

DER EINFLUSS VON cGMP-ANALOGA AUF DAS SCHALTVERHALTEN
VON HCN-KANÄLEN IM RAHMEN EINER POTENZIELLEN
RETINITIS PIGMENTOSA-THERAPIE

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

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

von Laura Karwehl

geboren am 26.08.1996 in Rudolstadt

Gutachter

1. Prof. Dr. Klaus Benndorf, Jena
2. Prof. Dr. Stefan Schulz, Jena
3. Prof. Dr. Christian Wahl-Schott, Hannover

Datum der Verteidigung: 20.07.2021

Datum des Staatsexamens: 13.12.2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
Zusammenfassung	1
1 Einleitung	2
1.1 Retina	2
1.1.1 Aufbau der Retina.....	2
1.1.2 Phototransduktion.....	5
1.2 Zyklisches Guanosin-Monophosphat	7
1.3 Retinitis pigmentosa	10
1.3.1 Verlauf und Symptome von <i>Retinitis pigmentosa</i>	10
1.3.2 Genetische Ursachen von <i>Retinitis pigmentosa</i>	11
1.3.3 Therapiemöglichkeiten von <i>Retinitis pigmentosa</i>	13
1.3.3.1 cGMP-unabhängige Behandlungsmethoden.....	13
1.3.3.2 cGMP-abhängige Behandlungsmethoden.....	15
1.3.3.2.1 cGMPS-Derivate als PKG-Inhibitoren	15
1.3.3.2.2 cGMPS-Derivate als Agonisten/Antagonisten für CNG-Kanäle.....	17
1.3.3.2.3 HCN-Kanäle in der Retina und als Target von cGMPS-Derivaten	18
1.4 HCN-Kanäle	20
1.4.1 Struktur der HCN-Kanäle	20
1.4.2 Schaltverhalten der HCN-Kanäle	23
1.4.3 Vorkommen der HCN-Kanäle.....	25
2 Ziele der Arbeit.....	27
3 Methodik	29
3.1 RNA-Herstellung.....	29
3.2 Oozytenpräparation.....	29
3.3 Patch-Clamp-Methode.....	30
3.3.1 Patch-Clamp-Messstand	30
3.3.2 Patch-Clamp-Messung.....	31
3.3.3 Messprotokoll	33
3.4 Datenanalyse.....	34
4 Ergebnisse	37
4.1 Wirkung von cGMP auf HCN-Kanäle.....	37
4.1.1. Wirkung von cGMP auf den HCN1-Kanal	37

4.1.2. Wirkung von cGMP auf den HCN2-Kanal	38
4.2 Wirkung der Rp-cGMPS-Derivate.....	43
4.2.1 Wirkung von Rp-8-pCPT-cGMPS	43
4.2.2 Wirkung von Rp-8-Br-PET-cGMPS	45
4.2.3 Wirkung von Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS und Rp-(2-N)ET-cGMPS	50
5 Diskussion.....	55
5.1 cGMP als Ligand des HCN-Kanals	55
5.2 Auswahl der Analoga.....	58
5.3 Rp-8-pCPT-cGMPS als Agonist des HCN-Kanals	60
5.4 Rp-8-Br-PET-cGMPS als der vielversprechendste Ligand	61
5.5 Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS und Rp-(2-N)ET-cGMPS als partielle Agonisten.....	64
5.6 Mögliche unerwünschte Wirkungen	67
6 Schlussfolgerungen	72
Literaturverzeichnis	V
Anhang.....	XI
Abbildungsverzeichnis.....	XI
Tabellenverzeichnis.....	XII
Schemataverzeichnis	XII
Lebenslauf.....	XIII
Ehrenwörtliche Erklärung	XIV
Danksagung	XV

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ANP	<i>Atrial natriuretic peptide</i> (dt. atriales natriuretisches Peptid)
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i> (dt. vom Gehirn stammender neurotropher Faktor)
BNP	<i>B-type natriuretic peptide</i>
<i>c</i>	Konzentration
cAMP	<i>3',5'-cyclic adenosine monophosphate</i> (dt. zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat)
cDNA	complementary Deoxyribonucleic acid (dt. komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
cGMP	<i>3',5'-cyclic guanosine monophosphate</i> (dt. zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat)
CNBD	<i>Cyclic nucleotide-binding domain</i> (dt. zyklische Nukleotide bindende Domäne)
CNG	<i>Cyclic nucleotide-gated</i> (dt. durch zyklische Nukleotide aktiviert)
CNGC	<i>Cyclic nucleotide-gated channel</i> (dt. durch zyklische Nukleotide aktivierter Kanal)
CNGA1:B1a	CNG-Kanal der Stäbchen
CNGA3:B3	CNG-Kanal der Zapfen
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
cRNA	<i>complementary Ribonucleic acid</i> (dt. komplementäre Ribonukleinsäure)
DHA	Docosahexaensäure
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (dt. Desoxyribonukleinsäure)
EC_{50}	Konzentration bei halbmaximalem Effekt
g	Gramm
GCAP	<i>Guanylate cyclase-activating protein</i> (dt. Guanylatzyklase-aktivierendes Protein)
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GYG	Glycin-Tyrosin-Glycin
<i>H</i>	Hill-Koeffizient

