen ist ein Artefakt der Bestimmung der „slope conductance“ als numerische Ableitung, die Daten wurden binomial geglättet (Marchand und Marmet, 1983).

5.7.3 Beschreibung der Tailströme

Neben der mehrphasigen Aktivierung unterscheiden sich auch die Tailströme der beiden Mutanten stark vom HCN2*wt*. Auf eine schnelle initiale Zunahme des Stroms folgt eine Deaktivierung, die zu Beginn schneller ist als die des HCN2*wt*, später jedoch deutlich langsamer oder sogar unvollständig wird (Abbildung 34 A). Je länger die Aktivierung zuvor andauerte, umso langsamer schließen die beiden porenmutierten Kanäle (Abbildung 34 C-D), während dies beim HCN2*wt* nur in geringem Maße der Fall ist (Abbildung 34 B). Eine Modellierung dieses Verhaltens soll in Kapitel 5.7.4 erfolgen.

Für den HCN2*wt* beträgt die Amplitude des Tailstroms bei -50 mV – wie unter Annahme eines Umkehrpotentials von 0 mV zu erwarten wäre – etwa ein Drittel der Stromamplitude am Ende der Aktivierung bei -150 mV. Die Stromamplitude der Porenmutanten liegt dagegen nur direkt nach dem Spannungssprung auf diesem Niveau, sodass die anschließende Zunahme des Tailstroms sogar zu einer höheren Leitfähigkeit als während der Aktivierung führt (z. B. in Abbildung 28 D sichtbar).

5.7 Charakterisierung der Mutanten HCN2-G402S und -G404S

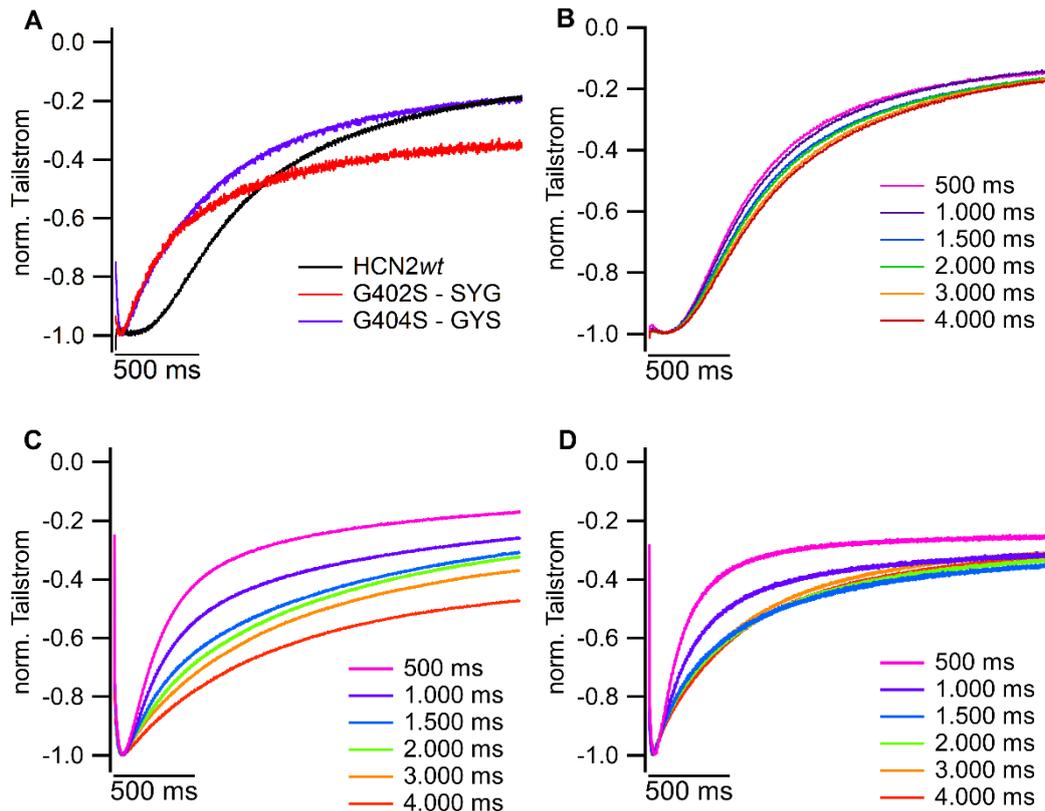


Abbildung 34: **A:** Vergleich repräsentativer normierter Tailströme nach 4 s Aktivierung bei -140 mV. **B-D:** Repräsentative normierte Tailströme des HCN2wt (**B**) und der Mutanten G402S (**C**) bzw. G404S (**D**) nach verschiedenen langen Aktivierungszeiten bei -140 mV.

Zur Quantifizierung dieses Effektes wurde die initial nach dem Spannungssprung bzw. nach maximaler Reaktivierung als „chord conductance“ ermittelte Leitfähigkeit im Tailstrombereich auf die maximale Leitfähigkeit während der Aktivierung normiert und in Abbildung 35 A gegen die Aktivierungsspannung aufgetragen. Dabei zeigte sich, dass der normierte maximale Tailstrom insbesondere bei negativeren Aktivierungsspannungen deutlich höher ist als für den HCN2wt. Aufgrund der während der mehrphasigen Aktivierung beobachteten Inaktivierung liegt es nahe, dass die Zunahme des Tailstroms der Porenmutanten auf eine Reaktivierung dieses Stromanteils zurückzuführen ist.

Alternativ könnte diese Beobachtung auch durch eine Verschiebung des Umkehrpotentials verursacht werden. Dagegen spricht allerdings, dass die initial nach dem Spannungssprung bestimmte Leitfähigkeit bei den gleichen Werten wie kurz vor dem Spannungssprung liegt. Die beobachtete Zunahme der Leitfähigkeit innerhalb der ersten 50 ms nach dem Spannungssprung deutet vielmehr auf einen Inaktivierungs-Reaktivierungs-Mechanismus hin.

Für die beiden Mutanten wird außerdem deutlich, dass das Verhältnis vom maximalen Tail- zum Aktivierungsstrom auch von der Aktivierungsdauer abhängt (Abbildung 35 B). Bei mittellangen Aktivierungen (1.000 bis 2.000 ms) zeigt sich ein erhöhter relativer Tailstrom, der auf die kurzzeitige Inaktivierung (Abbildung 28) zurückzuführen ist. Die Angleichung der

5.7 Charakterisierung der Mutanten HCN2-G402S und -G404S

Leitfähigkeiten während der Aktivierung und des Tailstroms bei längerer Aktivierung kann durch die Zunahme der dritten (aktivierenden) Komponente erklärt werden.

Im Gegensatz dazu zeigt sich ein solches Verhalten für den HCN2*wt* nicht (Abbildung 35 B). Hier liegt die relative Leitfähigkeit im Tailstrom bei allen Bedingungen bei 60 bis 70 % der Leitfähigkeit während der Aktivierung und nimmt mit zunehmender Aktivierungsspannung und -dauer sogar ab. Diese verringerte Leitfähigkeit kann auf die Einwärts-Rektifizierung (Abbildung 30 B; Vemana et al., 2008) zurückgeführt werden.

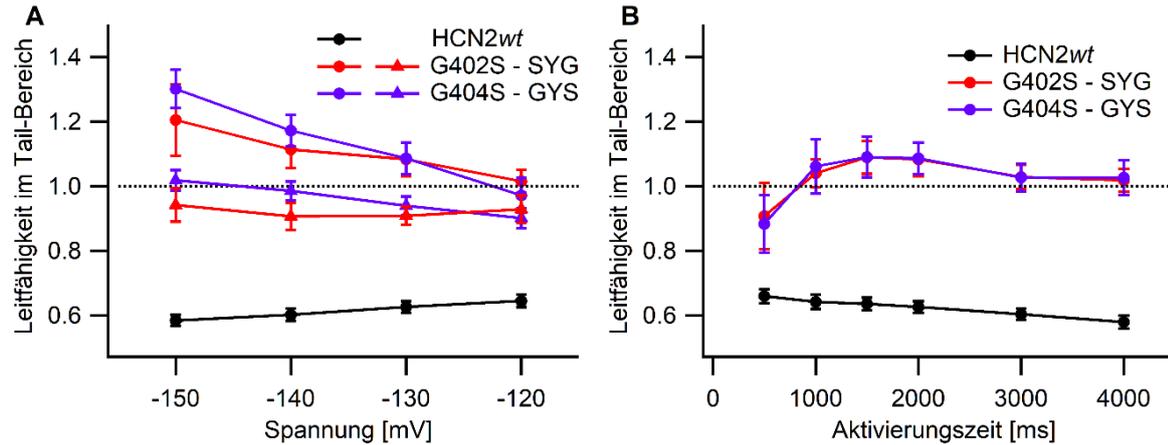


Abbildung 35: **A:** Auf maximale Leitfähigkeit während der Aktivierung normierte maximale (Kreise) bzw. initiale (Dreiecke) Leitfähigkeit des Tailstroms bei -50 mV nach 2 s Aktivierung in Abhängigkeit von der Aktivierungsspannung. **B:** Normierte Leitfähigkeit des maximalen Tailstroms bei -50 mV nach einer Aktivierung bei -130 mV in Abhängigkeit von der Aktivierungszeit. Daten sind Mittelwerte \pm s.e.m. aus n Messungen für HCN2*wt* ($n=5$), G402S ($n=9$) und G404S ($n=10$).

5.7.4 Modellierung der Tailströme

Zur Quantifizierung und Modellierung der im vorherigen Kapitel beschriebenen Effekte wurde Gleichung (15) als Kombination aus einer Reaktivierung und einer biexponentiellen Deaktivierung an die Tailströme der beiden Mutanten G402S und G404S angepasst (Abbildung 36).

$$I(t) = A \cdot \left(1 - \left(e^{\left(\frac{-(t-t_0)}{\tau_1}\right)}\right)\right) \cdot \left(1 - \left(1 - e^{\left(\frac{-(t-t_0)}{\tau_2}\right)}\right)\right) + B \cdot \left(1 - \left(1 - e^{\left(\frac{-(t-t_0)}{\tau_3}\right)}\right)\right) - D \quad (15)$$

Der erste Term soll mit Hilfe des Stromanteils A und den beiden Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 eine Reaktivierung und einen Teil der Deaktivierung des Tailstroms beschreiben und somit den potentiell HCN-artigen Stromanteil identifizieren. Der zweite Term besteht aus dem Stromanteil B sowie der Deaktivierungszeitkonstante τ_3 und soll den restlichen Anteil der Deaktivierung und damit den Stromanteil der mutmaßlich unabhängigen, spät aktivierenden Komponente beschreiben. D ist ein konstanter Offset. Die Deaktivierungs-Zeitkonstanten τ_2 und τ_3 wurden gemäß ihrer relativen Anteile A und B gewichtet:

$$\tau_w = \tau_2 \cdot A + \tau_3 \cdot B \quad (16)$$

5.7 Charakterisierung der Mutanten HCN2-G402S und -G404S

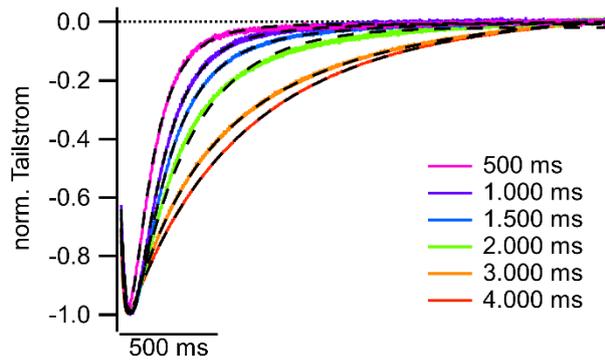


Abbildung 36: Repräsentative normierte Tailströme der Mutante G402S nach 500 bis 4.000 ms Aktivierung bei -140 mV. Schwarz: Modellierung gemäß Gleichung (15).

Die Tailströme nach einer Aktivierungszeit von nur 500 ms konnten dabei nicht immer zuverlässig modelliert werden und bleiben daher bei den folgenden Auswertungen unberücksichtigt. Die Zeitkonstante der Reaktivierung τ_1 nahm für beide Mutanten mit zunehmender Aktivierungsspannung und -dauer ab (Abbildung 37).

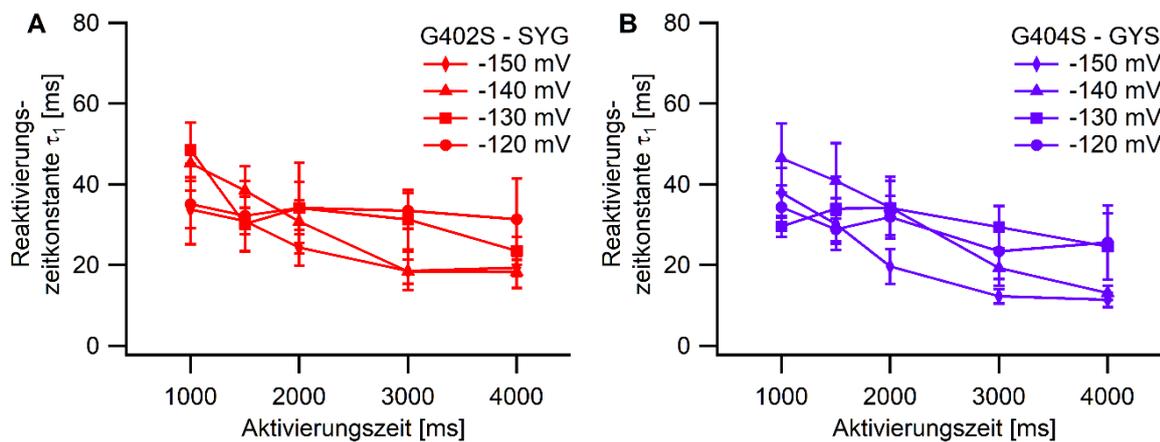


Abbildung 37: Modellierung von Tailströmen der Porenmutanten G402S (A) und G404S (B) gemäß Gleichung (15). Reaktivierungszeitkonstante τ_1 in Abhängigkeit von Aktivierungsspannung und -dauer. Daten sind Mittelwerte \pm s.e.m. aus je 8 Messungen.

Die mit τ_1 verknüpfte Deaktivierungszeitkonstante τ_2 blieb dagegen konstant und auch die in der Modellierung unabhängige Zeitkonstante τ_3 nahm nur leicht zu. Die gemäß Gleichung (16) gewichtete Zeitkonstante τ_w stieg dagegen stark an (Abbildung 38 A-B), was sich auf das veränderte Verhältnis zwischen den beiden Anteilen A und B zurückführen lässt (Abbildung 38 C-D). Dies lässt sich damit begründen, dass mit zunehmender Aktivierungsspannung und -dauer der Anteil der dritten Komponente, die durch den Parameter B beschrieben wird, ansteigt.

5.7 Charakterisierung der Mutanten HCN2-G402S und -G404S

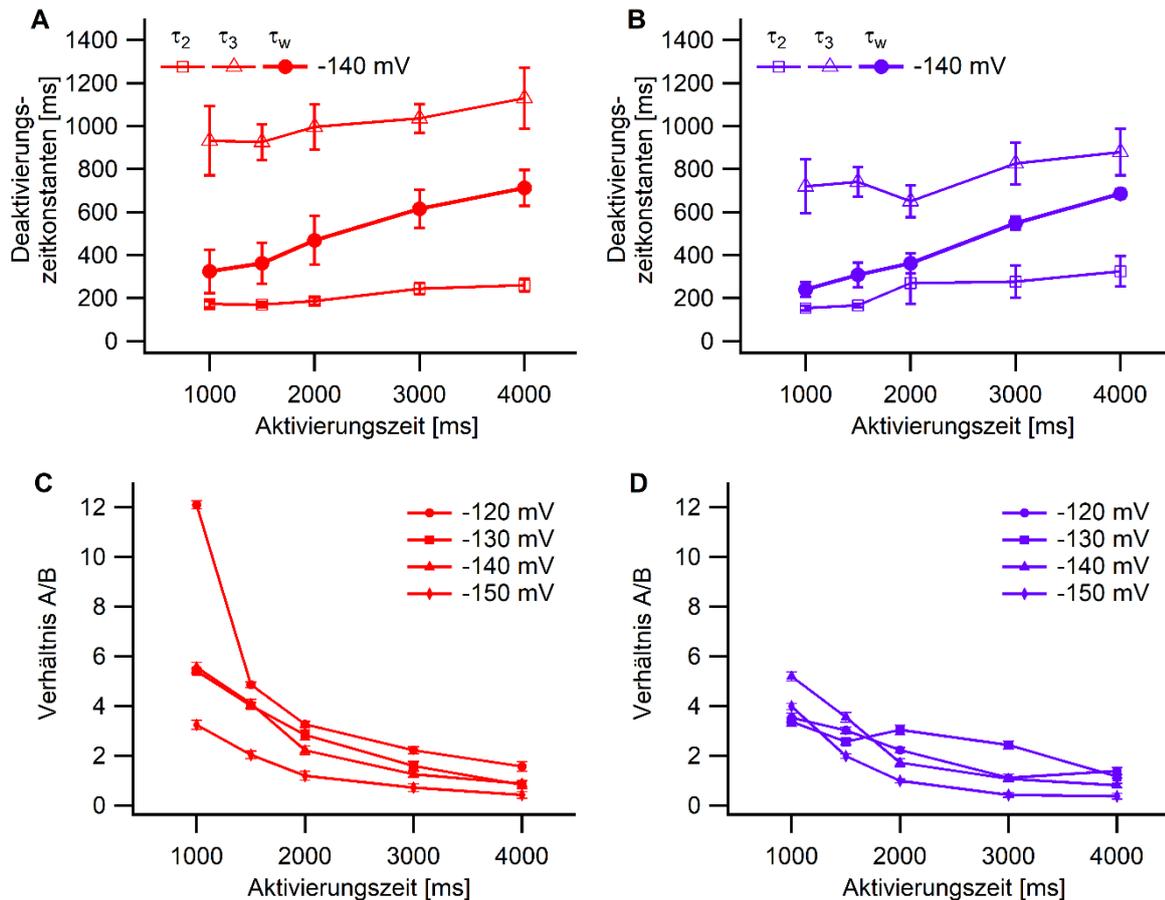


Abbildung 38: Deaktivierungszeitkonstanten sowie spannungsabhängiges Verhältnis der Komponenten A und B für die Mutanten G402S (A, C) und G404S (B, D) nach einer Aktivierung bei -140 mV.

Mithilfe dieser Modellierung können die in Abbildung 28, 29 sowie 34 und 35 dargestellten Effekte quantitativ beschrieben werden. Je länger und stärker aktiviert wurde, umso größer wurde der Anteil der langsam schließenden Komponente. Die dadurch insgesamt langsamer verlaufende Deaktivierung sorgt dafür, dass dieser Kanal anschließend leichter öffnen kann bzw. sogar unmittelbar offen ist.

5.7.5 Identifikation der Leitfähigkeiten mittels blockierender Kationen

Grundsätzlich besteht bei den hier vorliegenden Mutationen die Möglichkeit, dass die gemessenen Ströme nicht nur aus den mutierten HCN-Kanälen, sondern auch aus endogenen Kanälen stammen. Diese Überlagerung mit Strömen endogener Kanäle bei der heterologen Expression ist seit den Anfängen der Arbeit an *Xenopus laevis*-Oozyten bekannt (Kusano et al., 1977; Tzounopoulos et al., 1995; Krause et al., 1996; Weber, 1999a). Dabei wurden sowohl Kationenkanäle wie z. B. Natrium-, Kalium- und Calcium-Kanäle als auch Anionenkanäle wie z. B. calcium- und hyperpolarisationsaktivierte Chlorid-Kanäle identifiziert (Weber, 1999b; Terhag et al., 2010). Vor allem auf letztere muss bei der Untersuchung von HCN-Kanälen aufgrund der ähnlichen Spannungsabhängigkeit stets geachtet werden.

5.7 Charakterisierung der Mutanten HCN2-G402S und -G404S

Um die hier vorliegenden Stromkomponenten voneinander zu unterscheiden, wurde die Reaktion des Stroms auf das Anspülen verschiedener Blocker untersucht. Dazu wurden einerseits der HCN-Blocker Cs^+ (Moroni et al., 2000), andererseits eine Mischung aus $100 \mu\text{M}$ Gd^{3+} , $100 \mu\text{M}$ La^{3+} und 1 mM Ba^{2+} (Vemana et al., 2008) – hier als „GdLaBa-Block“ bezeichnet – verwendet, die verschiedene endogene Kanäle blockieren soll (Weber, 1999b; Kuruma et al., 2000; Vemana et al., 2008; Terhag et al., 2010).