HCN	<i>Hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-modulated</i> (dt. durch Hyperpolarisation aktiviert und durch zyklische Nukleotide moduliert)
H ₂ O	Wasser
Hz	Hertz
<i>I</i>	Stromamplitude
<i>I_h</i>	durch Hyperpolarisation aktivierter Strom
<i>I_{max}</i>	maximaler Strom bei sättigender cGMP-Konzentration
l	Liter
M	Molar
mHCN2	HCN2 der Maus
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
m	Meter
OR-2	Oozyten-Ringer-2
PDE	<i>phosphodiesterase</i> (dt. 3',5'-Zyklonukleotid-Phosphodiesterase)
PKG	Proteinkinase G
PTFE	Polytetrafluorethylen
retGC	<i>Retinal guanylate cyclase</i> (dt. retinale Guanylatzyklase)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP	<i>Retinitis pigmentosa</i>
RPE	<i>Retinal pigment epithelium</i> (dt. retinales Pigmentepithel)
S	Segment
s	Sekunde
<i>t_{1/2}</i>	halbmaximale Aktivierungszeit
<i>V</i>	Spannung
<i>V_{1/2}</i>	Spannung der halbmaximalen Aktivierung
V	Volt
Ω	Ohm
°C	Grad Celsius
<i>zδ</i>	Maß für den Anstieg der Kurve und die Kooperativität der Kanal-Untereinheiten = effektive Gatingladung

Zusammenfassung

Retinitis pigmentosa beschreibt eine Netzhautdegeneration mit multiplen zugrundeliegenden Genmutationen. Sie manifestiert sich zeitlich und symptomatisch sehr variabel und kann bis zum vollständigen Sehverlust der Betroffenen führen (Hartong et al. 2006).

Als ursächlich für den Untergang der Photorezeptoren in der Retina wird eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von zyklischem Guanosin-Monophosphat (cGMP) beschrieben, die eine gesteigerte Aktivierung der cGMP-Target-Proteine wie der Proteinkinase G (PKG) und der CNG-Kanäle bewirkt (Lolley et al. 1977). Als ein Therapieansatz der *Retinitis pigmentosa* erfolgte deshalb die Entwicklung von cGMP-Derivaten, die als Inhibitoren der Target-Proteine dienen sollen.

Die Ergebnisse der bereits durchgeführten Untersuchungen in Tiermodellen und Zellkulturen zeigten eine erfolgreiche Verzögerung der Photorezeptordegeneration (Vighi et al. 2018). Welches Target-Protein für diese Wirkung jedoch verantwortlich war, ist in Diskussion. Neben den vorrangig erforschten CNG-Kanälen und der Proteinkinase G kommt ein weiteres Protein mit einer Bindungsstelle für zyklische Nukleotide hauptsächlich in den Photorezeptor- und Bipolarzellen der Retina vor: der durch Hyperpolarisation aktivierte und durch zyklische Nukleotide modulierte (HCN) Kanal. Sein protektiver Effekt auf die dysfunktionalen Photorezeptoren wurde bereits nachgewiesen. Die Inhibition des HCN-Kanals führte bei Mausmodellen zu einem schnelleren Fortschreiten des Krankheitsverlaufs (Schon et al. 2016). Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, ausgewählte cGMP-Derivate auch auf ihre Wirkung auf den HCN-Kanal zu untersuchen.

Mittels Patch-Clamp-Methode wurde bei Zufuhr fünf unterschiedlicher cGMP-Analoga die Aktivierung der HCN-Kanäle an *Inside-out*-Makropatches getestet. Somit konnten die cGMP-Derivate auf ihren Einfluss auf den HCN-Kanal elektrophysiologisch charakterisiert und der Einfluss der verschiedenen cGMP-Modifikationen untersucht werden. Dabei sollten besonders HCN-Kanal-Agonisten identifiziert werden, die nicht die wichtige Funktion des Kanals für das Überleben der Photorezeptoren beeinträchtigen würden.

Rp-8-Br-PET-cGMPS und Rp-8-pCPT-cGMPS stellten sich als Agonisten, Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS und Rp-(2-N)ET-cGMPS als partielle Agonisten des HCN2-Kanals heraus. Da Rp-8-Br-PET-cGMPS bereits als der vielversprechendste Ligand beschrieben wurde, scheint dieser auch mit seiner in dieser Arbeit identifizierten agonistischen Wirkung auf den HCN-Kanal für die Therapie der *Retinitis pigmentosa* in Betracht gezogen werden zu können.

1 Einleitung

1.1 Retina

1.1.1 Aufbau der Retina

In der Embryonalentwicklung entstehen die Retinae der beiden Augen aus zwei Ausstülpungen des Zwischenhirns. Aus diesen sogenannten Augenbläschen bilden sich im Verlauf die Augenbecher, so dass zwei nah aneinander liegende, an den Apices jedoch verbundene Blätter resultieren. Das äußere Retinablatt wird von einem einschichtigen, kubischen Epithel gebildet, dem retinalen Pigmentepithel (RPE). Diese Zellen stehen über Mikrovilli mit den Außensegmenten der Photorezeptorzellen in Verbindung, um deren Versorgung mit Nährstoffen wie Glucose und Fettsäuren und den Abtransport von anfallenden metabolischen Endprodukten, Ionen und Wasser zu gewährleisten. Die Zellen des RPE sind untereinander über *Tight Junctions* verbunden und tragen demnach außerdem einen Großteil zur Blut-Retina-Schranke bei (Strauss 2005).

Das Pigmentepithel stellt die erste der insgesamt zehn Schichten der anatomisch sehr eindeutig geschichteten Retina dar. Die im Folgenden beschriebenen Strata zwei bis zehn gehören zum inneren Blatt der Retina, dem Stratum nervosum.

Unmittelbar angrenzend an das RPE befinden sich die Photorezeptorzellen, die sich nochmals in zwei verschiedene Typen unterscheiden lassen. Die sogenannten Stäbchen und Zapfen wandeln die einfallenden Lichtreize in chemische Signale um. Dieser Prozess wird auch als Phototransduktion bezeichnet. Somit stellen diese Zellen einen essentiellen Bestandteil für den Sehvorgang dar.

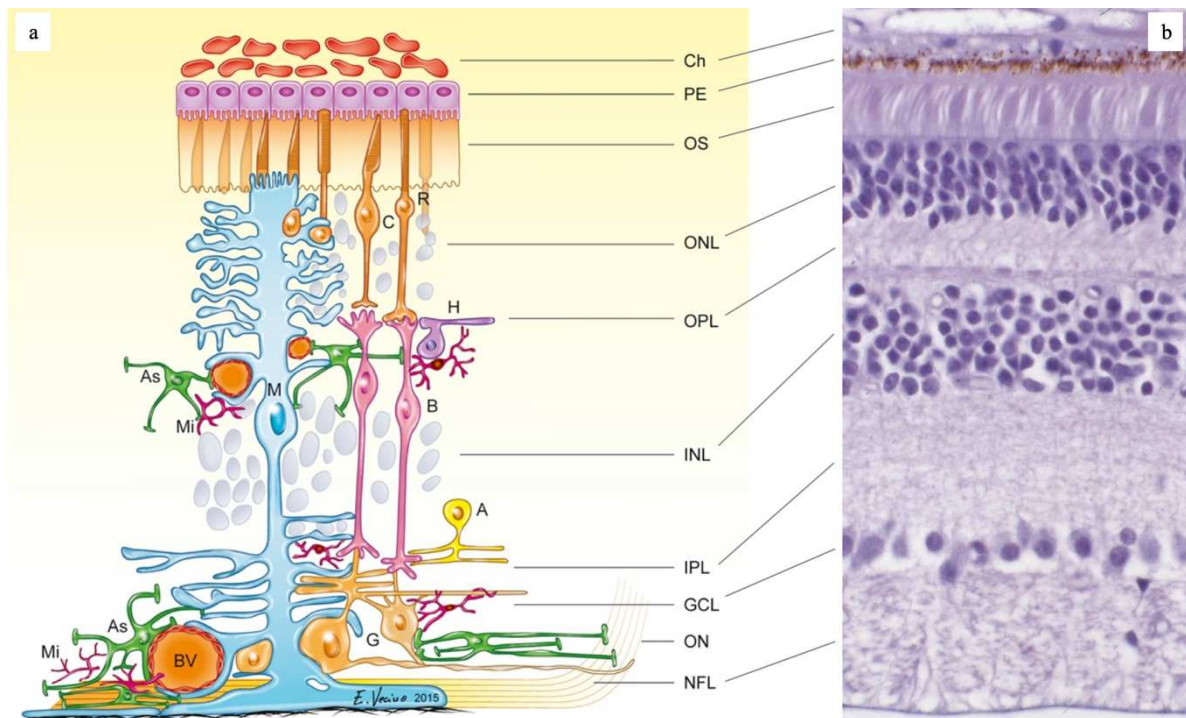


Abbildung 1. Schematische Grafik der zellulären Komponenten (a) und histologischer Querschnitt (b) der Retina.

Ch = choroid, dt. Choroidea; PE = pigment epithelium, dt. Pigmentepithel; OS = outer segment layer, dt. Außensegmentschicht; ONL = outer nuclear layer, dt. äußere Körnerschicht; OPL = outer plexiform layer, dt. äußere plexiforme Schicht; INL = inner nuclear layer, dt. innere Körnerschicht; IPL = inner plexiform layer, dt. innere plexiforme Schicht; GCL = ganglion cell layer, dt. Ganglionzellschicht; ON = optic nerve, dt. optischer Nerv; NFL = nerve fibre layer, dt. Nervenfaserschicht; BV = blood vessel, dt. Blutgefäß; A = amacrine cell, dt. Amakrine Zelle; AS = astrocyte, dt. Astrozyt; B = bipolar cell, dt. Bipolarzelle; G = ganglion cell, dt. Ganglionzelle; H = horizontal cell, dt. Horizontalzelle; M = Müller cell, dt. Müllerzelle; Mi = microglia, dt. Mikroglia; R = rod, dt. Stäbchen; C = cone, dt. Zapfen.

a) (Vecino et al. 2016), b) (Lüllmann-Rauch und Asan 2019)

Die beiden Photorezeptorarten folgen einem gleichen Grundaufbau. Sie besitzen einen lichtempfindlichen Fortsatz, bestehend aus einem Perikaryon und einem kurzen Axon. Der lichtrezeptive Fortsatz grenzt an das Pigmentepithel und kann noch einmal in Außen- und Innensegment unterteilt werden, welche durch ein Zilium miteinander verbunden sind. Das Außensegment der Stäbchen enthält viele intrazelluläre Membranstapel, die Discs, die vollständig von der Plasmamembran getrennt sind. Sie werden ständig vom Grund regeneriert und wandern zur Spitze des Außensegments, wo sie vom Pigmentepithel phagozytiert werden. In den Discs ist das Sehpigment der Stäbchen, das Rhodopsin, gespeichert. Dieses besteht aus einem an Opsin gebundenen Retinal. Dieses Sehpigment ist für die Absorption des Lichts verantwortlich. Dabei liegt das Absorptionsmaximum der Stäbchen bei 500 nm. Grundsätzlich ist die Aufgabe der ca. 120 Millionen Stäbchen der Retina das skotopische Sehen, also das Dämmerungs- und Nachtsehen. Ihre Lichtempfindlichkeit ist sehr hoch und Helligkeitsunterschiede können sehr gut wahrgenommen werden. Allerdings können Stäbchen keine Farben unterscheiden und haben durch die hohe Konvergenz der Verschaltung eine

niedrige räumliche Auflösung. Zu finden sind diese Zellen in der Retina vor allem im parafovealen Bereich, wobei die Dichte zur Peripherie hin abnimmt.