Während durch Cs^+ die HCN-artige erste Komponente der Mutante G404S blockierbar ist (Abbildung 39 A), wird beim Anspülen des GdLaBa-Blocks hauptsächlich die dritte Komponente (in Form vermutlich langsam öffnender endogener Kanäle) blockiert (Abbildung 39 B). In Abbildung 39 A wurde zusätzlich der durch Cs^+ blockierte Stromanteil ermittelt, der ebenso wie der Stromanteil unter GdLaBa-Block (Abbildung 39 B) den HCN-artigen Strom beschreibt und das bereits postulierte Verhalten aus Aktivierung und Inaktivierung zeigt. Der durch GdLaBa blockierte Stromanteil (Abbildung 39 B) zeigt dagegen die für endogene Kanäle erwartete langsame Aktivierung (Weber, 1999b).

Die im Tail schnell reaktivierende Komponente, die zudem analog zu Kapitel 5.7.3 eine relativ erhöhte Maximal-Leitfähigkeit besitzt, verschwindet unter Cs^+ -Block (Abbildung 39 A), während die Reaktivierung unter GdLaBa-Block sichtbar bleibt (Abbildung 39 B).

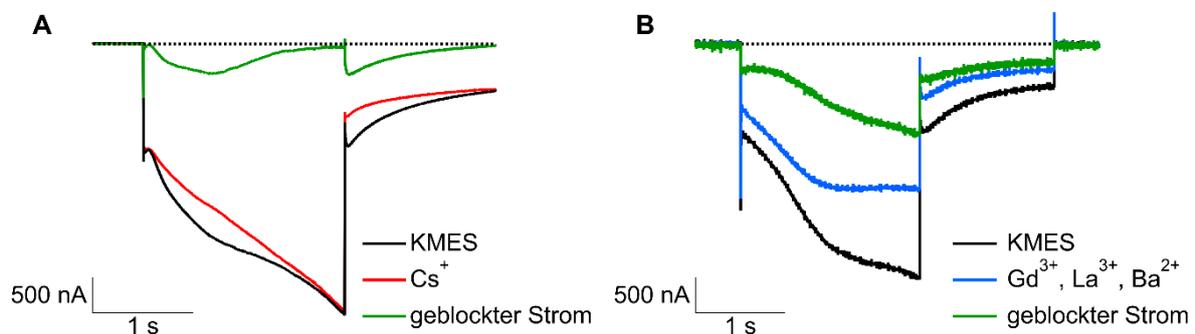


Abbildung 39: Repräsentative Ströme des HCN2-G404S-Kanals. **A:** Anwaschen von 2 mM Cs^+ -Ionen. **B:** Anwaschen des GdLaBa-Blocks.

Während der HCN2wt-Kanal von Cs^+ -Ionen blockiert wird (Abbildung 18), zeigt sich nur eine minimale Reaktion auf den GdLaBa-Block (Abbildung 40 A; Yu et al. 2004). Nicht-injizierte Zellen werden weder von Cs^+ -Ionen noch vom GdLaBa-Block signifikant beeinflusst (Abbildung 40 B-C).

5.7 Charakterisierung der Mutanten HCN2-G402S und -G404S

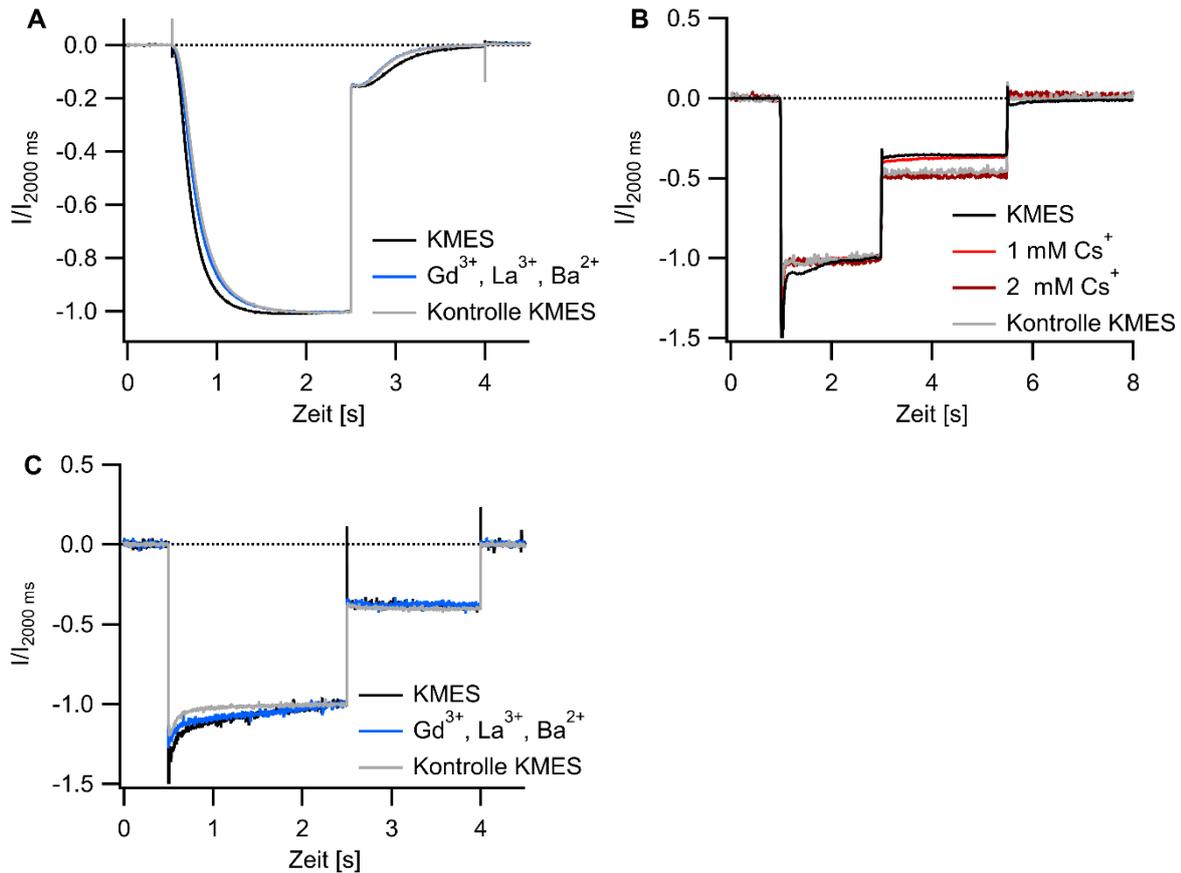


Abbildung 40: **A:** Reaktion von HCN2wt-Kanälen auf den GdLaBa-Block. **B, C:** Reaktion nicht-injizierter Oozyten auf Cs^+ -Ionen und die GdLaBa-Lösung. Aktivierung jeweils bei -140 mV , Stromkurven sind auf den Strom nach 2 s Aktivierung normiert und binomial geglättet.

Insgesamt können demnach sowohl die Aktivierung und Inaktivierung als auch die Reaktivierung im Tail aus einer mutierten HCN-artigen Pore stammen, während die dritte Komponente vermutlich auf überlagernde endogene Chlorid-Kanäle zurückzuführen ist.

5.7.6 Modellierung der Aktivierungsströme

Zur Beschreibung der beiden unabhängigen Komponenten der Aktivierungsströme bei Expression der Mutanten G402S und G404S wurde – in Analogie zur Beschreibung der HCN2wt-Stromkurven (Kapitel 5.1) – ein einfaches Hodgkin-Huxley-Modell (Modell I) als Summe einer zusätzlich mit einer Inaktivierung gekoppelten HCN-artigen Komponente und einer aus endogenen Kanälen stammenden Komponente mit oozytenspezifischem Verhältnis verwendet.



Dazu wurden bei Spannungen von -130 bis -150 mV Ströme bei Aktivierungszeiten von 2.000 bis 4.000 ms aufgenommen und auf den Ionenstrom am Ende des längsten -150 mV -Pulses

5.7 Charakterisierung der Mutanten HCN2-G402S und -G404S

normiert. Anschließend wurden die erhaltenen Kurven gemäß Gleichung (17) global modelliert (Abbildung 41).

$$I(t) = A \cdot \left(1 - \left(e^{\frac{-(t-t_0)}{\tau_1}}\right)\right)^{H_1} \cdot e^{\frac{-(t-t_0)}{\tau_2}} + \left(\frac{A}{C} - A\right) \cdot \left(1 - \left(e^{\frac{-(t-t_0)}{\tau_1}}\right)\right)^{H_1} + B \cdot \left(1 - \left(e^{\frac{-(t-t_0)}{\tau_3}}\right)\right)^{H_2} \quad (17)$$

Dabei beschreiben die ersten beiden Summanden das HCN-artige Aktivierungs-/Inaktivierungsverhalten mit der relativen Amplitude A , der Stärke der Inaktivierung C , den Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 und dem Kooperativitätskoeffizienten H_1 . Der dritte Summand beschreibt die späte Aktivierung mit der relativen Amplitude B , der Zeitkonstante τ_3 und dem Kooperativitätskoeffizienten H_2 . Eine genaue Erläuterung dieses Vorgehens findet sich in Anhang III. Die Zeitkonstanten und die Stärke der Inaktivierung wurden für alle Aktivierungszeiten innerhalb einer Spannung als konstant angesehen und die Parameter A und B für jede Kurve einzeln bestimmt. Die Kooperativitätskoeffizienten wurden zur Reduzierung der Zahl freier Parameter ebenfalls über alle Spannungen und Aktivierungszeiten konstant gehalten, wodurch die Qualität der Modellierung aufgrund der nur schwach ausgeprägten Spannungsabhängigkeit der für den HCN2 wt -Kanal bestimmten Koeffizienten (Abbildung 12) aber kaum beeinflusst werden sollte.

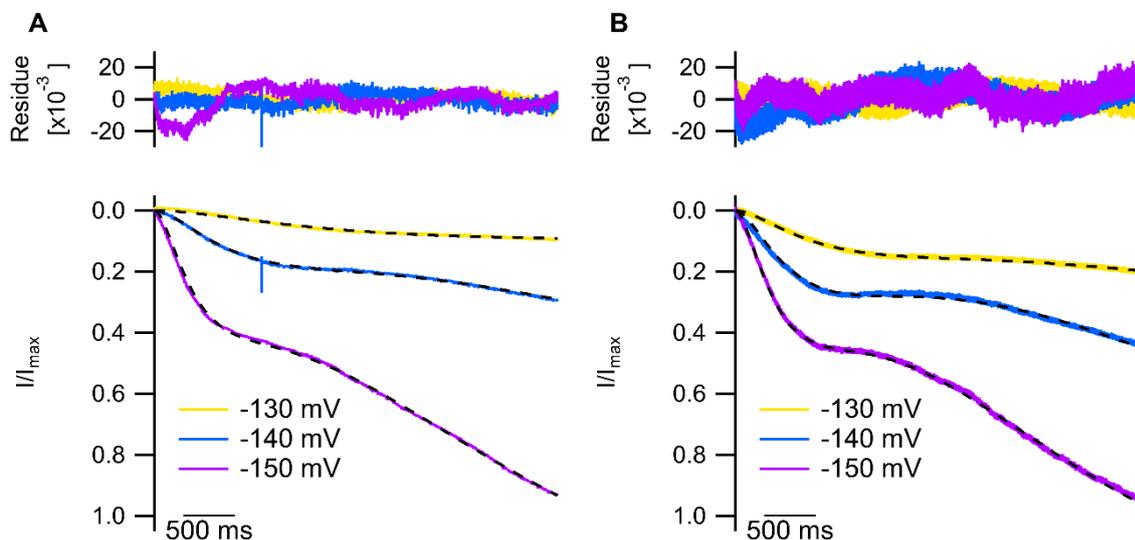


Abbildung 41: Repräsentative Stromkurven (farbig) und Modellierung (schwarz) sowie Fit-Differenz (oben) der Mutanten G402S (A) und G404S (B).

Da zuvor die Gesamtströme auf das Ende der stärksten Aktivierung normiert worden waren und das Verhältnis der beiden Stromkomponenten zwischen den ausgewerteten Oozyten breit streute, war es nicht möglich, die komponentenspezifischen Amplituden A und B vergleichend auszuwerten. Der Anteil des HCN-artigen Stroms wurde über Gleichung (18) bestimmt und die für jede Messung erhaltenen Quotienten gemittelt.

5.7 Charakterisierung der Mutanten HCN2-G402S und -G404S

$$F_{HCN} = \frac{\frac{A}{C}}{B + \frac{A}{C}} \quad (18)$$

Bei beiden Mutanten wurden erwartungsgemäß alle kinetischen Parameter mit zunehmender Hyperpolarisation schneller (Abbildung 42 A-B). Im Vergleich zum HCN2*wt*-Kanal öffnen beide Mutanten bei gleichen Kooperativitätskoeffizienten etwas langsamer und deutlich spannungsabhängiger (vgl. Abbildung 12). Das Maß der Inaktivierung lag bei etwa 75 bis 90 %, der Anteil des HCN-artigen Stroms ging von über 65 % bei -130 mV deutlich zurück (Abbildung 42 C), da erst bei stärkerer Hyperpolarisation die Aktivierung der mutmaßlichen endogenen Ströme beginnt. Bei den Zeitkonstanten τ_3 und den Kooperativitätskoeffizienten H_2 , die beide die langsame Aktivierung der endogenen Ströme beschreiben, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 42 D). Dies deutet darauf hin, dass diese Stromkomponenten von der konkreten Mutante unabhängig sind.

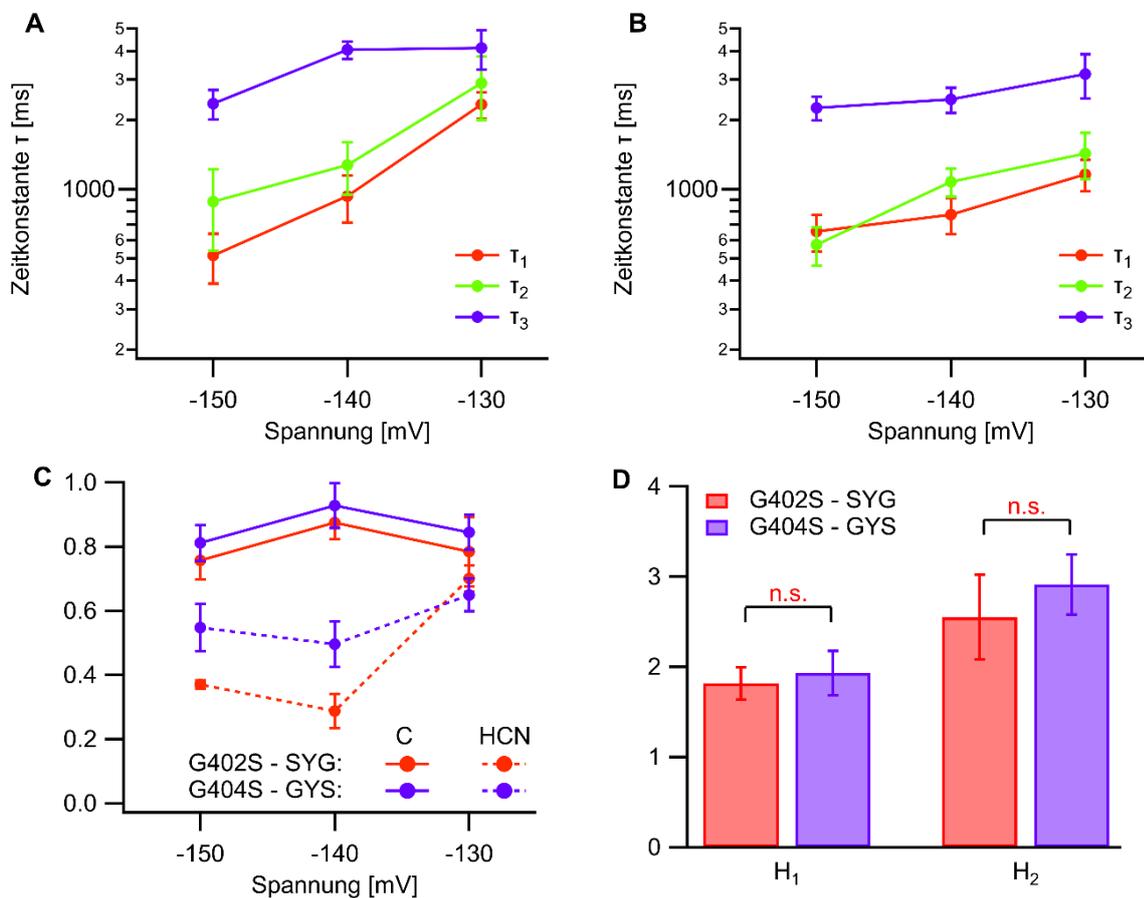


Abbildung 42: Parameter der globalen Modellierung. **A, B:** Zeitkonstanten für die Mutanten G402S (A) bzw. G404S (B). **C:** Maß der Inaktivierung (durchgezogen) bzw. Anteil des HCN-artigen Stroms (gepunktet). **D:** Kooperativitätskoeffizienten H_1 und H_2 .

Aufgrund der schnelleren Inaktivierung sowie des höheren Anteils des mutmaßlich HCN-artigen Stroms bei der Mutante G404S können die beiden Komponenten hier besser voneinander abgegrenzt werden als bei der Mutante G402S. Außerdem kann durch die stärkere Inaktivierung der Mutante G404S die relativ erhöhte Leitfähigkeit im Tailbereich erklärt

5.7 Charakterisierung der Mutanten HCN2-G402S und -G404S

werden (Abbildung 35), da diese aus dem Verhältnis des Stroms während der Reaktivierung im Tailbereich und während hyperpolarisierender Spannungen bestimmt wird. Der größere Einfluss der Prä-Aktivierungsdauer (Abbildung 28, Abbildung 34) auf die Kinetik und die Amplitude des Ionenstroms kann auf den bei der Mutante G402S größeren Anteil der mutmaßlich endogenen, langsam öffnenden und schließenden Ströme zurückgeführt werden.

5.7.7 Einfluss der Dauer des Haltepotentials

Bei der Untersuchung der beiden Mutanten fiel außerdem auf, dass sich bei einer Folge von Aktivierungs-Pulsen die Sichtbarkeit der HCN-artigen Stromanteile verringerte, wenn der Kanal erst kurz zuvor aktiviert worden war. Bei einem langen Haltepotential zwischen zwei Aktivierungs-Pulsen war dagegen eine deutliche Abgrenzung der beiden Komponenten sichtbar (Abbildung 43 A). Außerdem stieg bei kurzer Wartezeit der Instantanstrom an, was möglicherweise auf die bereits in Kapitel 5.7.1 beschriebene nicht-vollständige Schließung oder auf einen davon nicht zu unterscheidenden Leckstrom zurückzuführen ist.

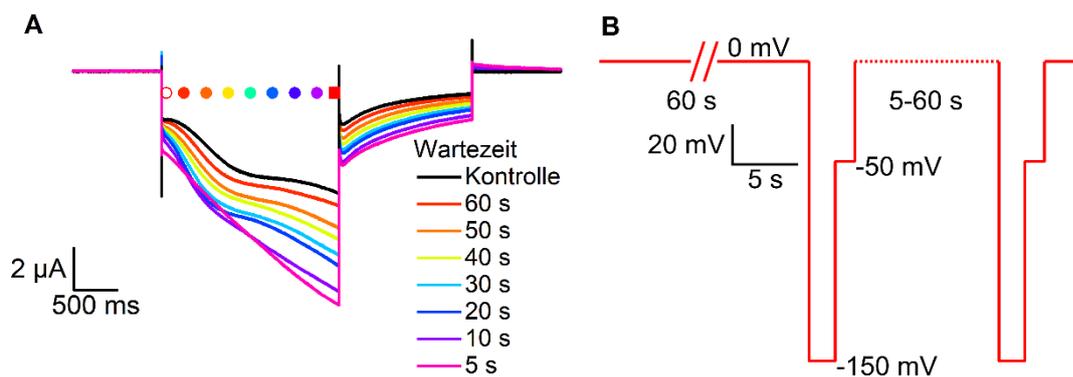


Abbildung 43: **A:** G402S: Strom nach verschiedenen langen Wartezeiten (gefüllte Kreise, Farben entsprechend Abbildung 44), jeweils getrennt durch einen Puls nach 60 s Wartezeit (in schwarz 1. Ausgangskurve). Offener Kreis: Strom nach 50 ms; gefülltes Quadrat: Strom nach 2.000 ms. Aktivierung bei -150 mV. **B:** Puls-Protokoll.

Der Einfluss der Dauer des Haltepotentials soll quantitativ mittels Gleichung (19) beschrieben werden:

$$I_t(i)_{norm.} = \frac{I_t(i) - I_{50}(i)}{I_{2.000}(i) - I_{50}(i)} \quad (19)$$

Dafür wurde ein Protokoll aus mehreren Doppelpulsen, die mit einer variablen Wartezeit i zwischen 5 und 60 s aufgenommen wurden, verwendet. Zwischen den Doppelpulsen wurde jeweils eine Wartezeit von 60 s eingelegt (Abbildung 43 B), um so weit wie möglich wieder zu einem Ausgangszustand zurückzukehren. Nach Subtraktion des Initial-Stroms bei 50 ms (offener Kreis) wurde gemäß Gleichung (19) der Strom bei einem Zeitpunkt t (250 bis 1.750 ms; gefüllte Kreise) auf den Strom nach 2.000 ms (gefülltes Quadrat) normiert.

5.7 Charakterisierung der Mutanten HCN2-G402S und -G404S

Dabei zeigte sich für beide Mutanten, dass insbesondere der relative Strom bei frühen Aktivierungszeitpunkten (250 bis 750 ms) bis zu seinem Maximum bei einem Haltepotential von 20 s schnell anstieg und danach wieder leicht abnahm (Abbildung 44).

Um zu quantifizieren, ob dieser Effekt auf eine Verschiebung der Anteile der HCN-artigen und endogenen Stromkomponenten zurückzuführen ist, wurden die Ströme mithilfe der bereits für die Aktivierungsströme verwendeten Gleichung (17) global modelliert, wobei lediglich die Amplituden der beiden Aktivierungs-Komponenten – ausgedrückt durch die Parameter A und B – als wartezeitabhängig angenommen, aber alle anderen Parameter fixiert wurden.

Der Anteil des HCN-artigen Stroms F_{HCN} wurde dann gemäß Gleichung (18) bestimmt und stieg ebenfalls mit zunehmender Wartezeit an (Abbildung 44). Das für den globalen Fit der Aktivierungsströme verwendete Modell kann somit auch die Abhängigkeit der empirisch gemessenen Stromverhältnisse von der Dauer des Haltepotentials gut darstellen.

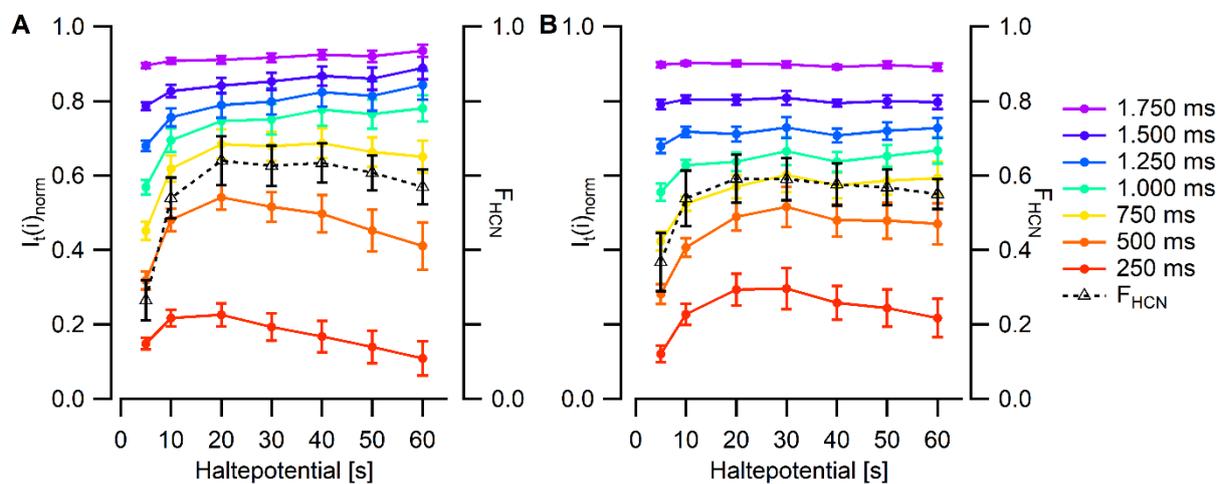


Abbildung 44: Einfluss der Dauer des Haltepotentials für die Mutanten G402S (A; $n=9$) bzw. G404S (B; $n=5$). Farbige: Empirisches Verhältnis der Ströme bei verschiedenen Aktivierungszeitpunkten gemäß Gleichung (19). Schwarz: Modellierter Anteil des HCN-artigen Stroms F_{HCN} gemäß Gleichung (18) in Abhängigkeit von der Wartezeit zwischen zwei Aktivierungspulsen nach einer Aktivierung bei -150 mV.

Insbesondere bei den frühen Aktivierungszeitpunkten fällt der parallele Verlauf der empirisch bestimmten Stromverhältnisse und des F_{HCN} auf. Dieser lässt sich wahrscheinlich darauf zurückführen, dass bei etwa 750 ms – nach der initialen Aktivierung – die Inaktivierung der mutmaßlich HCN-artigen Ströme einsetzt, die mutmaßlich endogenen Kanäle aufgrund der langsamen Kinetik (Abbildung 42 A, B) aber noch nur wenig geöffnet sind.

Bei sehr langer Wartezeit nahm der F_{HCN} – wie auch die empirisch bestimmten Stromverhältnisse – wieder leicht ab. Die Plateau-Phase nach Haltepotentialen von 20 bis 30 s könnte sich dadurch erklären lassen, dass nach dieser Zeit die endogenen Kanäle soweit geschlossen sind, dass eine deutliche HCN-Kinetik zu erkennen ist (Abbildung 43 A), diese Öffnung der mutierten HCN-Kanäle aber einfacher abläuft als nach längeren Haltepotentialen.

5.7.8 Expressionsbestimmung durch fluoreszenz-markierte Antikörper

Um nachzuweisen, dass die hier gezeigten Ionenströme aus der Oberflächen-Expression der Mutanten G402S und G404S und nicht aus endogenen Quellen stammen, wurde durch den molekularbiologischen Einbau von HA-Markierungen zwischen der S3- und der S4-Helix ein Epitop geschaffen, an das fluoreszenz-markierte Anti-HA-Antikörper binden können (Hardel et al., 2008). Durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie wurden sowohl für die beiden Mutanten G402S-HA und G404S-HA als auch für den HCN2*wt*-HA und die Mutante Y403A-HA die Membranlokalisation nachgewiesen (Abbildung 45 A-D). Negativkontrollen zeigten erwartungsgemäß nur eine unspezifische und daher vernachlässigbare Bindung (Abbildung 45 E-H).

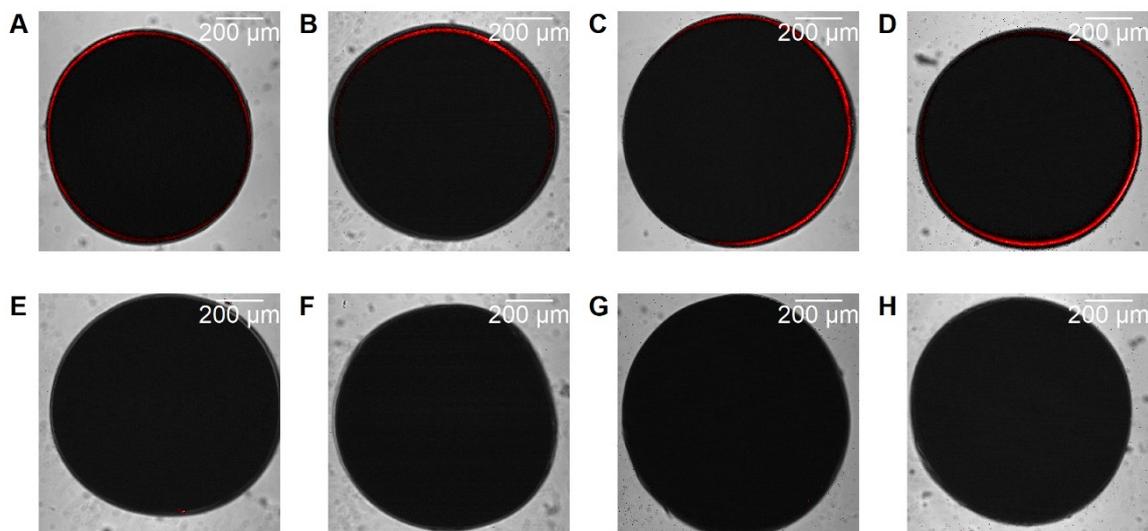


Abbildung 45: LSM-Messungen mit fluoreszenz-markierten Antikörpern. **A:** G402S-HA. **B:** Y403A-HA. **C:** G404S-HA. **D:** HCN2*wt*-HA. **E:** G402S. **F:** Y403A. **G:** G404S. **H:** HCN2*wt*. Alle Bilder wurden mit identischen Einstellungen aufgenommen (siehe Kapitel 4.4).

Um zu zeigen, dass der Ionenstrom aus den erfolgreich exprimierten Membranproteinen resultiert und keine Kombination aus endogenen, nicht fluoreszenz-markierten Chlorid-Kanälen und exogenen, fluoreszenz-markierten, nichtleitenden HCN-Mutanten vorliegt, wurde die Stromstärke mit der Lichtausbeute des Fluoreszenz-Signals in Beziehung gesetzt.

Dazu wurden die Oozyten zuerst am LSM vermessen und anschließend für dieselben Oozyten Spannungsfamilien im Bereich von -120 bis -150 mV aufgenommen (Abbildung 46). Die Stromkurven der Mutanten wurden nach Gleichung (17) modelliert, wobei der Fit-Parameter A die Strom-Amplitude der mutmaßlichen HCN-artigen Ströme beschreibt. Die Parameter B , τ_3 und H_2 wurden nur bei einer deutlich sichtbaren späten Aktivierungskomponente verwendet.

5.7 Charakterisierung der Mutanten HCN2-G402S und -G404S

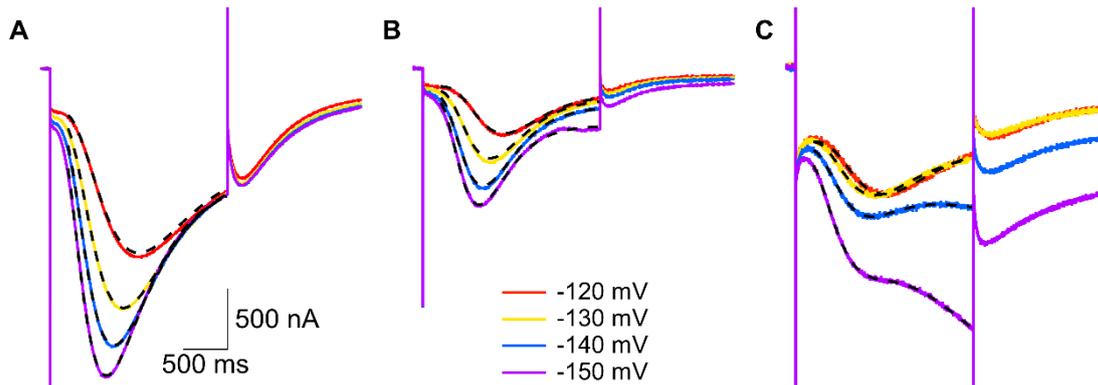


Abbildung 46: Repräsentative Stromkurven (farbig) der Mutanten G402S-HA (A), Y403A-HA (B) und G404S-HA (C) sowie Modellierung der Aktivierung (schwarz).

Dabei zeigte sich für die drei Mutanten eine gewisse Korrelation zwischen modellierter Stromstärke und Fluoreszenz (Abbildung 47 A-C), während für den sicher beschriebenen HCN2wt-HA kaum Korrelation festgestellt werden konnte (Abbildung 47 D). Daher ist diese Methode nur bedingt geeignet, Aussagen über den genauen Zusammenhang von Expression und Strom zu treffen. Die These, die exprimierten mutierten HCN-Kanäle seien für den gemessenen Strom ursächlich, lässt sich aber auch nicht widerlegen.

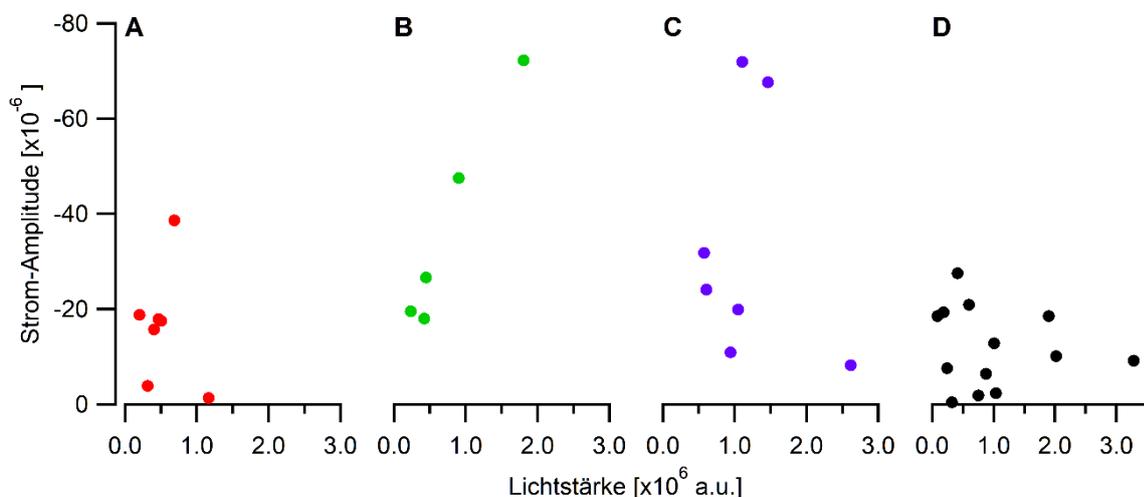


Abbildung 47: Beziehung zwischen modellierter Strom-Amplitude A (bei -140 mV) und Fluoreszenz. A: G402S-HA. B: Y403A-HA. C: G404S-HA. D: HCN2wt-HA (Modellierung gemäß Gleichung (3)).

Die aus der Modellierung gewonnenen Zeitkonstanten der HA-markierten Mutanten sind sowohl für die Aktivierung (τ_1 , Abbildung 48 A) als auch für die Inaktivierung (τ_2 , Abbildung 48 B) niedriger als bei den nicht HA-markierten (vgl. Kapitel 5.7.6). Die Spannungsabhängigkeit der Kinetik war dabei aber wesentlich schwächer ausgeprägt als ohne HA-Epitop. Die Inaktivierung lief mit zunehmender Aktivierungsspannung sogar langsamer ab, erreicht dabei aber eine Stärke von nahezu 100 % (Abbildung 48 C) und ist damit stärker als ohne HA-Markierung (vgl. Abbildung 42 D).

5.7 Charakterisierung der Mutanten HCN2-G402S und -G404S

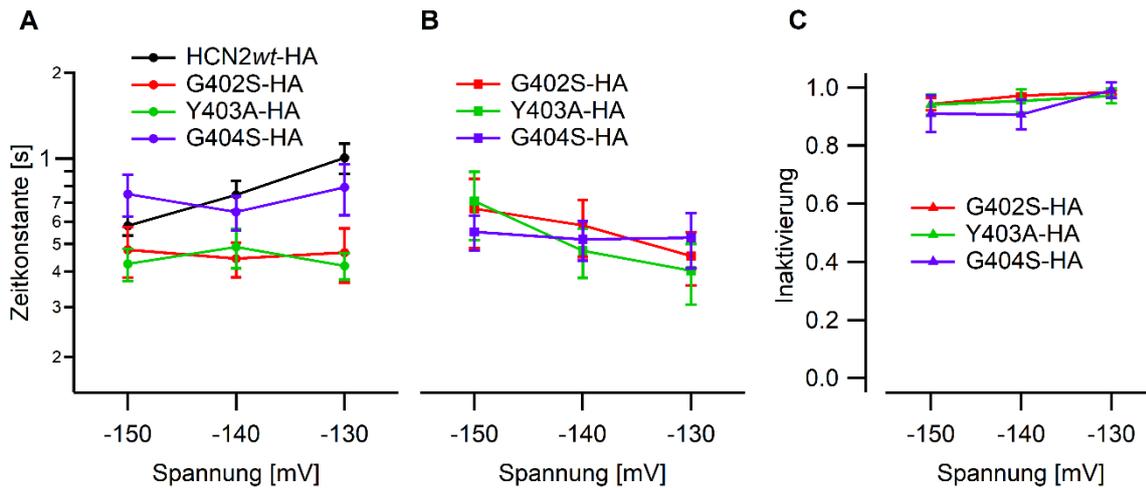


Abbildung 48: Zeitkonstanten τ_1 (A) und τ_2 (B) für die HA-markierten Kanäle. Daten sind Mittelwerte \pm s.e.m. aus 5 bis 13 Messungen. C: Inaktivierungsmaß C der HA-markierten Kanäle.

Im Gegensatz dazu öffnete der HCN2wt-Kanal mit HA-Markierung signifikant langsamer (Abbildung 48 A), erst bei etwa 25 mV stärkerer Hyperpolarisation (Abbildung 49; Wemhöner et al., 2012) und mit einer höheren effektiven Gating-Ladung als ohne HA-Markierung (vgl. Kapitel 5.1). Diese Unterschiede lassen sich wahrscheinlich durch die Nähe der Einbauposition zur S4-Helix erklären (Priest et al., 2013), weshalb der HA-markierte Kanal für genaue funktionelle Charakterisierungen nicht geeignet ist. Zum Nachweis der Membranlokalisation und Vergleich mit den Mutanten reicht die grobe Funktionalität jedoch aus.

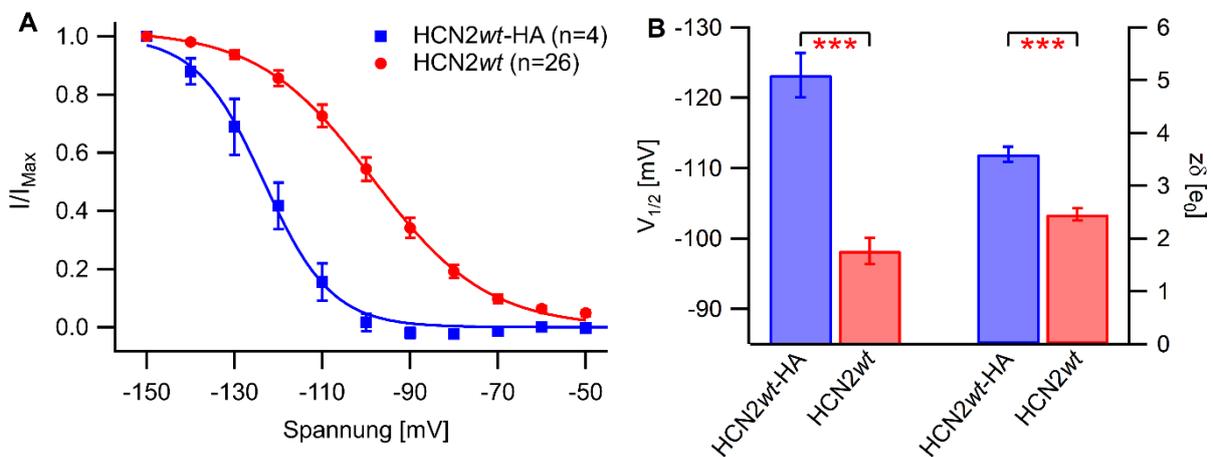


Abbildung 49: I/V-Kurven (A) und $V_{1/2}$ sowie effektive Gating-Ladung (B) von HCN2wt und HCN2wt-HA.

Bei den elektrophysiologischen Messungen der HA-markierten Mutanten wurde eine große Streuung der Anteile der mutmaßlich verschiedenen Strom-Komponenten beobachtet. Einerseits zeigte sich in den Stromkurven das oben bereits beschriebene Verhalten, das sich aus der HCN-artigen Aktivierung und Inaktivierung und der späten Aktivierung der mutmaßlich endogenen Chlorid-Kanäle zusammensetzt. Andererseits fielen teilweise Oozyten aus den gleichen Chargen durch ihre Stromkurven auf, die nur eine Kombination aus Aktivierung und Inaktivierung aufwiesen und keine späte Aktivierungs-Komponente zeigten (Abbildung 50).

5.7 Charakterisierung der Mutanten HCN2-G402S und -G404S

Dennoch war es möglich, Stromkurven von je drei Oozyten, die aus derselben Charge stammten und identisch behandelt wurden, deren Stromkomponenten aber trotzdem offensichtlich unterschiedlich stark ausgeprägt sind, analog zur obigen globalen Modellierung mittels Gleichung (17) global zu beschreiben (Abbildung 50). Dabei war nur das Verhältnis der HCN-artigen und endogenen Stromkomponenten variabel, alle anderen Parameter wurden fixiert. Somit ist dieses Phänomen oozytenspezifisch und nicht systematisch von Charge oder Quelle der vermessenen Oozyten abhängig.