Die ca. 6 Millionen Zapfen sind dagegen vor allem in der Fovea centralis, dem Ort des schärfsten Sehens, lokalisiert. An diesem Ort sind die übrigen acht Schichten, durch die das Licht an jeder anderen Stelle der Retina erst hindurchtreten muss, um die Photorezeptorzellen erreichen zu können, verschoben. Somit wird das Licht weniger gestreut und kann direkt zu den Zellen gelangen. Dies stellt einen Vorteil für die Zapfen dar, die für das Scharfsehen, das photopische Sehen (Tagessehen) und das Farbsehen verantwortlich sind. Die Zapfen können wiederum in drei verschiedene Typen unterteilt werden. Dabei lassen sich die Blau-Zapfen, deren Absorptionsmaximum bei 420 nm, die Grün-Zapfen, deren Absorptionsmaximum bei 535 nm, und die Rot-Zapfen, deren Absorptionsmaximum bei 570 nm liegt, unterscheiden. Jede Zapfenart besitzt ein für sich spezifisches Opsin. Dieses befindet sich im Gegensatz zu den Stäbchen in der stapelförmig gefalteten Plasmamembran der Zellen.

Das Innensegment der Photorezeptorzellen ist für den Metabolismus der Zelle verantwortlich, in dem es Mitochondrien, Golgi-Apparat und endoplasmatisches Retikulum enthält. Daran angrenzend folgt der Zellkörper mit dem Zellkern, der sich bereits in der äußeren nukleären Schicht der Retina befindet, und endet über das Axon mit dem synaptischen Endfuß in der äußeren plexiformen Schicht. Hier werden die Informationen des eingehenden Lichtreizes an das zweite Neuron synaptisch übertragen. Der verwendete Transmitter ist hierbei Glutamat.

Das zweite Neuron im Übertragungsweg wird auch bipolare Nervenzelle genannt, wobei auch hier zwischen Zapfen- und Stäbchen-Bipolarzelle unterschieden werden muss. Bei den Zapfen werden diese noch einmal in OFF- und ON-Bipolarzellen unterteilt. In Dunkelheit kommt es zur Freisetzung des oben genannten Transmitters Glutamat aus den Zapfen, welcher wiederum auf die OFF-Bipolarzellen depolarisierend wirkt. Die ON-Bipolarzellen reagieren hingegen mit ihrem sich unterscheidenden Glutamat-Rezeptor bei Belichtung auf eine resultierende geringe Konzentration von Glutamat und werden dagegen durch viel Transmitter während einer Dunkelphase gehemmt. Die Stäbchen-Bipolarzellen sind nur ON-Zellen.

Die Informationen des Lichtsignals werden nun in der inneren plexiformen Schicht der Retina auf ein drittes Neuron, die Ganglienzelle, übertragen. Hierbei erfolgen wieder synaptische Übertragungen von ON-Bipolarzellen auf ON-Ganglienzellen und von OFF-Bipolarzellen auf OFF-Ganglienzellen. Eine Ganglienzelle erhält dabei die Informationen von vielen Photorezeptorzellen, so dass von hoher Konvergenz gesprochen werden kann. Über die Axone der Zellen, die den Nervus opticus bilden, erfolgt die Weiterleitung ins Gehirn. Dabei bleibt die

ON/OFF-Aufteilung, auch ON-OFF-Dichotomie genannt, bis in die visuellen Zentren des Gehirns erhalten.

Zusätzlich gibt es weitere Zellen in der Retina, die den Informationsfluss des Lichteinfalls beeinflussen. Die Horizontalzellen können ebenfalls von Photorezeptoren erregt werden und dadurch deren Nachbarzellen hemmen. Amakrine Zellen haben inhibitorische Eigenschaften in der inneren Retina. Somit werden diese beiden Zellarten auch als Interneurone bezeichnet, weil sie einen nicht erregbaren Bereich um ein Neuron schaffen, welches gerade durch einen Lichtreiz aktiviert wurde. Dieser Prozess, auch als laterale Hemmung bezeichnet, ist essentiell für die Verstärkung von Kontrasten beim Sehen (Rohen und Lütjen-Drecoll 2000, Behrends et al. 2016, Lüllmann-Rauch und Asan 2019).

1.1.2 Phototransduktion

Die Phototransduktion beschreibt den Prozess der Umwandlung eines Lichtreizes über chemische in elektrische Signale für den Vorgang des Sehens. Sie erfolgt in den Photorezeptorzellen der Retina.

Im Gegensatz zu vielen anderen Sinneszellen sind die Stäbchen und Zapfen ohne ihren adäquaten Reiz depolarisiert und weisen ein Membranpotential von -30 mV bis -40 mV auf. Dies kommt durch einen ständigen Einstrom von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen über die bei Dunkelheit geöffneten CNG-Kanäle zustande. Diese CNG-Kanäle werden durch die Bindung des *Second messengers* cGMP geöffnet. Gebildet wird das cGMP von einer Guanylatzyklase, die ebenfalls im Dunkeln aktiviert ist.