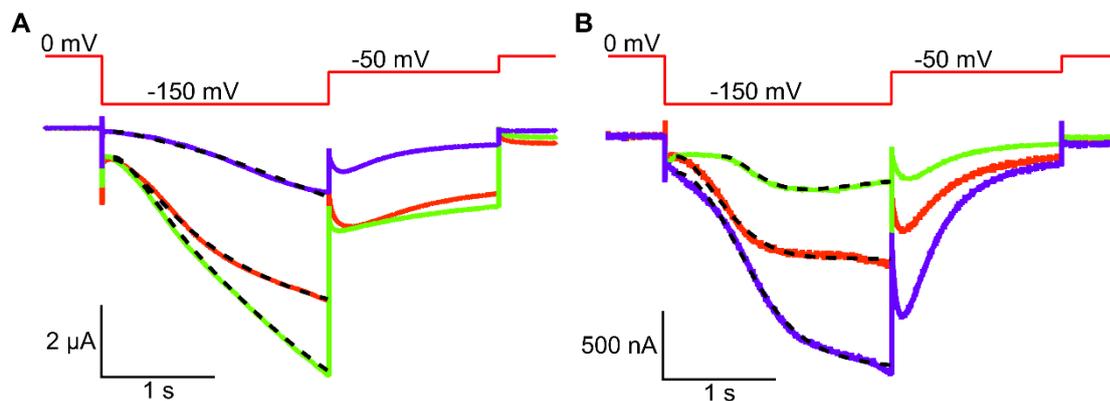


Abbildung 50: Repräsentative Stromkurven der Mutanten G402S-HA (A) und Y403A-HA (B) nach einer Aktivierung bei -150 mV.

Die Stromkurven ohne offensichtliche endogene Stromkomponente wurden anschließend in Hinblick auf die Leitfähigkeit genauer untersucht. Überraschenderweise stieg die maximale Leitfähigkeit sowohl während der Aktivierung als auch während der Tailstrom-Phase für einzelne Oozyten nicht entsprechend der angelegten Spannung, sondern nahm in Einzelfällen von -120 mV zu -140 mV ab und erst danach wieder zu (Abbildung 51 A). Die analog zu Kapitel 5.7.3 bestimmte relative Leitfähigkeit während der Reaktivierung im Tailstrom-Bereich war bei diesen Messungen ohne Überlagerung durch endogene Chlorid-Kanäle sogar noch deutlicher erhöht (Abbildung 51 B).

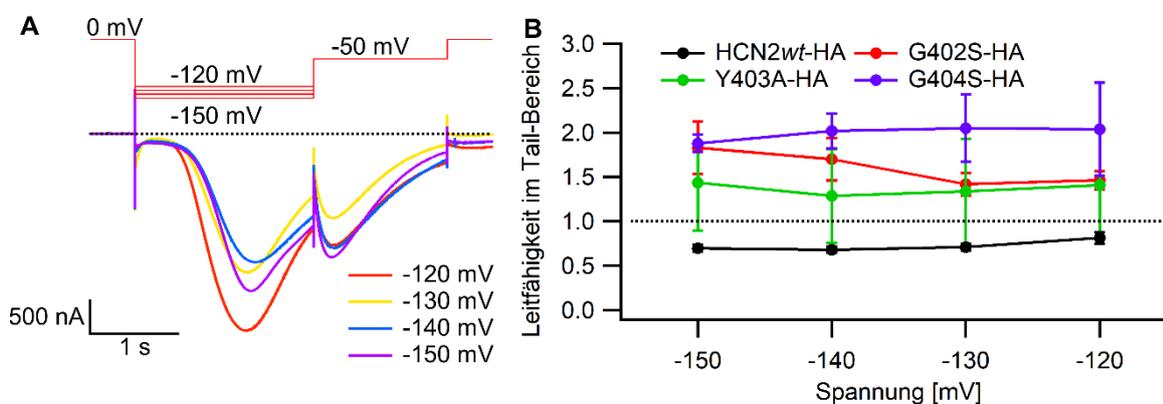


Abbildung 51: A: Repräsentative Stromkurven des G402S-HA-Kanals mit Aktivierung und Inaktivierung sowie Reaktivierung im Tailstrom, aber ohne dritte Komponente während der Aktivierung. B: Normierte Leitfähigkeit im Tail-Bereich.

5.7 Charakterisierung der Mutanten HCN2-G402S und -G404S

Insgesamt deuten diese Untersuchungen zur Leitfähigkeit stark darauf hin, dass es bei diesen Zellen möglich war, den reinen – aus Aktivierung und Inaktivierung bestehenden – HCN-artigen Strom der Mutanten G402S und G404S ohne Kontamination durch endogene Kanäle zu messen. Dafür spricht außerdem, dass der Verlauf des Stroms in Abbildung 51 A dem ähnelt, was in Abbildung 39 (Kapitel 5.7.5) durch die Applikation von Cs^+ blockiert wird bzw. nach GdLaBa-Block übrigbleibt, wodurch die HCN-artige Komponente ermittelt wurde.

Durch die Kombination aus Expressionsuntersuchung mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper sowie Strom-Charakterisierung durch elektrophysiologische Untersuchungen konnte die Oberflächen-Expression der mutierten HCN-Kanäle belegt werden. Die Korrelation zwischen Lichtintensität und Stromstärke war dabei nur mäßig ausgeprägt, da unter anderem der Anteil der Oberfläche, der bei einem konfokalen Schnitt betrachtet wird, vom Durchmesser der Oozyte abhängt. Somit ist diese Methode als Maß der Expression eines Ionenkanals weniger gut geeignet als z. B. ein quantitatives ELISA-Assay, jedoch ausreichend, um die Membranlokalisation der mutierten Kanäle zu belegen.

6. Diskussion

6.1 Bestimmung von makroskopischen Gating-Parametern

Bei vielen rhythmisch ablaufenden physiologischen Prozessen spielen durch HCN-Kanäle hervorgerufene Schrittmacherströme eine entscheidende Rolle. Das native Verhalten des in dieser Arbeit untersuchten *mHCN2wt*-Kanals wurde in der Literatur bereits häufig mithilfe der Patch-Clamp- oder der TEVC-Technik beschrieben, wobei eine Messung von Gating-Strömen bisher nicht möglich war. Daher sollte in dieser Arbeit versucht werden, den HCN2wt-Kanal mithilfe der Cut-Open-Technik zu charakterisieren und Gating-Ströme zu messen, um das Schaltverhalten des Kanals genauer zu analysieren. Zur Validierung dieser Methode wurden die makroskopischen Gating-Parameter zusätzlich mit der Patch-Clamp-Technik bestimmt.

Dabei zeigten sich im Vergleich zur Applikation sättigender cAMP-Konzentration am exzidierten Patch bei der $V_{1/2}$ und der Aktivierungskinetik nur geringe Abweichungen zwischen den beiden Messmethoden, wobei die Aktivierungskinetik stets spannungsabhängig war (Abbildung 10–12). Der cAMP-freie HCN-Kanal zeigte erwartungsgemäß eine erschwerte Aktivierung.

Die Deaktivierung verlief bei Patch-Clamp- entsprechend deutlich schneller als bei Cut-Open-Messungen (Abbildung 12 B). Der Einfluss der cAMP-Konzentration war dabei überraschend gering und ist daher für die unter Cut-Open-Bedingungen deutlich langsamere Deaktivierung nicht allein verantwortlich. Die Deaktivierungskinetik war dabei unabhängig von der vorhergehenden Aktivierungsspannung. Am Cut-Open-Setup konnte jedoch die bereits von Hummert et al. (2018) unter Patch-Clamp-Bedingungen beschriebene Abhängigkeit von der deaktivierenden Tailspannung gezeigt werden (Abbildung 13).

Auch bei der Bestimmung der effektiven Gating-Ladung aus dem Boltzmann-Fit der I/V -Kurven zeigten sich große Unterschiede zwischen Ganzzell- und Patch-Clamp-Messungen (Tabelle 6). Ein Einfluss von cAMP war dabei im Gegensatz zu bisherigen Hidden-Markov-Modellierungen (Hummert et al., 2018) nicht zu beobachten (Abbildung 11 B), was aber unter Umständen auf die dort angesprochenen Schwächen einer Ermittlung der Gating-Ladung aus Boltzmann-Modellierungen zurückzuführen sein kann.

Bei Cut-Open-Messungen konnte zusätzlich mithilfe der „initial-slope“-Methode (Noceti et al., 1996) eine vergleichbar große effektive Gating-Ladung ermittelt werden (Abbildung 16 B). Mit zunehmender Rampendauer näherte sich der Wert dabei der aus Steady-State-Messungen ermittelten Gating-Ladung an, bei noch längeren Messungen wäre damit eine Kohärenz der beiden Methoden zu erwarten.

Tabelle 6: Möglichkeiten zur Bestimmung der effektiven Gating-Ladung des HCN2wt-Kanals unter verschiedenen Messbedingungen. In der Arbeit von Hummert et al. (2018) wurden neben dem Boltzmann-Fit der I/V-Kurve (*) auch globale „Hidden-Markov“-Modellierungen (**) verwendet.

Setup	I/V-Kurve		Initial-slope
Cut-Open	2,5		2,0 – 2,4
	(Kapitel 5.2.1)		(Kapitel 5.2.2)
TEVC	3,6		—
	(Kapitel 5.2.1)		
	1,8		—
(Magee et al., 2015)			
Patch-Clamp	+ cAMP	– cAMP	—
	7,3	6,7	—
	(Kapitel 5.2.1)		—
	4,9* bzw. 5,1**; 4,8	5,1* bzw. 8,1**; 4,6	—
	(Hummert et al., 2018; Alvarez-Baron et al., 2018)		

Insgesamt zeigt sich, dass die am Cut-Open-Setup gewonnenen Daten den HCN2wt-Kanal ebenfalls qualitativ gut beschreiben. Die Unterschiede zu Patch-Clamp-Messungen lassen sich aber insbesondere bei der Deaktivierungskinetik und der effektiven Gating-Ladung nicht allein auf die cAMP-Konzentration zurückführen. Vielmehr können auch PI(4,5)P₂ (Zolles et al., 2006) oder andere bisher nicht identifizierte, intrazelluläre Modulatoren eine Rolle spielen, die während der 3,5-minütigen Wartezeit nach Exzision des Patches, um den „Rounddown“ abzuwarten (Hummert et al., 2018), entfernt werden, in nativen Oozyten jedoch stets – wenn auch in variabler Konzentration – vorhanden sind.

6.2 Messung von Gating-Strömen

6.2.1 Methoden zur Messung von Gating-Strömen

Die effektive Gating-Ladung, die aus der Boltzmann-Beschreibung von I/V-Kurven oder mit der „initial-slope“-Methode bestimmt werden kann, liefert einen ersten Anhaltspunkt bei der Charakterisierung eines Ionenkanals und beschreibt den Anteil, der notwendig ist, um die Öffnung bzw. das Schließen des Kanals zu initiieren (Sigg und Bezanilla, 1997). Die reale Gating-Ladung, die bei der Bewegung der S4-Helices durch die Membran und damit durch das elektrische Feld verschoben wird, kann jedoch insbesondere bei mehrstufigen Gating-Prozessen deutlich größer sein und nicht mehr mit der Boltzmann-Beschreibung erfasst werden, da diese nur bei Zwei-Zustands-Systemen und Erreichen eines Gleichgewichtszustandes exakt ist.

Für die Bestimmung der gesamten Gating-Ladung müssen die die Aktivierung initial begleitenden Gating-Ströme gemessen werden. Das Integral dieser Ströme beschreibt die

Gating-Ladung einer ganzen Oozyte und wird daher noch in Bezug auf die Anzahl der exprimierten Ionenkanäle gesetzt, um die reale Gating-Ladung pro Kanal zu erhalten. Dabei ist aufgrund der verhältnismäßig geringen Zahl an Ionenkanälen pro Patch eine Ganzzell-Messung notwendig.

Daher wurde in dieser Arbeit versucht, die Gating-Ströme am Cut-Open-Setup zu messen. Dazu wurde mithilfe verschiedener Ansätze am intakten HCN2wt-Kanal versucht, den Ionenstrom komplett zu eliminieren, sodass nur noch der Gating-Strom sichtbar sein sollte. Mithilfe externer Blocker wie Cs⁺ oder NMDG konnte der Ionenstrom zwar auf etwa 1 bis 2 % des Ausgangstroms reduziert werden (Abbildung 18–19), für die Messung von Gating-Strömen reichten diese Bedingungen allerdings nicht aus (vgl. Simulation von Gating-Strömen in Abbildung 17). Die Anwendung des organischen Blockers ZD7288 war ebenfalls nicht erfolgreich.

Durch Messungen nahe dem Umkehrpotential wurden dagegen Ströme gemessen, die konsistent zu den Erwartungen an HCN-Gating-Ströme waren (Kapitel 5.5). Die aus dem Integral dieser potentiellen Gating-Ströme erhaltene Gating-Ladung lag bei maximal $10 \pm 6 e_0$ (Abbildung 23 B).

Da für diese anspruchsvollen Messungen eine sehr hohe Expression nötig ist, die nur sehr selten erreicht wurde, und das Signal-Rausch-Verhältnis trotzdem relativ niedrig war, konnte keine zuverlässige statistische Auswertung durchgeführt werden. Aufgrund der unter TEVC-Bedingungen deutlich größeren kapazitiven Ströme konnten diese Ströme außerdem nur mit der hier angewandten Cut-Open-Methode gemessen werden.

Tabelle 7: Möglichkeiten zur Bestimmung der effektiven oder realen Gating-Ladung pro tetramerem Kanal. Wenn nicht anders angegeben, wurde diese am Cut-Open-Setup bestimmt.

Kanal	effektiv			real
	I/V-Kurve	Initial-slope	Q/V-Kurve	Abs. Ladung Q
HCN2	2,5	2,0 – 2,4	1,6	10 ± 6
	(Kapitel 5.2.1)	(Kapitel 5.2.2)	(Kapitel 5.5)	(Kapitel 5.5)
spHCN	2,2	—	1,2 – 1,9	—
	(Shin et al., 2004) – Patch		(Männikkö et al., 2002); (Ryu und Yellen, 2012) – Patch	
Shaker	3,2	12,8	2,5	13,6
	(Yifrach und MacKinnon, 2002) – TEVC	(Noceti et al., 1996)	(Perozo et al., 1993)	(Noceti et al., 1996)
Ca _v	—	7 – 9	—	9 – 15
		(Noceti et al., 1996)		(Noceti et al., 1996)

Aus der Steigung der Q/V-Kurve wurde anschließend eine effektive Gating-Ladung von $1,6 e_0$ erhalten. Auch für den spHCN-Kanal wurde durch den Boltzmann-Fit der durch Cut-Open-Messungen erhaltenen Q/V-Kurve eine effektive Gating-Ladung bestimmt, die mit $1,9 \pm 0,1 e_0$

in diesem Größenbereich liegt (Männikkö et al., 2002). Durch Cystein-Einbau und Cd^{2+} -Bindung wurden am spHCN-Kanal Gating-Ströme im „Lock-open“- bzw. im „Lock-closed“-Zustand gemessen, deren Spannungsabhängigkeit durch Boltzmann-Fits mit effektiven Gating-Ladungen im Bereich von 1,2 bis 1,6 e_0 beschrieben werden konnten (Ryu und Yellen, 2012). Ebenso liegt die analog für den Shaker-W434F-Kanal bestimmte effektive Gating-Ladung nur bei Werten um 2,5 e_0 (Perozo et al., 1993), während die kanalspezifische Gating-Ladung, die aus dem Verhältnis der gesamten Gating-Ladung und der durch Rauschanalyse ermittelten Zahl an Kanälen bestimmt wurde, mit etwa 10 bis 12 e_0 deutlich höher liegt (Noceti et al., 1996).

Die in dieser Arbeit erhaltenen Werte bestätigen damit die zuvor in der Literatur publizierten Gating-Ladungen sowohl für die effektive als auch die reale Gating-Ladung an strukturanalogen Kanälen (Tabelle 7).

6.2.2 Kinetik der Gating-Ströme

Die durch Messungen nahe dem Umkehrpotential erhaltenen potentiellen Deaktivierungs-Gating-Ströme verliefen mit Zeitkonstanten von 3 bis 4 ms (Abbildung 22, Abbildung 23 A) und hatten eine Amplitude von maximal etwa 1 % des Ionenstroms, weshalb sie unter Block durch Cs^+ oder NMDG nicht detektiert werden konnten.

Im Gegensatz zu diesen Gating-Strömen wurden von Hummert et al. (2018) durch die Modellierung von Patch-Clamp-Messungen Gating-Ströme simuliert, die während der Deaktivierung aus einer Kombination einer sehr schnellen (im Bereich von unter 1 ms) und einer langsameren (im Bereich von 30 ms) Komponente bestanden. Unter Cut-Open-Bedingungen könnte eine entsprechend langsame Komponente trotz des besseren Signal-Rausch-Verhältnisses nicht detektiert werden, während die schnelle Komponente – aufgrund des hohen Einflusses von cAMP und der daraus resultierenden Variabilität bei nicht exakter Kontrolle der intrazellulären cAMP-Konzentration – nicht von den theoretisch linear verlaufenden kapazitiven Spitzen zu unterscheiden wäre.

Aufgrund der bereits beschriebenen Unterschiede zwischen Patch-Clamp- und Cut-Open-Messungen sowie den negativeren Depolarisationsspannungen, unter denen die Tailströme gemessen bzw. Gating-Ströme simuliert wurden (Hummert et al., 2018), ist die Übertragbarkeit der simulierten Gating-Ströme jedoch nicht unbedingt gegeben.

Im Vergleich zu den Ionenströmen, deren Zeitkonstanten um den Faktor 100 langsamer waren (Abbildung 12 A-B), und den Gating- bzw. Ionenströmen strukturanaloger Kanäle (Tabelle 4) ist die Kinetik der Gating-Ströme sehr schnell, wobei der kürzlich publizierte HCNL1-Kanal ein vergleichbares Verhältnis von Gating- und Ionenstrom zeigt (Wobig et al., 2020; Wolfenstetter, 2020). Auch aus der in einer Cd-stabilisierten Kryo-EM-Struktur des *hHCN1 wt*-Kanals (Lee

und MacKinnon, 2019) sichtbaren Aktivierung der S4-Helix in einem metastabilen Zustand ohne Anzeichen einer Öffnung des Kanals lässt sich ableiten, dass der eigentlichen Öffnung des Kanals – für die letztlich die Bewegungen der S5- und S6-Helices geschwindigkeitsbestimmend sind – ein schnelles Gating als eigenständiger Schritt vorausgehen kann.

Alternativ zur elektrophysiologischen Messung als Gating-Strom konnte die Bewegung der S4-Helix des spHCN-Kanals mithilfe der unnatürlichen Aminosäure Anap fluorometrisch gemessen werden (Dai et al., 2019), wobei eine zeitliche Differenzierung zwischen der Bewegung der S4-Helix und der Kanalöffnung aufgrund der niedrigen Frequenz der fluorometrischen Messung nicht möglich war.

Auch an einem weitgehend cysteinfreien R300C-mutierten und TMRM-markierten HCN2-Kanal (van Slyke et al., 2010) wurde mithilfe von VCF-Messungen die Bewegung der S4-Helix bei der Aktivierung und Deaktivierung beobachtet (Magee et al., 2017). Die Zeitkonstante des Fluoreszenz-Signals während der Deaktivierung lag dabei bei Sprüngen von -130 mV zu $+20$ mV bei 126 ms, während die gewichtete Zeitkonstante der Deaktivierung des Ionenstroms bei 612 ms lag. Das Fluoreszenz-Signal ist damit im Vergleich mit den in dieser Arbeit gemessenen Gating-Strömen überraschend langsam, geht dem Ionenstrom aber erwartungsgemäß immer noch voraus. Allerdings lag die dabei beobachtete $V_{1/2}$ mit -120 mV bei einer deutlich negativeren Spannung als die zuvor publizierten $-84,9$ mV (Magee et al., 2015) des nicht-fluoreszenz-markierten HCN2 wt -Kanals.

Vergleichbare Diskrepanzen finden sich zwischen in dieser Arbeit gemessenen HA-markiertem und wt -Kanal (Abbildung 49) sowie zwischen den für den spHCN wt - und den spHCN-R332C-Alexa-488-Kanal publizierten Halb-Maximal-Spannungen (Bruening-Wright et al., 2007). Außerdem verlaufen sowohl Strom als auch Fluoreszenz-Signal des TMRM-markierten HCN2-Kanals langsamer als der Ionenstrom des HCN2 wt -Kanals (Magee et al., 2015), weshalb die Schlussfolgerung naheliegt, dass die molekularbiologischen Modifikationen und die TMRM-Markierung einen zu großen Einfluss auf die Bewegung des Spannungssensors haben und auch die damit beobachtete langsame Bewegung der S4-Helix nicht repräsentativ für das Verhalten des wt -Kanals ist.

6.2.3 $V_{1/2}$ der Gating-Ströme

Die $V_{1/2}$ der während der Deaktivierung des HCN2 wt -Kanals gemessenen Gating-Ströme lag bei $-107,6 \pm 1,6$ mV (Abbildung 23). Dieser Wert wurde zwar bei der Deaktivierung gemessen, die identische Ladung muss aber zuvor bei der Aktivierung bewegt worden sein, womit die $V_{1/2}$ auch das Aktivierungs-Gating beschreibt. Im Vergleich dazu liegt die Halb-Maximal-Spannung des Ionenstroms aber bereits bei $-98,2 \pm 1,9$ mV (Abbildung 11), was einen scheinbaren

Widerspruch darstellt, da der Ionenstrom eine weniger negative Halb-Maximal-Spannung als der Gating-Prozess hat.

Vergleichbare Unterschiede zwischen den Halb-Maximal-Spannungen des Gating- und des Kanalöffnungs-Prozesses wurden aber auch bei VCF-Messungen beobachtet. So lag die $V_{1/2}$ der Fluoreszenz-Kurve eines S4-Anap-markierten spHCN-Kanals etwa 15 mV negativer als die der I/V -Kurve (Dai et al., 2019). Auch bei spHCN-Kanälen, die in der Nähe der Pore Cys-mutiert (Rothberg et al., 2003) und durch intrazelluläre Cd^{2+} -Applikation blockiert wurden, wurden für die Q/V -Kurve negativere Werte als bei der entsprechenden I/V -Kurve beobachtet (Ryu und Yellen, 2012). Bei einer Alexa-Dye-Markierung an der S4-Helix lag die $V_{1/2}$ der F/V -Kurve dagegen positiver als die der I/V -Kurve (Bruening-Wright et al., 2007).

Diese teils widersprüchlichen Ergebnisse können beispielsweise durch eine geringe Spannungsabhängigkeit der Gating- und Aktivierungsprozesse erklärt werden, wodurch beide Prozesse tendenziell unabhängig voneinander ablaufen (Ryu und Yellen, 2012). Dazu passen sowohl die – im Vergleich zu den strukturell ähnlichen Shaker- und Ca_v -Kanälen – geringere effektive Gating-Ladung von etwa $2,5 e_0$ als auch der deutliche kinetische Unterschied zwischen Off-Gating und Schließen des Kanals. Zusätzlich könnte auch die (Teil-)Bewegung von nur einer S4-Helix ausreichend sein, um die Öffnung zu initiieren, während der Großteil der Gating-Bewegung erst bei stärkerer Hyperpolarisation abläuft (Dai et al., 2019).

Die gesamte Gating-Ladung muss der Entwicklung des Ionenstroms über die Spannung demnach nicht unbedingt vorausgehen, oft kann sogar eine Teilbewegung der Gating-Ladungen nach der Öffnung beobachtet werden, wodurch der hier beobachtete scheinbare Widerspruch aufgelöst werden kann.

6.3 Modelle

Das Gating-Verhalten des HCN2wt-Kanals wurde in dieser Arbeit unter Nutzung von Hodgkin-Huxley-artigen Funktionen (Hodgkin und Huxley, 1952) beschrieben. Diese Darstellung lässt allerdings keine exakten Rückschlüsse auf das Gating-Verhalten zu, da insbesondere die sigmoiden Anfangsbereiche der Aktivierung so nur mäßig beschrieben werden können.

Alternativ zu dieser einfachen Hodgkin-Huxley-Formulierung wurden zur Beschreibung des Gatings der HCN-Kanäle in der Vergangenheit viele verschiedene Modelle publiziert. Das erste Modell, das nicht auf einer reinen Hodgkin-Huxley-artigen Beschreibung der Aktivierung mithilfe Gleichung (3) basierte, wurde 2001 von Altomare et al. vorgestellt. Dabei wurde ein 10-Zustands-Modell mit je 5 geschlossenen und offenen Zuständen angenommen, die sich in der Zahl der „aktivierten“ Spannungssensoren unterschieden. Zwischen den spannungsabhängigen Übergängen von C_0 bis C_4 wurden (auch aus technischen Gründen) konstante

Kooperativitäten angenommen, während die Öffnung des HCN-Kanals nach Aktivierung aller S4-Helices als spannungsunabhängig beschrieben wurde.

2005 wurde das 10-Zustand-Altomare-Modell von Männikkö et al. durch den sogenannten „Mode Shift“ erweitert, bei dem eine dort postulierte späte S4-Bewegung eine zweite Ebene von Zuständen hervorruft. Dadurch können vor allem Phänomene wie Hysterese und Präpuls-Abhängigkeit der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken besser beschrieben werden.

Im Gegensatz zu diesen beiden Modellen, die den Einfluss von cAMP nicht genauer untersuchten, wurde 2018 von Hummert et al. mit Hidden-Markov-Modellen ein Modell entwickelt, das das Gating des HCN2*wt*-Kanals mit lediglich 6 bzw. 7 Zuständen ohne bzw. mit cAMP beschreibt. Zusätzlich zu 3 offenen Zuständen (O_0 bis O_2) wurden 4 geschlossene Zustände definiert (C_0 - C_2), von denen einer (C_1^*) nur unter cAMP-Applikation zugänglich ist. Die beiden Teilschritte C_0 - C_1 und C_1 - C_2 lassen sich dabei nicht auf die Aktion einzelner Spannungssensoren zurückführen, sondern vielmehr auf zwei Teilschritte aller vier S4-Helices. Der erste Teilschritt ist dabei cAMP-unabhängig und eröffnet die Möglichkeit, den transienten C_1^* -Zustand zu besetzen. Die Bindung von cAMP und die daraus resultierende Rotation des Gating-Rings (Lee und MacKinnon, 2017) reduzieren dann die effektive Gating-Ladung des zweiten Teilschritts und verschieben sowohl kinetische Parameter als auch die $V_{1/2}$ der spannungsabhängigen Aktivierung.

Als Alternative zu diesen mit Stromdaten von Säuger-HCN-Kanälen entwickelten Modellen publizierten Bruening-Wright et al. 2007 eine Beschreibung des spHCN-Kanals. Dazu wurde mit aus VCF-Messungen erhaltenen Fluoreszenz- und Stromkurven ein Modell entwickelt, nach dem die nicht-kooperative, aber spannungsabhängige Bewegung von genau zwei S4-Helices ausreicht, um den Kanal anschließend (spannungsunabhängig) zu öffnen. Damit könnte auch durch diese Beschreibung die niedrige effektive Gating-Ladung des HCN2*wt*-Kanals unter Ganzzell-Bedingungen erklärt werden.

Durch diese ausführlichen Modelle können sowohl der spHCN- als auch die Säuger-HCN-Kanäle wesentlich detaillierter beschrieben werden als durch das in dieser Arbeit verwendete Hodgkin-Huxley-Modell. Zum Vergleich der verschiedenen elektrophysiologischen Messmethoden sowie der kinetischen Parameter des *wt*-Kanals und der Porenmutanten ist diese einfache modellhafte Beschreibung jedoch ausreichend und besser geeignet als z. B. die rein empirische Halb-Aktivierungszeit $t_{1/2}$ oder eine exponentielle Beschreibung der Aktivierung nach dem sigmoiden Anfangsbereich.

6.4 Mutationen am mutmaßlichen Selektivitätsfilter

Aufgrund der literaturbeschriebenen Mutationen in der Porenregion strukturell verwandter spannungsabhängiger Kationenkanäle, die zu konstant offenen bzw. geschlossenen Kanälen führten (Kubisch et al., 1999; So et al., 2001; Wimmers et al., 2001; Männikkö et al., 2002; Macri et al., 2002; Tomczak und Stühmer, 2015), wurde in dieser Arbeit versucht, durch Mutationen außerhalb des Selektivitätsfilters (A407Y, QAFY, Kapitel 5.6) bzw. direkt im Selektivitätsfilter (G402S, Y403A, Y403S, G404S, Kapitel 5.6 bis 5.7) HCN2-Mutanten zu erzeugen, die keinerlei Öffnen oder Schließen des Kanals, sondern nur die als Gating-Strom messbare Bewegung der S4-Helix zeigen sollten. Entgegen den Erwartungen wiesen dabei jedoch alle Mutanten verschiedene Ionenströme auf, was sich mit der nach der Durchführung der Experimente publizierten Kryo-EM-Struktur (Lee und MacKinnon, 2017) erklären lässt, die den gegenüber strukturanalogen Kationenkanälen anders orientierten Selektivitätsfilter zeigt (Abbildung 4), der verhindert, dass die Mutationen den Ionenstrom eliminieren können.

Das Auftreten eines Ionenstroms im Falle der Mutante G404S steht dabei im Widerspruch zu einer vorherigen Publikation, in der nur ein Instantan- bzw. Leckstrom, aber keine Aktivierung beschrieben wurde (Macri et al., 2002). Dies könnte allerdings auf das Expressionssystem zurückzuführen sein, da für die dort verwendeten CHO-Zellen kaum endogene Kanäle beschrieben wurden. Im Gegensatz dazu finden sich in den in dieser Arbeit verwendeten *Xenopus*-Oozyten verschiedenste endogene Kanäle (Weber, 1999a; Weber, 1999b; Kuruma et al., 2000), deren Expression die Membranlokalisierung der Porenmutanten unterstützen kann (Terhag et al., 2010).

Bei den beiden in dieser Arbeit genauer charakterisierten Porenmutanten G402S und G404S konnte während der Applikation hyperpolarisierender Spannungen eine Kombination aus Aktivierung, Inaktivierung und langsamer Aktivierung beobachtet werden, wobei keine Sättigung der *I/V*-Kurve festgestellt werden konnte (Abbildung 29 A). Ein vergleichbares Verhalten ohne sättigende *I/V*-Kurve wurde für Mutationen des der Pore direkt benachbarten LCI-Motivs publiziert (Hernandez et al., 2020). Die ersten beiden Komponenten ließen sich dabei auf die mutierten HCN-Kanäle zurückführen, während dem Auftreten der späten, langsamen Aktivierung endogene Chlorid-Kanäle zugrunde liegen. Durch HA-Markierung und Bindung an spezifische Antikörper konnte die Membranlokalisierung der mutierten HCN-Kanäle belegt werden (Abbildung 45).

Die Differenzierung der Komponenten erfolgte dabei z. B. durch die Applikation spezifischer Blocker-Lösungen. Die ersten beiden Komponenten wurden durch die Applikation von Cs⁺ blockiert und weisen damit HCN-artige Eigenschaften auf (Santoro et al., 1998), während die späte Aktivierung reversibel durch die Kombination aus Gd³⁺, La³⁺ und Ba²⁺ (Vemana et al.,

6.4 Mutationen am mutmaßlichen Selektivitätsfilter

2008) reduziert werden konnte (Abbildung 39), weshalb es sich hier um endogene Chlorid-Kanäle handeln sollte (Kuruma et al., 2000; Terhag et al., 2010).

Zusätzlich wurden bei langsamen Spannungsrampen zwei unterscheidbare Leitfähigkeiten beobachtet, wobei die erste analog zum HCN2*wt*-Kanal bei etwa -90 mV, die zweite aber erst bei etwa -125 mV auftrat (Abbildung 31). Dies stimmt mit den Beobachtungen aus Spannungsfamilien überein, die eine Aktivierung der endogenen Kanäle ebenfalls ab etwa -120 bis -130 mV belegten (Abbildung 27; Kowdley et al., 1994).

Außerdem zeigten die Tailströme eine starke Reaktivierung (Abbildung 34 C-D), d. h., dass vorher eine Inaktivierung stattgefunden haben muss und die späte Aktivierung durch eine unabhängige Leitfähigkeit hervorgerufen wird. Diese Reaktivierung der HCN-artigen Komponente ähnelt dabei strukturell den „resurgenten Strömen“, die unter speziellen Umständen bei den schnell inaktivierenden Na_v-Kanälen (Raman und Bean, 1997; Cannon und Bean, 2010; Lewis und Raman, 2014; Thull et al., 2020), aber auch bei Chimären aus dem HCN1- und dem K_v10.1-Kanal (Cowgill et al., 2018) beobachtet werden können.

Auch die Modellierung des Tailstroms in Kapitel 5.7.4 basiert auf der Annahme zweier unabhängiger Komponenten und besteht aus der Kombination eines HCN-artigen Stromanteils, der eine Reaktivierung und einen Teil der Deaktivierung beschreiben soll, und eines Stromanteils der endogenen Kanäle, durch den der restliche Anteil der Deaktivierung charakterisiert werden soll (Abbildung 36). Dabei wurde gezeigt, dass mit zunehmender Aktivierungsdauer der Anteil langsam öffnender endogener Kanäle steigt und dadurch die Deaktivierung stark verlangsamt und damit schwächer wird (Abbildung 37). Die Geschwindigkeit der Reaktivierung der HCN-artigen Komponente blieb jedoch konstant, womit deren Unabhängigkeit von der Dauer der Aktivierung belegt werden kann.

Als weiteres Phänomen wurde außerdem beobachtet, dass bei kurzen Recovery-Perioden keine optische Unterscheidung der beiden Strom-Komponenten möglich war und gleichzeitig größere Instantanströme gemessen wurden (Abbildung 43). Sowohl in der Modellierung der Aktivierungsströme als auch in der empirischen Differenzierung konnte gezeigt werden, dass bei sehr kurzen Haltepotentialen der Anteil der HCN-artigen Ströme sehr gering ist und somit hauptsächlich endogene Ströme sichtbar sind (Abbildung 44). Gleichzeitig schließen die endogenen Kanäle bei kurzer Pause nicht komplett und erhöhen somit den Instantanstrom.

Diese vielfältigen Auswertungen belegen die parallele Expression von mutierten HCN-Kanälen und endogenen Chlorid-Kanälen, insgesamt zeigte sich aber zwischen den einzelnen Oozyten eine große unsystematische Varianz, wie stark die beiden verschiedenen Strom-Komponenten ausgeprägt waren. Insbesondere bei den HA-markierten Mutanten wurden sogar Oozyten vermessen, die nur den Strom durch die mutierten HCN-Kanäle, aber keinen Strom durch endogene Kanäle zeigten (Abbildung 50, Abbildung 46). Bei diesen Messungen war die

6.4 Mutationen am mutmaßlichen Selektivitätsfilter

relative Tail-Leitfähigkeit sogar noch höher (Abbildung 51), was belegt, dass es sich hierbei um eine Reaktivierung während der Depolarisation handelt.

Gleichzeitig zeigten sogar Cut-Open-Messungen nicht-injizierter und auch HCN4*wt*-injizierter Oozyten eine späte Aktivierungskomponente (Abbildung 52), die auf die Expression endogener Kanäle zurückzuführen ist. Dieses Verhalten konnte teilweise auch bei TEVC- und Cut-Open-Messungen, allerdings nicht bei Patch-Clamp-Messungen des HCN2*wt*-Kanals beobachtet werden (Magee et al., 2015; Abbildung 9). Das Auftreten endogener Kanäle und die damit verbundene späte Aktivierung ist demnach keine Eigenheit der Porenmutanten, sondern tritt regelmäßig bei Ganzzell-Messungen von *Xenopus laevis*-Oozyten auf (Weber, 1999a; Terhag et al., 2010; Kuruma et al., 2000). Die fehlende Beobachtung endogener Ströme bei Patch-Clamp-Messungen lässt sich wahrscheinlich darauf zurückführen, dass das Auftreten dieser Ströme den Patch instabil werden oder gar reißen lässt.

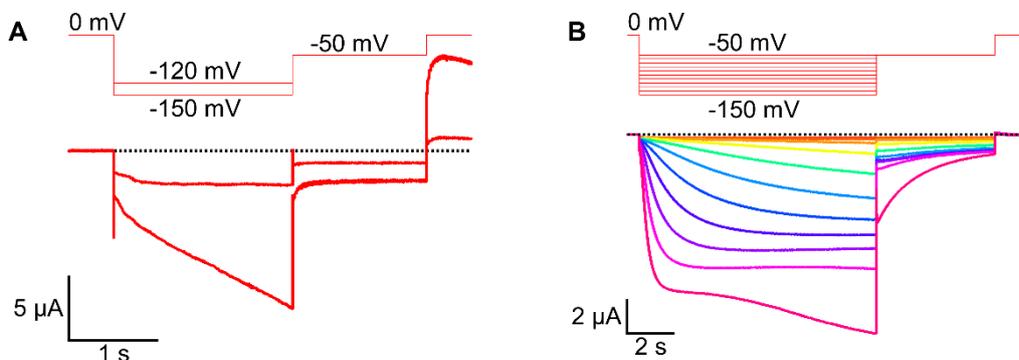


Abbildung 52: **A:** Endogene Kanäle bei nicht-injizierten Oozyten. **B:** Messung endogener Kanäle bei Injektion von HCN4*wt*-mRNA.

Insgesamt konnten auch mithilfe der Porenmutationen keine Gating-Ströme gemessen werden, da weiter Ionenströme vorhanden waren. Das dreiphasige Verhalten der beiden Mutanten G402S und G404S war allerdings auffällig und wurde daher genauer untersucht, um zum besseren Verständnis der Aktivierung des HCN2-Kanals und der Funktion des Selektivitätsfilters beizutragen.

Die für die Porenmutanten spezifische Kombination aus Inaktivierung und Reaktivierung kann dabei möglicherweise durch den aus homologen HCN-Kanälen bekannten „Mode Shift“ (Männikkö et al., 2005) erklärt werden. Als mechanistische Erklärung für diesen Effekt wird eine späte Bewegung der S4-Helix postuliert, die nach der Übertragung der Aktivierung auf die Pore in einen relaxierten Zustand verschoben wird (Jensen et al., 2012; Bruening-Wright und Larsson, 2007; Villalba-Galea et al., 2008). Dabei löst diese späte S4-Bewegung in K_v-Kanälen (Barghaan und Bähring, 2009; Kalstrup und Blunck, 2018) eine C-Typ-Inaktivierung aus (Hoshi und Armstrong, 2013), die bei fehlender cAMP-Applikation ähnlich auch bei spHCN-Kanälen beobachtet werden kann (Shin et al., 2004).

6.4 Mutationen am mutmaßlichen Selektivitätsfilter

Eine solche Inaktivierung wurde bei HCN2*wt*-Kanälen bisher nicht beobachtet, allerdings bleibt offen, ob die späte S4-Bewegung abläuft und lediglich keinen Einfluss auf die Pore hat oder ob sie exklusiv bei den hier vorgestellten Mutanten stattfindet und damit eine C-Typ-analoge Inaktivierung hervorruft.

Die Reaktivierung der Porenmutanten könnte dadurch erklärt werden, dass dieser inaktivierende Einfluss der relaxierten S4-Helix im Zuge des Off-Gatings aufgehoben wird. Da die bei Spannungen nahe des Umkehrpotentials gemessenen potentiellen Gating-Ströme des HCN2*wt*-Kanals mit Zeitkonstanten von etwa 3 bis 4 ms verlaufen (Abbildung 23 A), kann das Off-Gating dabei durchaus für die Reaktivierung der Porenmutanten mit Zeitkonstanten von etwa 20 bis 50 ms (Abbildung 37 A-B) verantwortlich sein.

Für den Einfluss sowohl der Porenregion als auch der S4-Helix auf die C-Typ-Inaktivierung spricht die räumliche Nähe der extrazellulären Enden von S4- und S5-Helix sowie des P-Loops, über den am Shaker-Kanal die C-Typ-Inaktivierung vermittelt wird (Carvalho-de-Souza und Bezanilla, 2019). Für die Untersuchung dieser Fragestellung wäre z. B. eine Fluoreszenz-Markierung der S4-Helix zielführend, wofür allerdings weitgehend cysteinfreie Mutanten oder der Einbau der unnatürlichen Aminosäure Anap notwendig wären.

Zur weiteren Untersuchung des Schaltverhaltens des HCN2*wt*-Kanals sowie der Rolle des Selektivitätsfilters wäre neben der hier nicht untersuchten AAA-Mutation (Xue et al., 2002) auch eine Chimärisierung mit dem *d*rHCN1-Kanal denkbar, dessen zentrale Pore durch die kaum konservierte Aminosäuren-Sequenz keine Kationen leitet (Wobig et al., 2020).