Entgegen diesem sogenannten Dunkelstrom wirkt zusätzlich ein Ausstrom von K^+ -Ionen, so dass das Membranpotential einen verhältnismäßig hohen Wert annimmt. Resultat der Depolarisation ist die ständige Ausschüttung von Glutamat an der Synapse zur Bipolarzelle, die diese Information kontinuierlich über den bereits beschriebenen Weg weitergibt. Kommt es nun zu einer Absorption von Licht durch die Sehpigmente, wird eine Signalkaskade aktiviert, die den Abbau von cGMP und im Endeffekt eine verminderte Freisetzung des Transmitters zur Folge hat.

Hierbei spielt eine G-Protein-gekoppelte Enzymkaskade die entscheidende Rolle. Der G-Protein-gekoppelte-Rezeptor ist bei den Stäbchen das Rhodopsin, welches aus dem Protein Opsin und 11-cis-Retinal besteht. Es bindet das G-Protein Transducin, welches wiederum einen aktivierenden Effekt auf eine Phosphodiesterase (PDE) haben kann. Kommt es nun dazu, dass ein Photon von dem 11-cis-Retinal absorbiert wird, erfolgt die Überführung dessen in das langgestreckte all-trans-Retinal. Dieser Schritt bewirkt die Aktivierung des Rhodopsins und

seine Umwandlung in Metarhodopsin II, was zur Folge hat, dass das G-Protein Transducin ebenfalls aktiviert wird. Es erfolgt der Austausch des an Transducin gebundenen GDP zu GTP, wodurch sich die α -Untereinheit des G-Proteins ablöst und ihren aktivierenden Effekt auf die PDE vermitteln kann. Die Aufgabe dieses Enzyms ist es nun, das cGMP zu 5'-GMP zu spalten. Folglich sinkt die Konzentration von cGMP in der Zelle. Dieses kann nun weniger bzw. nicht mehr an den CNG-Kanal binden, woraufhin dieser schließt und die Zelle hyperpolarisiert. Eine verminderte Ausschüttung von Glutamat ist das Resultat der Kaskade. Es kommt zur Aktivierung der ON-Bipolarzelle. Über die weiteren verschalteten Zellen und synaptischen Übertragungen wird ein neuronales Signal generiert, welches bis zum Gehirn weitergeleitet und dort verarbeitet wird, so dass ein Sinneseindruck entsteht (Behrends et al. 2016).

Werden die Photorezeptoren einer sehr hohen Lichtintensität ausgesetzt, kommt es auch zu einer stärkeren Hyperpolarisation der Zelle. Dies bewirkt die Aktivierung und Öffnung einer weiteren Form von Kanälen in den Photorezeptoren: den durch Hyperpolarisation aktivierten und durch zyklische Nukleotide modulierten Kanälen (HCN-Kanäle). Der folgende Einwärtsstrom durch die HCN-Kanäle wirkt nun depolarisierend und somit der Hyperpolarisation hervorgerufen durch die CNG-Kanäle entgegen, wodurch es wieder zu einer Steigerung der Glutamatausschüttung kommt. Die Aktivierung der ON-Bipolarzelle nimmt ab. Somit wird die Übertragung der retinalen Lichtantwort von Photorezeptorzelle auf Bipolarzelle durch den HCN-Kanal noch einmal moduliert (Knop et al. 2008).

Zur Abschaltung des Signalweges der Phototransduktion gehören mehrere Wege. Einerseits wird das Rhodopsin durch die Rhodopsinphosphorylase phosphoryliert, so dass ein weiteres Protein, das Arrestin, an das Rhodopsin bindet und die Interaktion dessen mit dem Transducin verhindert wird. Andererseits kommt es durch den Schluss der CNG-Kanäle zu einer verminderten Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle, wodurch die für die Bildung des cGMP verantwortliche Guanylatzyklase aktiviert wird. Somit kann cGMP wieder an die CNG-Kanäle binden, diese öffnen und einen erneuten Ca^{2+} - und Na^{+} -Einstrom bewirken. Die Zelle depolarisiert wieder. Die Regeneration des all-trans-Retinal zu dem lichtsensiblen 11-cis-Retinal erfolgt in den Pigmentepithelzellen (Behrends et al. 2016).