7. Schlussfolgerungen

- (1) Mithilfe der Cut-Open-Voltage-Clamp-Technik können Ionenströme des HCN2*wt*-Kanals zusätzlich zur Patch-Clamp-Technik ebenfalls plausibel gemessen werden.
- (2) Gegenüber Patch-Clamp-Messungen mit Applikation von 10 μM cAMP fällt auf, dass die Aktivierung mit vergleichbarer $V_{1/2}$ und Kinetik abläuft, während die effektive Gating-Ladung am Cut-Open-Setup deutlich niedriger ist und die Deaktivierung deutlich langsamer abläuft.
- (3) Die effektive Gating-Ladung konnte neben der Boltzmann-Beschreibung der I/V -Kurve auch mithilfe der „initial-slope“-Methode bestimmt werden.
- (4) Das Blockieren des HCN2*wt*-Ionenstroms zur Messung von Gating-Strömen ist weder durch Applikation von Cs^+ oder ZD7288 noch durch Austausch der permeablen Kationen durch NMDG komplett möglich.
- (5) Durch Messungen bei Spannungen nahe des Umkehrpotentials konnten mutmaßliche Off-Gating-Ströme mit einer Kinetik im Bereich von wenigen ms gemessen werden.
- (6) Mutationen am Selektivitätsfilter führten nicht zu einem Verlust des Ionenstroms, sondern zu funktionellen Kanälen mit einer spezifischen Kombination aus Aktivierung, Inaktivierung und später Aktivierung.
- (7) Die ersten Komponenten konnten den mutierten HCN-Kanälen zugeordnet werden, während die späte Aktivierung auf endogene Chlorid-Kanäle zurückzuführen ist.
- (8) Die Membranlokalisierung der entsprechenden Porenmutanten wurde durch Anti-HA-spezifische fluoreszenzmarkierte Antikörper belegt.
- (9) Die Aktivierung und die Tailströme der Porenmutanten konnten durch eine globale Modellierung konsistent beschrieben werden.

8. Literaturverzeichnis

- Adán, V.; Crown, L. A. (2003): Diagnosis and treatment of sick sinus syndrome, in: *American Family Physician*, 67, S. 1725–1732.
- Akimoto, M.; Zhang, Z.; Boulton, S.; Selvaratnam, R.; VanSchouwen, B.; Gloyd, M.; Accili, E. A.; Lange, O. F.; Melacini, G. (2014): A mechanism for the auto-inhibition of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel opening and its relief by cAMP, in: *The Journal of Biological Chemistry*, 289, S. 22205–22220.
- Alig, J.; Marger, L.; Mesirca, P.; Ehmke, H.; Mangoni, M. E.; Isbrandt, D. (2009): Control of heart rate by cAMP sensitivity of HCN channels, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, S. 12189–12194.
- Altomare, C.; Bucchi, A.; Camatini, E.; Baruscotti, M.; Viscomi, C.; Moroni, A.; DiFrancesco, D. (2001): Integrated allosteric model of voltage gating of HCN channels, in: *The Journal of General Physiology*, 117, S. 519–532.
- Alvarez-Baron, C. P.; Klenchin, V. A.; Chanda, B. (2018): Minimal molecular determinants of isoform-specific differences in efficacy in the HCN channel family, in: *The Journal of General Physiology*, 150, S. 1203–1213.
- Bankston, J. R.; Camp, S. S.; DiMaio, F.; Lewis, A. S.; Chetkovich, D. M.; Zagotta, W. N. (2012): Structure and stoichiometry of an accessory subunit TRIP8b interaction with hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, S. 7899–7904.
- Bankston, J. R.; DeBerg, H. A.; Stoll, S.; Zagotta, W. N. (2017): Mechanism for the inhibition of the cAMP dependence of HCN ion channels by the auxiliary subunit TRIP8b, in: *The Journal of Biological Chemistry*, 292, S. 17794–17803.
- Barghaan, J.; Bähring, R. (2009): Dynamic coupling of voltage sensor and gate involved in closed-state inactivation of kv4.2 channels, in: *The Journal of General Physiology*, 133, S. 205–224.
- Becchetti, A.; de Fusco, M.; Crociani, O.; Cherubini, A.; Restano-Cassulini, R.; Lecchi, M.; Masi, A.; Arcangeli, A.; Casari, G.; Wanke, E. (2002): The functional properties of the human ether-à-go-go-like (HELK2) K⁺ channel, in: *The European Journal of Neuroscience*, 16, S. 415–428.
- Becker, F.; Reid, C. A.; Hallmann, K.; Tae, H.-S.; Phillips, A. M.; Teodorescu, G.; Weber, Y. G.; Kleefuss-Lie, A.; Elger, C.; Perez-Reyes, E.; Petrou, S.; Kunz, W. S.; Lerche, H.; Maljevic, S. (2017): Functional variants in HCN4 and CACNA1H may contribute to genetic generalized epilepsy, in: *Epilepsia open*, 2, S. 334–342.
- Benndorf, K.; Kusch, J.; Schulz, E. (2012a): Probability Fluxes and Transition Paths in a Markovian Model Describing Complex Subunit Cooperativity in HCN2 Channels, in: *PLoS Comput Biol*, 8, S. e1002721.
- Benndorf, K.; Thon, S.; Schulz, E. (2012b): Unraveling subunit cooperativity in homotetrameric HCN2 channels, in: *Biophysical Journal*, 103, S. 1860–1869.
- Bezanilla, F. (2000): The voltage sensor in voltage-dependent ion channels, in: *Physiol Rev*, 80, S. 555–592.
- Bezanilla, F. (2008): How membrane proteins sense voltage, in: *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9, S. 323–332.
- Biel, M.; Wahl-Schott, C.; Michalakis, S.; Zong, X. (2009): Hyperpolarization-activated cation channels – from genes to function, in: *Physiol Rev*, 89, S. 847–885.
- Biel, S.; Aquila, M.; Hertel, B.; Berthold, A.; Neumann, T.; DiFrancesco, D.; Moroni, A.; Thiel, G.; Kaufenstein, S. (2016): Mutation in S6 domain of HCN4 channel in patient with suspected Brugada syndrome modifies channel function, in: *Pflügers Archiv*, 468, S. 1663–1671.
- Biskup, C.; Kusch, J.; Schulz, E.; Nache, V.; Schwede, F.; Lehmann, F.; Hagen, V.; Benndorf, K. (2007): Relating ligand binding to activation gating in CNGA2 channels, in: *Nature*, 446, S. 440–443.
- BoSmith, R. E.; Briggs, I.; Sturgess, N. C. (1993): Inhibitory actions of ZENECA ZD7288 on whole-cell hyperpolarization activated inward current (I_h) in guinea-pig dissociated sinoatrial node cells, in: *Br J Pharmacol*, 110, S. 343–349.
- Brennan, G. P.; Baram, T. Z.; Poolos, N. P. (2016): Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated (HCN) Channels in Epilepsy, in: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6, S. a022384.
- Brown, H. F.; DiFrancesco, D.; Noble, S. J. (1979): How does adrenaline accelerate the heart?, in: *Nature*, 280, S. 235–236.
- Bruening-Wright, A.; Elinder, F.; Larsson, H. P. (2007): Kinetic relationship between the voltage sensor and the activation gate in spHCN channels, in: *The Journal of General Physiology*, 130, S. 71–81.

- Bruening-Wright, A.; Larsson, H. P. (2007): Slow conformational changes of the voltage sensor during the mode shift in hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide-gated channels, in: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27, S. 270–278.
- Brugada, R.; Campuzano, O.; Sarquella-Brugada, G.; Brugada, J.; Brugada, P. (2014): Brugada Syndrome, in: *Methodist DeBakey Cardiovascular Journal*, 10, S. 25–28.
- Bucchi, A.; Baruscotti, M.; DiFrancesco, D. (2002): Current-dependent block of rabbit sino-atrial node I_f channels by ivabradine, in: *The Journal of General Physiology*, 120, S. 1–13.
- Bucchi, A.; Baruscotti, M.; Nardini, M.; Barbuti, A.; Micheloni, S.; Bolognesi, M.; DiFrancesco, D. (2013): Identification of the molecular site of ivabradine binding to HCN4 channels, in: *PloS one*, 8, S. e53132.
- Calejo, A. I.; Reverendo, M.; Silva, V. S.; Pereira, P. M.; Santos, M. A. S.; Zorec, R.; Gonçalves, P. P. (2014): Differences in the expression pattern of HCN isoforms among mammalian tissues: sources and implications, in: *Molecular Biology Reports*, 41, S. 297–307.
- Cannon, S. C.; Bean, B. P. (2010): Sodium channels gone wild: resurgent current from neuronal and muscle channelopathies, in: *The Journal of clinical investigation*, 120, S. 80–83.
- Carvalho-de-Souza, J. L.; Bezanilla, F. (2019): Noncanonical mechanism of voltage sensor coupling to pore revealed by tandem dimers of Shaker, in: *Nature Communications*, 10, S. 3584.
- 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, in: *The Journal of Biological Chemistry*, 275, S. 36465–36471.
- 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, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, S. 11277–11282.
- Chen, J.; Piper, D. R.; Sanguinetti, M. C. (2002): Voltage sensing and activation gating of HCN pacemaker channels, in: *Trends in Cardiovascular Medicine*, 12, S. 42–45.
- Cheng, L.; Kinard, K.; Rajamani, R.; Sanguinetti, M. C. (2007): Molecular mapping of the binding site for a blocker of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-modulated pacemaker channels, in: *J Pharmacol Exp Ther*, 322, S. 931–939.
- Cowgill, J.; Klenchin, V. A.; Alvarez-Baron, C.; Tewari, D.; Blair, A.; Chanda, B. (2018): Bipolar switching by HCN voltage sensor underlies hyperpolarization activation, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116, S. 670–678.
- Craven, K. B.; Zagotta, W. N. (2006): CNG and HCN channels – two peas, one pod, in: *Annu Rev Physiol*, 68, S. 375–401.
- Dai, G.; Aman, T. K.; DiMaio, F.; Zagotta, W. N. (2019): The HCN channel voltage sensor undergoes a large downward motion during hyperpolarization, in: *Nat Struct Mol Biol*, 26, S. 686–694.
- DeBerg, H. A.; Bankston, J. R.; Rosenbaum, J. C.; Brzovic, P. S.; Zagotta, W. N.; Stoll, S. (2015): Structural Mechanism for the Regulation of HCN Ion Channels by the Accessory Protein TRIP8b, in: *Structure*, 23, S. 734–744.
- DeBerg, H. A.; Brzovic, P. S.; Flynn, G. E.; Zagotta, W. N.; Stoll, S. (2016): Structure and Energetics of Allosteric Regulation of HCN2 Ion Channels by Cyclic Nucleotides, in: *The Journal of Biological Chemistry*, 291, S. 371–381.
- DiFrancesco, D. (1991): Generation and control of cardiac pacing the pacemaker current, in: *Trends in Cardiovascular Medicine*, 1, S. 250–255.
- DiFrancesco, D. (2010): The role of the funny current in pacemaker activity, in: *Circulation research*, 106, S. 434–446.
- DiFrancesco, J. C.; DiFrancesco, D. (2015): Dysfunctional HCN ion channels in neurological diseases, in: *Front Cell Neurosci*, 6, S. 174.
- Dumont, J. N. (1972): Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals, in: *Journal of Morphology*, 136, S. 153–179.
- Elinder, F.; Mannikko, R.; Pandey, S.; Larsson, H. P. (2006): Mode shifts in the voltage gating of the mouse and human HCN2 and HCN4 channels, in: *The Journal of Physiology*, 575, S. 417–431.

- El-Kholy, W.; MacDonald, P. E.; Fox, J. M.; Bhattacharjee, A.; Xue, T.; Gao, X.; Zhang, Y.; Stieber, J.; Li, R. A.; Tsushima, R. G.; Wheeler, M. B. (2007): Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in pancreatic beta-cells, in: *Molecular Endocrinology*, 21, S. 753–764.
- Fenske, S.; Krause, S.; Biel, M.; Wahl-Schott, C. (2011): The role of HCN channels in ventricular repolarization, in: *Trends in Cardiovascular Medicine*, 21, S. 216–220.
- Fürst, O.; D'Avanzo, N. (2015): Isoform dependent regulation of human HCN channels by cholesterol, in: *Scientific Reports*, 5, S. 14270.
- Gammone, M. A.; Riccioni, G.; Massari, F.; D'Orazio, N. (2020): Beneficial effect of ivabradine against cardiovascular diseases, in: *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 12, S. 161–172.
- Gauss, R.; Seifert, R.; Kaupp, U. B. (1998): Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm, in: *Nature*, 393, S. 583–587.
- Good, C. H.; Hoffman, A. F.; Hoffer, B. J.; Chefer, V. I.; Shippenberg, T. S.; Backman, C. M.; Larsson, N.-G.; Olson, L.; Gellhaar, S.; Galter, D.; Lupica, C. R. (2011): Impaired nigrostriatal function precedes behavioral deficits in a genetic mitochondrial model of Parkinson's disease, in: *The FASEB Journal*, 25, S. 1333–1344.
- Guimarães, S.; Moura, D. (2001): Vascular adrenoceptors: an update, in: *Pharmacological Reviews*, 53, S. 319–356.
- Hardel, N.; Harmel, N.; Zolles, G.; Fakler, B.; Klöcker, N. (2008): Recycling endosomes supply cardiac pacemaker channels for regulated surface expression, in: *Cardiovascular research*, 79, S. 52–60.
- Harris, N. C.; Constanti, A. (1995): Mechanism of block by ZD 7288 of the hyperpolarization-activated inward rectifying current in guinea pig substantia nigra neurons in vitro, in: *J Neurophysiol*, 74, S. 2366–2378.
- He, C.; Chen, F.; Li, B.; Hu, Z. (2014): Neurophysiology of HCN channels – From cellular functions to multiple regulations, in: *Progress in Neurobiology*, 112, S. 1–23.
- He, F.; Yang, Z.; Dong, X.; Fang, Z.; Liu, Q.; Hu, X.; Yi, S.; Li, L. (2018): The role of HCN channels in peristaltic dysfunction in human ureteral tuberculosis, in: *International Urology and Nephrology*, 50, S. 639–645.
- Helman, S. I.; Thompson, S. M. (1982): Interpretation and use of electrical equivalent circuits in studies of epithelial tissues, in: *Am J Physiol*, 243, S. F519–31.
- Hernandez, A.; Hernández-Centeno, R.; Espino-Saldaña, Á. E.; Martínez-Torres, A. (2020): HCN2 activation modulation: An electrophysiological and molecular study of the well-preserved LCI sequence in the pore channel, in: *Archives of biochemistry and biophysics*, 689, S. 108436.
- Herrmann, S.; Stieber, J.; Ludwig, A. (2007): Pathophysiology of HCN channels, in: *Pflügers Archiv*, 454, S. 517–522.
- Hille, B. (2001): Ion channels of excitable membranes, 3. ed., Sinauer, Sunderland, Mass.
- Hodgkin, A. L.; Huxley, A. F. (1952): A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve, in: *The Journal of Physiology*, 117, S. 500–544.
- Hoshi, T.; Armstrong, C. M. (2013): C-type inactivation of voltage-gated K⁺ channels: pore constriction or dilation?, in: *The Journal of General Physiology*, 141, S. 151–160.
- Hoshi, T.; Zagotta, W. N.; Aldrich, R. W. (1994): Shaker potassium channel gating. I – Transitions near the open state, in: *The Journal of General Physiology*, 103, S. 249–278.
- Hummert, S.; Thon, S.; Eick, T.; Schmauder, R.; Schulz, E.; Benndorf, K. (2018): Activation gating in HCN2 channels, in: *PLoS Comput Biol*, 14, S. e1006045.
- Huppelsberg, J.; Walter, K. (2013): Kurzlehrbuch Physiologie, 4. Aufl., Thieme, Stuttgart.
- Ikeda, S. (2008): LSM (Zeiss) Image Reader, NIAAA, NIH.
- Ishida, I. G.; Rangel-Yescas, G. E.; Carrasco-Zanini, J.; Islas, L. D. (2015): Voltage-dependent gating and gating charge measurements in the K_v1.2 potassium channel, in: *The Journal of General Physiology*, 145, S. 345–358.
- Jensen, M. Ø.; Jogini, V.; Borhani, D. W.; Leffler, A. E.; Dror, R. O.; Shaw, D. E. (2012): Mechanism of Voltage Gating in Potassium Channels, in: *Science*, 336, S. 229–233.
- Jiang, Z.; Yue, W. W. S.; Chen, L.; Sheng, Y.; Yau, K.-W. (2018): Cyclic-Nucleotide- and HCN-Channel-Mediated Phototransduction in Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells, in: *Cell*, 175, S. 652–664.e12.
- Kalstrup, T.; Blunck, R. (2013): Dynamics of internal pore opening in K_v channels probed by a fluorescent unnatural amino acid, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, S. 8272–8277.

- Kalstrup, T.; Blunck, R. (2018): S4-S5 linker movement during activation and inactivation in voltage-gated K⁺ channels, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, S. E6751-E6759.
- Kasimova, M. A.; Tewari, D.; Cowgill, J. B.; Ursuleaz, W. C.; Lin, J. L.; Delemotte, L.; Chanda, B. (2019): Helix breaking transition in the S4 of HCN channel is critical for hyperpolarization-dependent gating, in: *eLife*, 8, S. e53400.
- Kowdley, G. C.; Ackerman, S. J.; John, J. 3.; Jones, L. R.; Moorman, JR (1994): Hyperpolarization-activated chloride currents in *Xenopus* oocytes, in: *The Journal of General Physiology*, 103, S. 217–230.
- Krause, J. D.; Foster, C. D.; Reinhart, P. H. (1996): *Xenopus laevis* oocytes contain endogenous large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels, in: *Neuropharmacology*, 35, S. 1017–1022.
- Kubisch, C.; Schroeder, B. C.; Friedrich, T.; Lütjohann, B.; El-Amraoui, A.; Marlin, S.; Petit, C.; Jentsch, T. J. (1999): KCNQ4, a Novel Potassium Channel Expressed in Sensory Outer Hair Cells, Is Mutated in Dominant Deafness, in: *Cell*, 96, S. 437–446.
- Kuruma, A.; Hirayama, Y.; Hartzell, H. C. (2000): A hyperpolarization- and acid-activated nonselective cation current in *Xenopus* oocytes, in: *American Journal of Physiology. Cell physiology*, 279, S. 13.
- Kusano, K.; Miledi, R.; Stinnakre, J. (1977): Acetylcholine receptors in the oocyte membrane, in: *Nature*, 270, S. 739–741.
- Kusch, J.; Biskup, C.; Thon, S.; Schulz, E.; Nache, V.; Zimmer, T.; Schwede, F.; Benndorf, K. (2010): Interdependence of receptor activation and ligand binding in HCN2 pacemaker channels, in: *Neuron*, 67, S. 75–85.
- Kusch, J.; Thon, S.; Schulz, E.; Biskup, C.; Nache, V.; Zimmer, T.; Seifert, R.; Schwede, F.; Benndorf, K. (2012): How subunits cooperate in cAMP-induced activation of homotetrameric HCN2 channels, in: *Nat Chem Biol*, 8, S. 162–169.
- Lacroix, J. J.; Campos, F. V.; Frezza, L.; Bezanilla, F. (2013): Molecular Bases for the Asynchronous Activation of Sodium and Potassium Channels Required for Nerve Impulse Generation, in: *Neuron*, 79, S. 651–657.
- Lee, C.-H.; MacKinnon, R. (2017): Structures of the Human HCN1 Hyperpolarization-Activated Channel, in: *Cell*, 168, S. 111.
- Lee, C.-H.; MacKinnon, R. (2019): Voltage Sensor Movements during Hyperpolarization in the HCN Channel, in: *Cell*, S. 1–8.
- León-Aparicio, D.; Salvador, C.; Aparicio-Trejo, O. E.; Briones-Herrera, A.; Pedraza-Chaverri, J.; Vaca, L.; Sampieri, A.; Padilla-Flores, T.; López-González, Z.; León-Contreras, J. C.; Hernández-Pando, R.; Escobar, L. I. (2019): Novel Potassium Channels in Kidney Mitochondria: The Hyperpolarization-Activated and Cyclic Nucleotide-Gated HCN Channels, in: *International journal of molecular sciences*, 20, S. 4995.
- Lewis, A. H.; Raman, I. M. (2014): Resurgent current of voltage-gated Na⁺ channels, in: *The Journal of Physiology*, 592, S. 4825–4838.
- Lewis, A. S.; Estep, C. M.; Chetkovich, D. M. (2010): The fast and slow ups and downs of HCN channel regulation, in: *Channels*, 4, S. 215–231.
- Li, M.; Zhou, X.; Wang, S.; Michailidis, I.; Gong, Y.; Su, D.; Li, H.; Li, X.; Yang, J. (2017): Structure of a eukaryotic cyclic-nucleotide-gated channel, in: *Nature*, 542, S. 60–65.
- Li, N.; Csepe, T. A.; Hansen, B. J.; Dobrzynski, H.; Higgins, R. S. D.; Kilic, A.; Mohler, P. J.; Janssen, P. M. L.; Rosen, M. R.; Biesiadecki, B. J.; Fedorov, V. V. (2015): Molecular Mapping of Sinoatrial Node HCN Channel Expression in the Human Heart, in: *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology*, 8, S. 1219–1227.
- Li, Q.; Wanderling, S.; Paduch, M.; Medovoy, D.; Singharoy, A.; McGreevy, R.; Villalba-Galea, C.; Hulse, R. E.; Roux, B.; Schulten, K.; Kossiakoff, A.; Perozo, E. (2014): Structural Mechanism of Voltage-Dependent Gating in an Isolated Voltage-Sensing Domain, in: *Nat Struct Mol Biol*, 21, S. 244–252.
- Liman, E. R.; Tytgat, J.; Hess, P. (1992): Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs, in: *Neuron*, 9, S. 861–871.
- Liu, Q.; Wu, C.; Huang, S.; Wu, Q.; Zhou, T.; Liu, X.; Liu, X.; Hu, X.; Li, L. (2018): Decreased hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels are involved in bladder dysfunction associated with spinal cord injury, in: *International Journal of Molecular Medicine*, 41, S. 2609–2618.
- Lolicato, M.; Nardini, M.; Gazzarrini, S.; Moller, S.; Bertinetti, D.; Herberg, F. W.; Bolognesi, M.; Martin, H.; Fasolini, M.; Bertrand, J. A.; Arrigoni, C.; Thiel, G.; Moroni, A. (2011): Tetramerization dynamics of C-terminal domain

- underlies isoform-specific cAMP gating in hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels, in: *The Journal of Biological Chemistry*, 286, S. 44811–44820.
- Ludwig, A.; Zong, X.; Jeglitsch, M.; Hofmann, F.; Biel, M. (1998): A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels, in: *Nature*, 393, S. 587–591.
- Lyman, K. A.; Han, Y.; Chetkovich, D. M. (2017): Animal models suggest the TRIP8b-HCN interaction is a therapeutic target for Major Depressive Disorder, in: *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21, S. 235–237.
- Macri, V.; Angoli, D.; Accili, E. A. (2012): Architecture of the HCN selectivity filter and control of cation permeation, in: *Scientific Reports*, 2, S. 894.
- Macri, V.; Proenza, C.; Agranovich, E.; Angoli, D.; Accili, E. A. (2002): Separable gating mechanisms in a Mammalian pacemaker channel, in: *The Journal of Biological Chemistry*, 277, S. 35939–35946.
- Magee, K. E.; Madden, Z.; Young, E. C. (2015): HCN Channel C-Terminal Region Speeds Activation Rates Independently of Autoinhibition, in: *The Journal of Membrane Biology*, 248, S. 1043–1060.
- Magee, K.E.A.; Claydon, T. W.; Young, E. C. (2017): Fluorescence Investigations of the Rate-Limiting Step in the HCN Ion Channel Deactivation Pathway (persönliche Kommunikation).
- Makhina, E. N.; Kelly, A. J.; Lopatin, A. N.; Mercer, R. W.; Nichols, C. G. (1994): Cloning and expression of a novel human brain inward rectifier potassium channel, in: *The Journal of Biological Chemistry*, 269, S. 20468–20474.
- Männikkö, R.; Elinder, F.; Larsson, H. P. (2002): Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages, in: *Nature*, 419, S. 837–841.
- Männikkö, R.; Pandey, S.; Larsson, H. P.; Elinder, F. (2005): Hysteresis in the Voltage Dependence of HCN Channels – Conversion between Two Modes Affects Pacemaker Properties, in: *J. Gen. Physiol.*, 125, S. 305–326.
- Marchand, P.; Marmet, L. (1983): Binomial smoothing filter – A way to avoid some pitfalls of least-squares polynomial smoothing, in: *Review of Scientific Instruments*, 54, S. 1034–1041.
- Marini, C.; Porro, A.; Rastetter, A.; Dalle, C.; Rivolta, I.; Bauer, D.; Oegema, R.; Nava, C.; Parrini, E.; Mei, D.; Mercer, C.; Dhamija, R.; Chambers, C.; Coubes, C.; Thévenon, J.; Kuentz, P.; Julia, S.; Pasquier, L.; Dubourg, C.; Carré, W.; Rosati, A.; Melani, F.; Pisano, T.; Giardino, M.; Innes, A. M.; Alembik, Y.; Scheidecker, S.; Santos, M.; Figueiroa, S.; Garrido, C.; Fusco, C.; Frattini, D.; Spagnoli, C.; Binda, A.; Granata, T.; Ragona, F.; Freri, E.; Franceschetti, S.; Canafoglia, L.; Castellotti, B.; Gellera, C.; Milanese, R.; Mancardi, M. M.; Clark, D. R.; Kok, F.; Helbig, K. L.; Ichikawa, S.; Sadler, L.; Neupauerová, J.; Laššuthova, P.; Šterbová, K.; Laridon, A.; Brilstra, E.; Koeleman, B.; Lemke, J. R.; Zara, F.; Striano, P.; Soblet, J.; Smits, G.; Deconinck, N.; Barbuti, A.; DiFrancesco, D.; LeGuern, E.; Guerrini, R.; Santoro, B.; Hamacher, K.; Thiel, G.; Moroni, A.; DiFrancesco, J. C.; Depienne, C. (2018): HCN1 mutation spectrum: from neonatal epileptic encephalopathy to benign generalized epilepsy and beyond, in: *Brain: a Journal of Neurology*, 141, S. 3160–3178.
- Marshall, P. W.; Rouse, W.; Briggs, I.; Hargreaves, R. B.; Mills, S. D.; McLoughlin, B. J. (1993): ICI D7288, a novel sinoatrial node modulator, in: *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 21, S. 902–906.
- Mengesha, H. G.; Tafesse, T. B.; Bule, M. H. (2017): If Channel as an Emerging Therapeutic Target for Cardiovascular Diseases – A Review of Current Evidence and Controversies, in: *Frontiers in Pharmacology*, 8, S. 874.
- Mistrík, P.; Torre, V. (2004): Histidine 518 in the S6-CNBD linker controls pH dependence and gating of HCN channel from sea-urchin sperm, in: *Pflügers Archiv*, 448, S. 76–84.
- Möller, M.; Silbernagel, N.; Wrobel, E.; Stallmayer, B.; Amedonu, E.; Rinné, S.; Peischard, S.; Meuth, S. G.; Wunsch, B.; Strutz-Seebohm, N.; Decher, N.; Schulze-Bahr, E.; Seebohm, G. (2018): In Vitro Analyses of Novel HCN4 Gene Mutations, in: *Cellular Physiology and Biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 49, S. 1197–1207.
- Monod, J.; Wyman, J.; Changeux, J. P. (1965): On the Nature of Allosteric Transition – A Plausible Model, in: *Journal of Molecular Biology*, 12, S. 88–118.
- Moroni, A.; Barbuti, A.; Altomare, C.; Viscomi, C.; Morgan, J.; Baruscotti, M.; DiFrancesco, D. (2000): Kinetic and ionic properties of the human HCN2 pacemaker channel, in: *Pflügers Archiv*, 439, S. 618–626.
- 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, in: *The Journal of Biological Chemistry*, 278, S. 43781–43786.

- Noceti, F.; Baldelli, P.; Wei, X.; Qin, N.; Toro, L.; Birnbaumer, L.; Stefani, E. (1996): Effective gating charges per channel in voltage-dependent K⁺ and Ca²⁺ channels, in: *The Journal of General Physiology*, 108, S. 143–155.
- Page, D. A.; Magee, K. E. A.; Li, J.; Jung, M.; Young, E. C. (2020): Cytoplasmic Autoinhibition in HCN Channels is Regulated by the Transmembrane Region, in: *The Journal of Membrane Biology*
- Pai, V. P.; Willocq, V.; Pitcairn, E. J.; Lemire, J. M.; Pare, J.-F.; Shi, N.-Q.; McLaughlin, K. A.; Levin, M. (2017): HCN4 ion channel function is required for early events that regulate anatomical left-right patterning in a nodal and lefty asymmetric gene expression-independent manner, in: *Biology open*, 6, S. 1445–1457.
- Perozo, E.; MacKinnon, R.; Bezanilla, F.; Stefani, E. (1993): Gating currents from a nonconducting mutant reveal open-closed conformations in Shaker K⁺ channels, in: *Neuron*, 11, S. 353–358.
- Perozo, E.; Papazian, D. M.; Stefani, E.; Bezanilla, F. (1992): Gating currents in Shaker K⁺ channels. Implications for activation and inactivation models, in: *Biophysical Journal*, 62, S. 160–171.
- Piper, D. R.; Varghese, A.; Sanguinetti, M. C.; Tristani-Firouzi, M. (2003): Gating currents associated with intramembrane charge displacement in HERG potassium channels, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, S. 10534–10539.
- Pitcairn, E.; Harris, H.; Epiney, J.; Pai, V. P.; Lemire, J. M.; Ye, B.; Shi, N.-Q.; Levin, M.; McLaughlin, K. A. (2017): Coordinating heart morphogenesis – A novel role for hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels during cardiogenesis in *Xenopus laevis*, in: *Communicative & integrative biology*, 10, S. e1309488.
- Porro, A.; Saponaro, A.; Gasparri, F.; Bauer, D.; Gross, C.; Pisoni, M.; Abbandonato, G.; Hamacher, K.; Santoro, B.; Thiel, G.; Moroni, A. (2019): The HCN domain couples voltage gating and cAMP response in hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels, in: *eLife*, 8, S. e49672.
- Priest, M. F.; Lacroix, J. J.; Villalba-Galea, C. A.; Bezanilla, F. (2013): S3-S4 linker length modulates the relaxed state of a voltage-gated potassium channel, in: *Biophysical Journal*, 105, S. 2312–2322.
- Raman, I. M.; Bean, B. P. (1997): Resurgent Sodium Current and Action Potential Formation in Dissociated Cerebellar Purkinje Neurons, in: *The Journal of Neuroscience*, 17, S. 4517–4526.
- Randich, A. M.; Cuello, L. G.; Wanderling, S. S.; Perozo, E. (2014): Biochemical and structural analysis of the hyperpolarization-activated K⁺ channel MVP, in: *Biochemistry*, 53, S. 1627–1636.
- Rothberg, B. S.; Shin, K. S.; Yellen, G. (2003): Movements near the gate of a hyperpolarization-activated cation channel, in: *The Journal of General Physiology*, 122, S. 501–510.
- Ryu, S.; Yellen, G. (2012): Charge movement in gating-locked HCN channels reveals weak coupling of voltage sensors and gate, in: *The Journal of General Physiology*, 140, S. 469–479.
- Santoro, B.; Hu, L.; Liu, H.; Saponaro, A.; Pian, P.; Piskorowski, R. A.; Moroni, A.; Siegelbaum, S. A. (2011): TRIP8b regulates HCN1 channel trafficking and gating through two distinct C-terminal interaction sites, in: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31, S. 4074–4086.
- 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, in: *Cell*, 93, S. 717–729.
- Santoro, B.; Tibbs, G. R. (1999): The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels, in: *Annals of the New York Academy of Sciences*, 868, S. 741–764.
- Santoro, B.; Wainger, B. J.; Siegelbaum, S. A. (2004): Regulation of HCN channel surface expression by a novel C-terminal protein-protein interaction, in: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24, S. 10750–10762.
- Schmidt, R. F.; Lang, F.; Heckmann, M. (2010): Physiologie des Menschen – Mit Pathophysiologie: mit Online-Repetitorium, Sonderausgabe der 31. Auflage, Springer, Berlin.
- Schweizer, P. A.; Schröter, J.; Greiner, S.; Haas, J.; Yampolsky, P.; Mereles, D.; Buss, S. J.; Seyler, C.; Bruehl, C.; Draguhn, A.; Koenen, M.; Meder, B.; Katus, H. A.; Thomas, D. (2014): The Symptom Complex of Familial Sinus Node Dysfunction and Myocardial Noncompaction Is Associated With Mutations in the HCN4 Channel, in: *Journal of the American College of Cardiology*, 64, S. 757–767.
- Sesti, F.; Rajan, S.; Gonzalez-Colaso, R.; Nikolaeva, N.; Goldstein, S. A. N. (2003): Hyperpolarization moves S4 sensors inward to open MVP, a methanococcal voltage-gated potassium channel, in: *Nature Neuroscience*, 6, S. 353–361.
- Shahi, P. K.; Choi, S.; Zuo, D. C.; Kim, M. Y.; Park, C. G.; Kim, Y. D.; Lee, J.; Park, K. J.; So, I.; Jun, J. Y. (2013): The possible roles of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide channels in regulating pacemaker activity in colonic interstitial cells of Cajal, in: *Journal of Gastroenterology*, 49, S. 1001–1010.

- Shin, K. S.; Maertens, C.; Proenza, C.; Rothberg, B. S.; Yellen, G. (2004): Inactivation in HCN channels results from reclosure of the activation gate: – desensitization to voltage, in: *Neuron*, 41, S. 737–744.
- Shin, K. S.; Rothberg, B. S.; Yellen, G. (2001): Blocker state dependence and trapping in hyperpolarization-activated cation channels – evidence for an intracellular activation gate, in: *The Journal of General Physiology*, 117, S. 91–101.
- Sigg, D.; Bezanilla, F. (1997): Total charge movement per channel. The relation between gating charge displacement and the voltage sensitivity of activation, in: *The Journal of General Physiology*, 109, S. 27–39.
- So, I.; Ashmole, I.; Davies, N. W.; Sutcliffe, M. J.; Stanfield, P. R. (2001): The K⁺ channel signature sequence of murine Kir2.1 – mutations that affect microscopic gating but not ionic selectivity, in: *The Journal of Physiology*, 531, S. 37–50.
- Stefani, E.; Toro, L.; Perozo, E.; Bezanilla, F. (1994): Gating of Shaker K⁺ channels – I. Ionic and gating currents, in: *Biophysical Journal*, 66, S. 996–1010.
- Stieber, J.; Stöckl, G.; Herrmann, S.; Hassfurth, B.; Hofmann, F. (2005): Functional expression of the human HCN3 channel, in: *The Journal of Biological Chemistry*, 280, S. 34635–34643.
- Stillitano, F.; Lonardo, G.; Zicha, S.; Varro, A.; Cerbai, E.; Mugelli, A.; Nattel, S. (2008): Molecular basis of funny current (I_f) in normal and failing human heart, in: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 45, S. 289–299.
- Stoenica, L.; Wilkars, W.; Battefeld, A.; Stadler, K.; Bender, R.; Strauss, U. (2013): HCN1 subunits contribute to the kinetics of I_h in neonatal cortical plate neurons, in: *Developmental Neurobiology*, 73, S. 785–797.
- Sunkara, M. R.; Schwabe, T.; Ehrlich, G.; Kusch, J.; Benndorf, K. (2018): All four subunits of HCN2 channels contribute to the activation gating in an additive but intricate manner, in: *The Journal of General Physiology*, 150, S. 1261–1271.
- Tagliatela, M.; Toro, L.; Stefani, E. (1992): Novel voltage clamp to record small, fast currents from ion channels expressed in *Xenopus* oocytes, in: *Biophysical Journal*, 61, S. 78–82.
- Terhag, J.; Cavara, N. A.; Hollmann, M. (2010): Cave Canalem – How endogenous ion channels may interfere with heterologous expression in *Xenopus* oocytes, in: *Methods*, 51, S. 66–74.
- Thompson, S. M. (1986): Relations between chord and slope conductances and equivalent electromotive forces, in: *Am J Physiol*, 250, S. C333–9.
- Thon, S.; Schmauder, R.; Benndorf, K. (2013): Elementary functional properties of single HCN2 channels, in: *Biophysical Journal*, 105, S. 1581–1589.
- Thon, S.; Schulz, E.; Kusch, J.; Benndorf, K. (2015): Conformational Flip of Nonactivated HCN2 Channel Subunits Evoked by Cyclic Nucleotides, in: *Biophysical Journal*, 109, S. 2268–2276.
- Thull, S.; Neacsu, C.; O'Reilly, A. O.; Bothe, S.; Hausmann, R.; Huth, T.; Meents, J.; Lampert, A. (2020): Mechanism underlying hooked resurgent-like tail currents induced by an insecticide in human cardiac Nav1.5, in: *Toxicology and applied pharmacology*, 397, S. 115010.
- Tomczak, A.; Stühmer, W. (2015): nicht veröffentlichte Daten
- Tsantoulas, C.; Mooney, E. R.; McNaughton, P. A. (2016): HCN2 ion channels – Basic science opens up possibilities for therapeutic intervention in neuropathic pain, in: *The Biochemical Journal*, 473, S. 2717–2736.
- Tzounopoulos, T.; Maylie, J.; Adelman, J. P. (1995): Induction of endogenous channels by high levels of heterologous membrane proteins in *Xenopus* oocytes, in: *Biophysical Journal*, 69, S. 904–908.
- Ulens, C.; Siegelbaum, S. A. (2003): Regulation of Hyperpolarization-Activated HCN Channels by cAMP through a Gating Switch in Binding Domain Symmetry, in: *Neuron*, 40, S. 959–970.
- van Slyke, A. C.; Rezazadeh, S.; Snopkowski, M.; Shi, P.; Allard, C. R.; Claydon, T. W. (2010): Mutations within the S4-S5 linker alter voltage sensor constraints in hERG K⁺ channels, in: *Biophysical Journal*, 99, S. 2841–2852.
- VanSchouwen, B.; Akimoto, M.; Sayadi, M.; Fogolari, F.; Melacini, G. (2015): Role of Dynamics in the Autoinhibition and Activation of the Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-modulated (HCN) Ion Channels, in: *The Journal of Biological Chemistry*, 290, S. 17642–17654.
- VanSchouwen, B.; Melacini, G. (2016): Structural Basis of Tonic Inhibition by Dimers of Dimers in Hyperpolarization-Activated Cyclic-Nucleotide-Modulated (HCN) Ion Channels, in: *The Journal of Physical Chemistry. B*, 120, S. 10936–10950.
- Vemana, S.; Pandey, S.; Larsson, H. P. (2004): S4 movement in a mammalian HCN channel, in: *The Journal of General Physiology*, 123, S. 21–32.