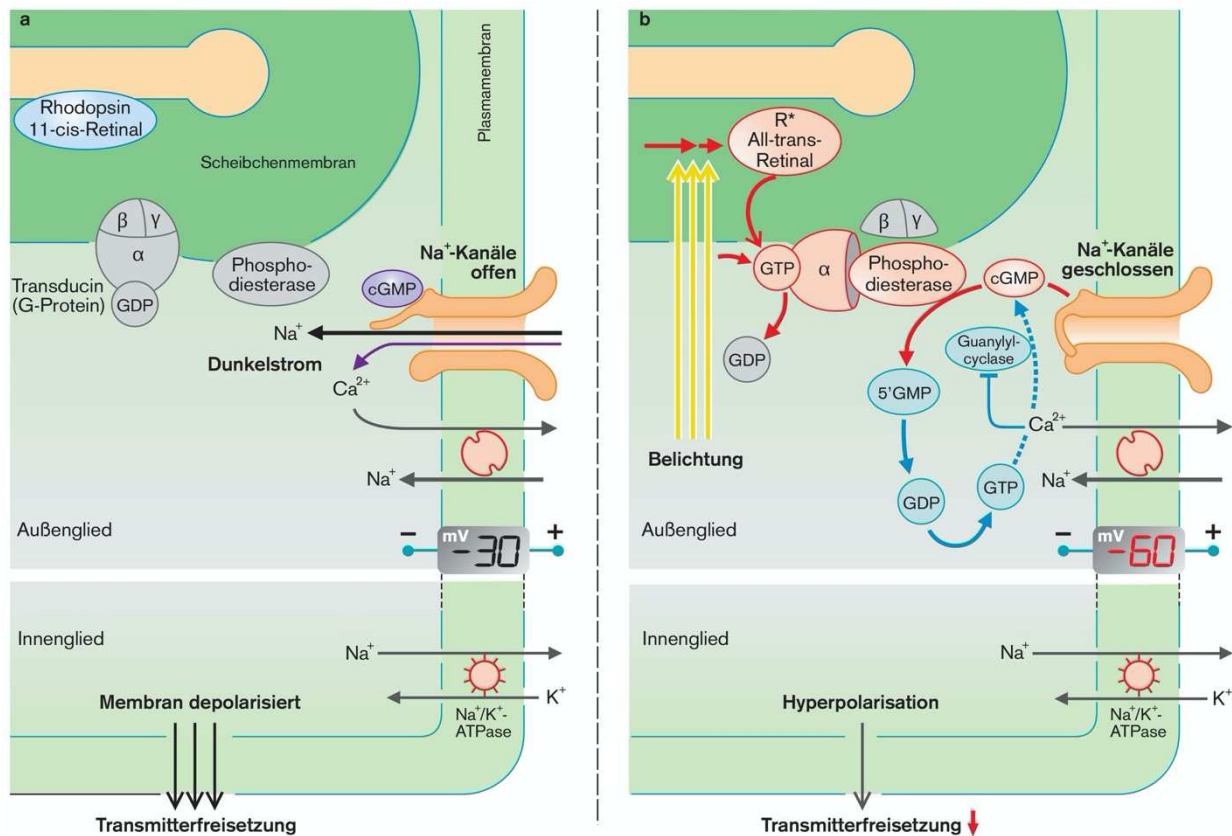


Abbildung 2. Schematische Darstellung der Phototransduktion.

a) In Dunkelheit bindet durch eine Guanylatzyklase gebildetes cGMP an die CNG-Kanäle (hier: Na⁺-Kanäle) und bewirkt deren Öffnung, so dass Na⁺- und Ca²⁺-Ionen in das Außenglied des Stäbchens strömen. Die Membran depolarisiert. Als Folge werden Transmitter freigesetzt.

b) Bei Belichtung setzt eine G-Protein-gekoppelte Signaltransduktionskaskade ein, die zur Aktivierung der Phosphodiesterase führt. Diese spaltet cGMP zu 5'-GMP. Zusätzlich fehlt durch die niedrige intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration die Aktivierung der Guanylatzyklase. Die cGMP-Konzentration sinkt. Ohne die Bindung von cGMP an die CNG-Kanäle schließen diese. Die Membran hyperpolarisiert und die Transmitterfreisetzung stoppt. R* = Metarhodopsin II. (Eysel 2019)

1.2 Zyklisches Guanosin-Monophosphat

Um auf die verschiedenen Bedingungen der Umwelt reagieren und daraufhin eine geregelte Kommunikation zwischen den einzelnen Geweben und Zellen gewährleisten zu können, kommt es in Organismen zu einer Übertragung von Signalen über molekulare Schaltkreise. Dabei werden Signale aus der Umwelt erkannt und über eine Ereigniskette in eine physiologische Reaktion umgewandelt. Dieser Vorgang wird auch Signaltransduktion genannt. Am Beginn dieses Prozesses steht ein Reiz, der die Ausschüttung eines primären Botenstoffes zur Folge hat. Dieser kann meist nicht selbst in die Effektorzelle eintreten, sondern vermittelt seine Wirkung häufig über die Bindung an einen Rezeptor, der in die Zellmembran integriert ist. Daraus resultiert eine Strukturveränderung der intrazellulären Domäne des Rezeptors, so dass das Signal in die Zelle weitergeleitet wird. Hier kommt es nun zur Übertragung der

Informationen über die Bildung von *Second messenger*, zu denen auch das zyklische Guanosin-Monophosphat gehört. Häufig enden diese Wege in der Zelle in einem veränderten Stoffwechsel oder einer veränderten Genexpression (Berg et al. 2018).

cGMP wird intrazellulär über eine Guanylatzyklase aus Guanosintriphosphat (5'-GTP) gebildet. Dies kann in unterschiedlichen Zellen über verschiedene Wege erfolgen. Einerseits existiert eine membrangebundene Guanylatzyklase, die unter anderem durch Hormone wie ANP und BNP stimuliert werden kann. Des Weiteren findet sich in einigen Zellen wie glatten Muskelzellen eine lösliche Guanylatzyklase, die durch NO aktiviert wird. Das cGMP hat daraufhin drei mögliche Targets. Es kann die Proteinkinase G Typ 1 und 2 aktivieren, cGMP-abhängige Phosphodiesterasen beeinflussen oder auch an cGMP-gesteuerte Ionenkanäle binden, so dass beispielsweise die Durchlässigkeit von Ionen durch die Zellmembran verändert werden kann. Abgeschaltet wird der Signalweg über die Phosphodiesterasen, die das cGMP zu 5'-GMP abbauen (Potter et al. 2006, Schlossmann et al. 2005).

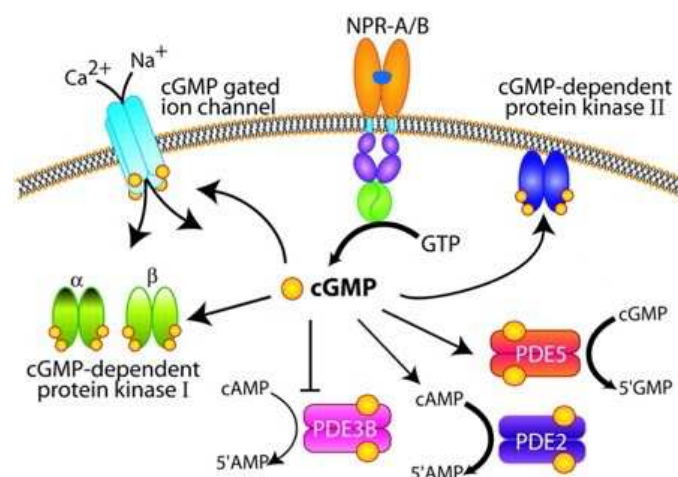


Abbildung 3. Der cGMP-Signalweg.

cGMP wird durch die Guanylatzyklase gebildet. Seinen Effekt kann es über die Bindung an drei verschiedene Klassen von Proteinen vermitteln: durch cGMP-gesteuerte Ionenkanäle (z.B. CNG-Kanäle), cGMP-abhängige Proteinkinasen I und II und cGMP-abhängige Phosphodiesterasen. Unter anderem baut die PDE5 cGMP wieder zu 5'-GMP ab. NPR-A/B = Natriuretische Peptidrezeptor A/B, dt. Rezeptor für natriuretische Peptide Typ A/B. (Potter et al. 2006)

So werden über den cGMP-Weg viele physiologische Wirkungen im Organismus vermittelt. In der Niere bewirkt eine erhöhte Konzentration von cGMP zum Beispiel eine gesteigerte Diurese, Natriurese und Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate (Chen und Burnett 2018). In Gefäßen erfolgt eine Vasodilatation über cGMP-Konzentrationsänderungen in den glatten Muskelzellen (Lincoln und Cornwell 1993, Lincoln et al. 1993), während in Pankreaszellen cGMP-vermittelt vermindert Insulin ausgeschüttet wird (Sandoval et al. 2017). Der Signalweg konnte auch an verschiedenen Orten im Gehirn wie beispielsweise dem Hippocampus, dem Sehnerv und dem

somatosensorischen Kortex nachgewiesen werden (Garthwaite et al. 1999, Neitz et al. 2011, Wang et al. 2017a).

Nicht zuletzt spielt es eine Rolle in der Signalkaskade der Stäbchen und Zapfen in der Retina beim Sehvorgang. Die Aufgabe des cGMPs in Dunkelheit ist hierbei die Bindung an sich in der Photorezeptorzellmembran befindende CNG-Kanäle, wodurch diese öffnen und ein Ioneneinstrom erfolgt. Bei Lichteinfall in den Photorezeptorzellen läuft die Signaltransduktionskaskade ab, die die Aktivierung der Phosphodiesterase zur Folge hat. Dadurch fällt die cGMP-Konzentration ab, die CNG-Kanäle schließen und ein Signal wird generiert, welches im Gehirn zu einem Lichtsinnesindruck umgewandelt wird. Um den Ausgangszustand der Zelle wiederherzustellen, werden Guanylatzyklen zur Bildung von cGMP benötigt. Im Vergleich zu anderen membrangebundenen Guanylatzyklen funktioniert die Photorezeptor-Guanylatzyklase jedoch verschieden. Sie wird nicht durch die Bindung von extrazellulären Liganden aktiviert, sondern durch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und Guanylatzyklase-aktivierende Proteine (GCAP) reguliert. Bei Dunkelheit liegt Ca^{2+} in hohen Konzentrationen vor und bindet an die GCAPs, die daraufhin die Guanylatzyklen inhibieren. Da sich bei Lichteinfluss durch den Schluss der CNG-Kanäle weniger Ca^{2+} in der Photorezeptorzelle befindet, kann dieses jedoch nur in geringerem Maß an die GCAPs binden. Dies hat zur Folge, dass die Guanylatzyklase und somit auch die cGMP-Produktion aktiviert werden, cGMP an die CNG-Kanäle bindet und der Ausgangszustand der Zelle erreicht werden kann (Palczewski et al. 2000, Stephen et al. 2006).

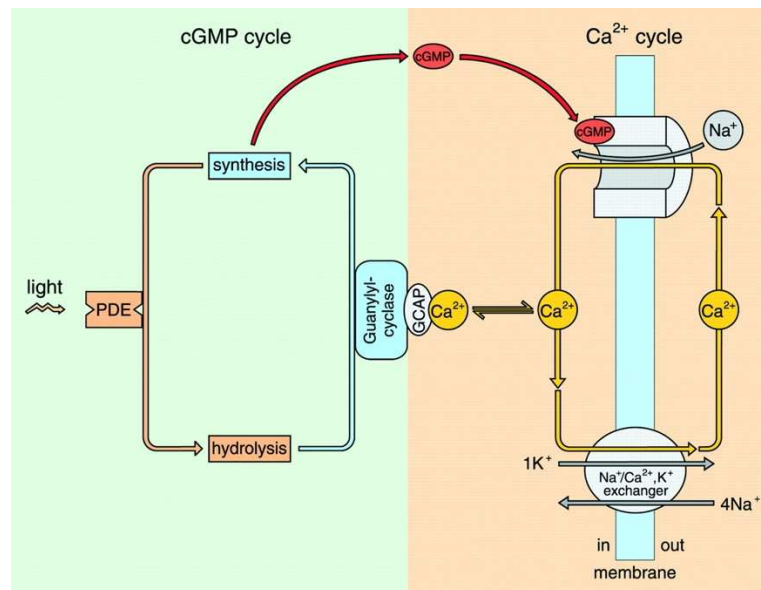


Abbildung 4. Die Rolle von cGMP bei der Phototransduktion.