- Vemana, S.; Pandey, S.; Larsson, H. P. (2008): Intracellular Mg²⁺ is a voltage-dependent pore blocker of HCN channels, in: *American Journal of Physiology. Cell physiology*, 295, S. C557-C565.
- Villalba-Galea, C. A. (2012): New insights in the activity of voltage sensitive phosphatases, in: *Cellular signalling*, 24, S. 1541–1547.
- Villalba-Galea, C. A.; Sandtner, W.; Starace, D. M.; Bezanilla, F. (2008): S4-based voltage sensors have three major conformations, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, S. 17600–17607.
- Wahl-Schott, C.; Biel, M. (2009): HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function, in: *Cellular and molecular life sciences*, 66, S. 470–494.
- Wainger, B. J.; DeGennaro, M.; Santoro, B.; Siegelbaum, S. A.; Tibbs, G. R. (2001): Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels, in: *Nature*, 411, S. 805–810.
- Weber, W. (1999a): Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes – state of the art, in: *Biochimica et biophysica acta*, 1421, S. 213–233.
- Weber, W. M. (1999b): Endogenous ion channels in oocytes of *xenopus laevis*: recent developments, in: *The Journal of Membrane Biology*, 170, S. 1–12.
- Wemhöner, K.; Silbernagel, N.; Marzian, S.; Netter, M. F.; Rinné, S.; Stansfeld, P. J.; Decher, N. (2012): A leucine zipper motif essential for gating of hyperpolarization-activated channels, in: *The Journal of Biological Chemistry*, 287, S. 40150–40160.
- Wimmers, S.; Wulfsen, I.; Bauer, C. K.; Schwarz, J. R. (2001): Erg1, erg2 and erg3 K channel subunits are able to form heteromultimers, in: *Pflügers Archiv*, 441, S. 450–455.
- Wobig, L.; Wolfenstetter, T.; Fechner, S.; Bönigk, W.; Körschen, H. G.; Jikeli, J. F.; Trötschel, C.; Feederle, R.; Kaupp, U. B.; Seifert, R.; Berger, T. K. (2020): A family of hyperpolarization-activated channels selective for protons, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences*
- Wolfenstetter, T. (2020): Characterization of the Hyperpolarization-Activated Proton Channel HCNL1, Köln.
- Wu, S.; Gao, W.; Xie, C.; Xu, X.; Vorvis, C.; Marni, F.; Hackett, A. R.; Liu, Q.; Zhou, L.; [Nachname nicht vorhanden] (2012): Inner activation gate in S6 contributes to the state-dependent binding of cAMP in full-length HCN2 channel, in: *J. Gen. Physiol.*, 140, S. 29–39.
- Xu, X.; Marni, F.; Wu, S.; Su, Z.; Musayev, F.; Shrestha, S.; Xie, C.; Gao, W.; Liu, Q.; Zhou, L. (2012): Local and global interpretations of a disease-causing mutation near the ligand entry path in hyperpolarization-activated cAMP-gated channel, in: *Structure (London, England : 1993)*, 20, S. 2116–2123.
- Xue, T.; Marban, E.; Li, R. A. (2002): Dominant-negative suppression of HCN1- and HCN2-encoded pacemaker currents by an engineered HCN1 construct: insights into structure-function relationships and multimerization, in: *Circulation research*, 90, S. 1267–1273.
- Yifrach, O.; MacKinnon, R. (2002): Energetics of Pore Opening in a Voltage-Gated K⁺ Channel, in: *Cell*, 111, S. 231–239.
- Young, G. T.; Emery, E. C.; Mooney, E. R.; Tsantoulas, C.; McNaughton, P. A. (2014): Inflammatory and neuropathic pain are rapidly suppressed by peripheral block of hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated ion channels, in: *Pain*, 155, S. 1708–1719.
- Yu, F. H.; Catterall, W. A. (2004): The VGL-kanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis, in: *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*, 2004, S. re15.
- Yu, X.; Duan, K.-L.; Shang, C.-F.; Yu, H.-G.; Zhou, Z. (2004): Calcium influx through hyperpolarization-activated cation channels (I(h) channels) contributes to activity-evoked neuronal secretion, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, S. 1051–1056.
- Zagotta, W. N.; Hoshi, T.; Aldrich, R. W. (1994a): Shaker potassium channel gating. III – Evaluation of kinetic models for activation, in: *The Journal of General Physiology*, 103, S. 321–362.
- Zagotta, W. N.; Hoshi, T.; Dittman, J.; Aldrich, R. W. (1994b): Shaker potassium channel gating. II – Transitions in the activation pathway, in: *The Journal of General Physiology*, 103, S. 279–319.
- Zagotta, W. N.; Olivier, N. B.; Black, K. D.; Young, E. C.; Olson, R.; Gouaux, E. (2003): Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels, in: *Nature*, 425, S. 200–205.
- Zheng, J.; Zagotta, W. N. (2003): Patch-clamp fluorometry recording of conformational rearrangements of ion channels, in: *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*, 2003, S. PL7.

- Zhou, L.; Siegelbaum, S. A. (2007): Gating of HCN channels by cyclic nucleotides – residue contacts that underlie ligand binding, selectivity, and efficacy, in: *Structure*, 15, S. 655–670.
- Zolles, G.; Klöcker, N.; Wenzel, D.; Weisser-Thomas, J.; Fleischmann, B. K.; Roeper, J.; Fakler, B. (2006): Pacemaking by HCN channels requires interaction with phosphoinositides, in: *Neuron*, 52, S. 1027–1036.

9. Anhang

I. Die Cut-Open-Voltage-Clamp-Technik

Da Gating-Ströme spannungsabhängiger Kanäle oft sehr klein sind, ist zur Messung dieser Ströme eine Ganzzell-Technik notwendig, weil die entsprechende Kanalanzahl bei Patch-Clamp-Messungen nicht erreicht werden kann. Aufgrund ihrer Geschwindigkeit im Bereich von 1 bis 2 ms waren die Gating-Ströme des Shaker-Kanals jedoch nicht mithilfe der zu langsamen Zwei-Elektroden-Technik (TEVC) messbar, weshalb in den frühen 1990er-Jahren die Cut-Open-Vaseline-Gap-Voltage-Clamp-Technologie (Tagliatela et al., 1992) entwickelt wurde.

Das Besondere an der Cut-Open-Technik besteht in der Unterteilung der Oozyte in drei verschiedene, durch eine Vaseline-Mischung sowie verschiedene „Pools“ elektrisch isolierte Kompartimente (vgl. Abbildung 53). In den *Top Pool* ragen dabei drei Agar-Brücken, von denen eine mit dem negativen Eingang von Spannungsfolger **1** und eine weitere mit dessen Feedback-Widerstand verbunden wird. Der positive Eingang des Spannungsfolgers wird durch den Kommandopuls V_{com} belegt. Durch den Differenzverstärker **2** wird der Membranstrom I_m als Spannungsabfall über den Feedback-Widerstand gemessen und als zentrale Messgröße ausgegeben.

Mithilfe der Spannungsfolger **1** und **3** werden *Guard* und *Top Pool* auf das gleiche elektrische Kommando-Potential V_{com} geklemmt, wodurch der *Guard Pool* als Isolator zwischen *Top* und *Bottom Pool* wirkt. Zur Vermeidung von Elektroden-Polarisations-Artefakten wird Spannungsfolger **3** mit den beiden *Guard Pool*-Agar-Brücken aufgebaut.

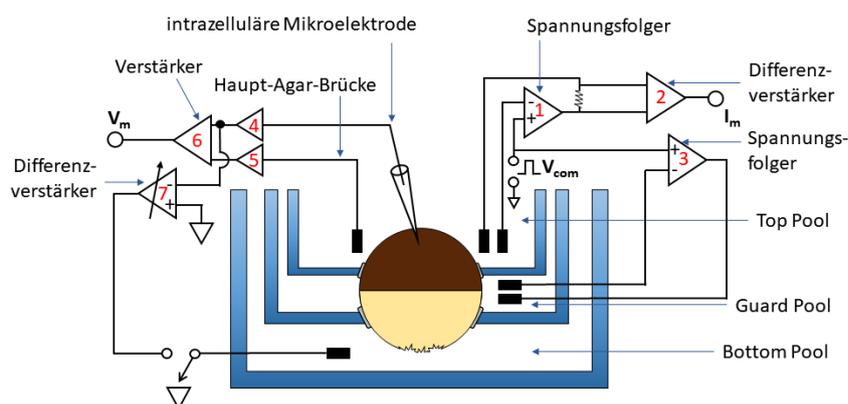


Abbildung 53: Schematischer Aufbau der Cut-Open-Messzelle, Abbildung von Jana Kusch nach (Tagliatela et al., 1992).

Am unteren Rand der Oozyte wird die Membran durch Applikation des Detergens Saponin geöffnet, sodass das Innere der Oozyte mit dem *Bottom Pool* als elektrisch identisch angenommen werden kann, jedoch noch eine im Wesentlichen der Zellmembran zuzuschreibende Kapazität auftritt. Zur schnellen Erdung des Intrazellulär-Raums und Minimierung des Serienwiderstandes wird Mikroelektrode **4** genutzt, die das intrazelluläre

Potential direkt an der Membran misst und an den negativen Eingang des Differenzverstärkers **7** angeschlossen wird, dessen positiver Eingang geerdet ist. Der Ausgang dieses Verstärkers wird dann über eine Agar-Brücke mit dem *Bottom Pool* verknüpft, sodass das elektrische Potential innerhalb der Oozyte und im *Bottom Pool* auf eine virtuelle Masse geklemmt sind und die Größe der kapazitiven Stromspitze bei einem Spannungssprung deutlich verringert bzw. beschleunigt wird. Mithilfe des Verstärkers **6** wird schließlich das Membranpotential als Potentialdifferenz zwischen der intrazellulären Mikroelektrode **4** und der dritten in den *Top Pool* ragenden Haupt-Agar-Brücke **5** gemessen und als Kontrollgröße V_m ausgegeben.

Die Messung von Ionen- bzw. Gating-Strömen verläuft, indem durch den *Top Pool* eine Kommandospannung V_{com} zwischen *Top Pool* und Masse angelegt wird, der Ionenkanal darauf reagiert und der resultierende Strom das elektrische Potential im *Top Pool* verändert. Um dieses Potential wieder auf das des *Guard Pools* zu klemmen, induziert der Spannungsfolger **1** einen Strom, welcher dann am Differenzverstärker **2** verstärkt und ausgegeben wird. Die beiden Spannungsklemmen befinden sich zwischen *Top* und *Guard Pool* bzw. zwischen *Bottom Pool* und der Mikroelektrode **4**. Durch die mit dem negativen Eingang von Spannungsfolger **1** verbundene Agar-Brücke ist außerdem eine weitergehende elektronische Leck- und Kapazitätskompensation möglich.

Durch diesen Aufbau sind das Signal-Rausch-Verhältnis mit Werten von 10.000:1 bis 15.000:1 sowie die Kapazitätskompensation mit Halbwertsbreiten von bis zu 0,4 ms bzw. Zeitkonstanten von 0,2 ms im Vergleich zur 2-Elektroden-Messung (7.000:1 bis 10.000:1 bzw. 2 ms Halbwertsbreite und 1 ms Zeitkonstante) deutlich verbessert. Ein kritischer Punkt bzgl. der Messqualität ist dabei die Einstichtiefe der Mikroelektrode: Je näher sie sich an der Oberfläche befindet, umso schneller ist die entsprechende Klemme, wobei sich außerdem der Anteil des unspezifischen Leckstroms reduziert.

In der ursprünglichen Veröffentlichung von Tagliatela et al. (1992) ist außerdem die Verwendung einer Kanüle beschrieben, die in das Innere der Oozyte ragt, mit der das Zytosol gegen eine definierte Lösung, z. B. eine K^+ -freie Lösung ausgetauscht werden kann, um dann Gating-Ströme ohne störenden K^+ -Ausstrom zu messen (Tagliatela et al., 1992; Perozo et al., 1992). Somit wäre es im Optimalfall möglich, die intrazelluläre cAMP-Konzentration zu kontrollieren und damit die Wirkung von cAMP auf den Gating-Prozess zu untersuchen.

II. Einfluss eines möglichen Leckstroms auf das Umkehrpotential

Das Umkehrpotential einer Zelle gibt an, bei welcher Spannung kein Nettostrom über die Membran der Zelle fließt. Bei der Charakterisierung von Ionenkanälen, durch die permeable Ionen die Membran passieren können, spielt es daher – wenn auch abhängig von den applizierten extra- bzw. intrazellulären Lösungen – eine wichtige Rolle.

Allerdings kann das Auftreten eines Leckstroms die Bestimmung des Umkehrpotentials verfälschen und müsste daher immer berücksichtigt werden. Bei einer elektrophysiologischen Messung soll der Großteil des Stroms durch ionenselektive Kanäle fließen, die durch einen Widerstand R_{Kanal} beschrieben werden können. Daneben tritt aber auch ein ionenunselektiver Leckstrom mit einem Widerstand R_{Leck} auf (Abbildung 54). Die am Verstärker gemessene Spannung ergibt sich dann durch die Parallelschaltung der beiden Widerstände zu:

$$V_{gem} = R_{Leck} \cdot I_{Leck} \Leftrightarrow V_{gem} = V_{Rev} + R_{Kanal} \cdot I_{Kanal} \quad (20)$$

Nur der Widerstand R_{Kanal} ist dabei als spannungsabhängig anzunehmen.

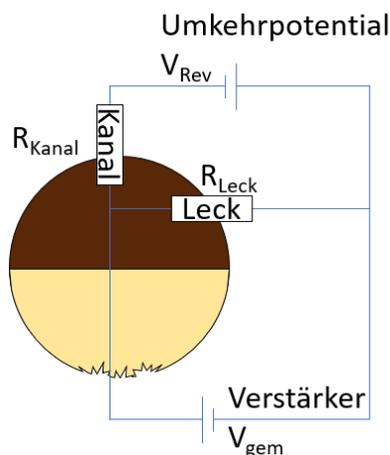


Abbildung 54: Schaltkreis einer offenen Oozyte mit den Leck- und Kanal-Widerständen R_{Leck} und R_{Kanal} sowie dem ionenabhängigen Umkehrpotential V_{Rev} . V_{gem} beschreibt die vom Verstärker applizierte Spannung.

Der im gesamten Messsystem fließende Strom ergibt sich unter Berücksichtigung von

$$I_{ges} = I_{Kanal} + I_{Leck} \quad (21)$$

zu:

$$I = \frac{V_{Leck}}{R_{Leck}} + \frac{V_{gem} - V_{Rev}}{R_{Kanal}} \Leftrightarrow I = \frac{R_{Leck} + R_{Kanal}}{R_{Leck} \cdot R_{Kanal}} \cdot V_{gem} - \frac{V_{Rev}}{R_{Kanal}} \quad (22)$$

Unter Verwendung der Leitfähigkeit G , also des Kehrwertes des Widerstandes R , ergibt sich der Strom zu:

$$I = G_{Leck} \cdot V_{gem} + G_{Kanal} \cdot V_{gem} - G_{Kanal} \cdot V_{Rev} \quad (23)$$

$$\Leftrightarrow I = (G_{Leck} + G_{Kanal}) \cdot V_{gem} - G_{Kanal} \cdot V_{Rev}$$

Dies bedeutet, dass der real am Verstärker gemessene Strom demnach auch von der Größe der Leck-Leitfähigkeit und nicht nur von der Kanal-Leitfähigkeit abhängt.

Am Umkehrpotential gilt $I := 0$, woraus sich für die am Verstärker gemessene Spannung ergibt:

$$V_{gem} = \frac{G_{Kanal} \cdot V_{Rev}}{G_{Leck} + G_{Kanal}} = V_{Rev} \cdot \frac{1}{\frac{G_{Leck}}{G_{Kanal}} + 1} \quad (24)$$

Für das Umkehrpotential gilt daher, dass es um das Verhältnis der Leitfähigkeiten von Leckstrom und Kanal verfälscht wird:

$$\frac{V_{Rev}}{V_{gem}} = \frac{G_{Leck}}{G_{Kanal}} + 1 \Leftrightarrow V_{Rev} = V_{gem} \cdot \frac{G_{Leck}}{G_{Kanal}} + V_{gem} \quad (25)$$

Dies bedeutet, dass das als Spannung, bei der der Strom Null ist, bestimmte Umkehrpotential nicht das „wahre“ Umkehrpotential ist, sondern durch den unspezifischen Leckstrom beeinflusst wird. Dieser Leckstrom wird bei der Patch-Clamp-Technik durch das Erreichen eines sogenannten Gigaseals mit einer Leitfähigkeit im pS-Bereich vernachlässigbar klein sein.

Im Gegensatz dazu wird bei der Cut-Open-Technik die Zellmembran durch das Einstechen mit der Mikroelektrode verletzt, wodurch ein größerer Leckstrom begünstigt wird und das Umkehrpotential entsprechend verfälscht wird. Insbesondere die mutmaßlich endogenen Chlorid-Kanäle können dabei aufgrund des langsamen Schließens zu einem zusätzlichen Instantanstrom führen, der kaum von einem mechanisch induzierten Leckstrom zu unterscheiden ist.

III. Globale Modellierung

Das dreikomponentige Verhalten der Mutanten G402S und G404S wurde gemäß folgenden Modells global modelliert:



Der Parameter C steht für das Maß der Inaktivierung, die Zeitkonstante τ_2 für die Geschwindigkeit der Inaktivierung. Die Zeitkonstanten τ_1 und τ_3 sowie die Kooperativitätskoeffizienten H_1 und H_2 beschreiben die beiden Aktivierungskomponenten.

Dieses Modell lässt sich mithilfe der folgenden Gleichung (26) herleiten. Dabei wird der HCN-artige Stromanteil sowohl durch die Komponente A für den inaktivierenden Anteil als auch durch die Komponente γ für den nicht-inaktivierenden Anteil beschrieben, um eine unvollständige Inaktivierung berücksichtigen zu können. Die Komponente B beschreibt den Anteil der mutmaßlichen endogenen Ströme.

$$\begin{aligned} I(t) = A \cdot \left(\left(1 - \left(e^{\left(\frac{-(t-t_0)}{\tau_1} \right)} \right) \right)^{H_1} \cdot e^{\left(\frac{-(t-t_0)}{\tau_2} \right)} \right) + \gamma \cdot \left(1 - \left(e^{\left(\frac{-(t-t_0)}{\tau_1} \right)} \right) \right)^{H_1} \\ + B \cdot \left(1 - \left(e^{\left(\frac{-(t-t_0)}{\tau_3} \right)} \right) \right)^{H_2} \end{aligned} \quad (26)$$

Die Parameter A und γ sind dabei nicht unabhängig voneinander bestimmbar. Daher muss zur Modellierung der Anteil der Inaktivierung als Parameter C definiert werden.

$$C = \frac{A}{A + \gamma} \quad (27)$$

Durch Umstellungen lässt sich der Parameter γ mit dem Stromanteil A und dem Maß der Inaktivierung C wie folgt beschreiben:

$$\gamma = \frac{A}{C} - A \quad (28)$$

Somit ist es möglich, beide HCN-artige Stromanteile adäquat zu bestimmen, da die jeweilige Inaktivierung über den Parameter C, der zwischen verschiedenen Aktivierungszeiten konstant gehalten werden kann, korrekt berücksichtigt wird. Somit ergibt sich für die globale Modellierung folgende Formel:

$$\begin{aligned} I(t) = A \cdot \left(1 - \left(e^{\left(\frac{-(t-t_0)}{\tau_1} \right)} \right) \right)^{H_1} \cdot e^{\left(\frac{-(t-t_0)}{\tau_2} \right)} + \left(\frac{A}{C} - A \right) \cdot \left(1 - \left(e^{\left(\frac{-(t-t_0)}{\tau_1} \right)} \right) \right)^{H_1} \\ + B \cdot \left(1 - \left(e^{\left(\frac{-(t-t_0)}{\tau_3} \right)} \right) \right)^{H_2} \end{aligned} \quad (29)$$

Zur Verdeutlichung der Zusammensetzung des HCN-artigen Stromanteils aus einer inaktivierenden und einer nicht-inaktivierenden Komponente kann die Formel unter Einführung der Variable D wie folgt abgewandelt werden:

$$\text{HCN-Strom} = A + \gamma = A + \left(\frac{A}{C} - A\right) = \frac{A}{C} = D \Leftrightarrow A = C \cdot D \quad (30)$$

$$\text{HCN-Strom} = C \cdot D + (D - C \cdot D) = C \cdot D + (1 - C) \cdot D \quad (31)$$

Somit beschreibt D den gemessenen HCN-artigen Strom, wobei der inaktivierende Anteil dem Parameter C und der nicht-inaktivierende Anteil dem Term (1-C) entspricht.

Für die Implementierung der globalen Modellierung in IGOR Pro wurde Gleichung (29) verwendet.

Danksagung

Prof. Dr. Klaus Benndorf möchte ich dafür danken, dass ich bei ihm meine Forschung im Bereich der Physiologie beginnen konnte und er mich bei der Bearbeitung dieses sehr interessanten Themas betreut hat.

Ein großer Dank geht außerdem an Dr. Ralf Schmauder, der mir über die Jahre immer wieder engagiert zur Seite stand, sich für die Korrekturen auf die Ferne die Nächte um die Ohren geschlagen hat und mich mit seinen vielen Ideen und Gedanken verwirrt und inspiriert hat.

Außerdem möchte ich Dr. Susanne Thon für die Betreuung gerade in der Anfangsphase und den guten Einstieg in die Arbeitsgruppe danken. An Dr. Jana Kusch geht mein Dank für viele anregende Diskussionen und die verlässliche Unterstützung bei allen erdenklichen Problemen.

Prof. Dr. Thomas Zimmer und Dr. Tina Schwabe sowie Karin Schoknecht, Sandra Bernhard, Andrea Kolchmeier und Claudia Ranke danke ich für die molekularbiologischen Arbeiten und die tolle technische Unterstützung. Außerdem möchte ich Prof. Dr. Christoph Biskup für die Möglichkeit danken, das LSM510 für die fluoreszenzmikroskopischen Messungen verwenden zu können.

Bei Abhi, Mallik, Taulant, Mahesh und Maik möchte ich mich für die gemeinsame Promotionszeit bedanken, in der man bei euch immer ein offenes Ohr finden konnte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Johanna, die mich durch alle Höhen und Tiefen während der Anfertigung dieser Arbeit begleitet hat und mir immer tatkräftig zur Seite stand.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Prof. Dr. Klaus Benndorf
- Dr. Ralf Schmauder
- Dr. Susanne Thon
- Dr. Jana Kusch

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Marburg, den 17. Juli 2021

Unterschrift