In Dunkelheit bindet cGMP an die CNG-Kanäle, wodurch diese öffnen und Ca^{2+} - und Na^+ -Ionen in die Zelle strömen. Ca^{2+} bindet bei hohen Konzentrationen an die GCAPs, welche wiederum die Guanylatzyklase inhibieren, um zu hohe cGMP-Konzentrationen zu verhindern. Bei Lichteinfall kommt es durch Aktivierung der Phosphodiesterase zum Abbau von cGMP. Somit schließen die CNG-Kanäle und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration sinkt. In Ca^{2+} -ungebundener Form aktivieren die GCAPs die Guanylatzyklase. Die Bildung von cGMP beginnt erneut und der Ausgangszustand der Zelle kann wiederhergestellt werden (Kaupp und Seifert 2002).

Hierbei können jedoch auch pathologische Situationen auftreten, wenn es zu einem gestörten Gleichgewicht im Auf- und Abbau von cGMP kommt. Beispielsweise führt eine Fehlfunktion der cGMP-abbauenden Phosphodiesterase zu einer Akkumulation dieses *Second messengers*, was wiederum einen Untergang der Sinneszellen und somit eine Erblindung zur Folge haben kann (Wang et al. 2017b).

1.3 Retinitis pigmentosa

1.3.1 Verlauf und Symptome von Retinitis pigmentosa

Retinitis pigmentosa zeigt sich sowohl im klinischen Erscheinungsbild als auch im Verlauf sehr inhomogen und variabel. Einige Patienten entwickeln bereits in der Kindheit symptomatische Gesichtsfeldausfälle, während andere bis ins mittlere Erwachsenenalter asymptomatisch bleiben (Hartong et al. 2006). Bei den Frühsymptomen handelt es sich in den meisten Fällen um Nachtblindheit und erschwerte Adaption an dunkle Lichtverhältnisse. Der Beginn der Nachtblindheit im jungen Alter korreliert dabei mit einem schnelleren Fortschreiten des Sehverlusts (Campochiaro und Mir 2018).

Während die Sehschärfe zu Beginn erhalten bleibt, zeichnen sich in der mittleren Peripherie des Gesichtsfeldes Skotome ab, die über die Jahre immer größer werden. Dabei verlieren die Patienten jedes Jahr zirka 4,6% ihres verbleibenden visuellen Felds (Berson et al. 1985). Im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung bleiben lediglich kleine Inseln von Sehkraft im weiten peripheren Bereich und der Blickachse erhalten, die jedoch auch langsam verschwinden. Die Betroffenen entwickeln einen Tunnelblick (Hartong et al. 2006). In der Folge des Verlusts von peripherem und zentralem Sehen entsteht auch eine Beeinträchtigung bei Tageslicht (Campochiaro und Mir 2018).

Im Verlauf verschmelzen einzelne Blindheitsareale dann immer weiter miteinander, so dass in den meisten Fällen die Krankheit bereits in der 4. Lebensdekade in einem vollständigen Sehverlust der Betroffenen resultiert (Hartong et al. 2006).

1.3.2 Genetische Ursachen von *Retinitis pigmentosa*

Retinitis pigmentosa ist durch eine enorme genetische Heterogenität geprägt, wodurch sowohl das Verständnis für die pathophysiologischen Mechanismen als auch die Entwicklung von Behandlungsmöglichkeiten erschwert werden (Power et al. 2019). Währenddessen für viele Gene verschiedene Mutationen bekannt sind, die die gleichen Konsequenzen haben, können jedoch auch die gleichen Mutationen in unterschiedlichen Individuen völlig verschiedene Symptome hervorrufen (Daiger et al. 2007).

Bisher konnten 71 ursächliche Gene für die Erkrankung identifiziert werden, die mutiert sein können. Dabei wird in eine autosomal-dominante (23 Gene), eine autosomal-rezessive (43 Gene) und eine X-chromosomale Vererbung (5 Gene) unterschieden (Daiger 2020). In der größten Anzahl der Fälle treten die Mutationen monogenetisch auf. Dennoch verursachen die meisten Gene einzeln gesehen nur einen sehr geringen prozentualen Anteil der Krankheitsfälle, wodurch die starke Heterogenität noch weiter untermauert werden kann. Neben anderen Molekülen wie für den Vitamin-A-Metabolismus, das Zytoskelett oder Zell-Zell-Interaktionen kodieren diese Gene häufig für Proteine, die an der Phototransduktionskaskade in der Retina beteiligt sind. Speziell die letzteren Mutationen lassen sich allerdings bis jetzt nur in den Stäbchen nachweisen. Letztendlich enden in der Regel aber alle Mutationen in der Degeneration und dem Verlust der Photorezeptoren und somit im Sehverlust des Organismus (Hartong et al. 2006).

Der Untergang dieser Zellen wurde bereits in den 1970er Jahren durch Farber und Lolley mit einem Ungleichgewicht im Metabolismus oder der Funktion der Photorezeptoren in

Verbindung gebracht, wobei sie als Ursache eine erhöhte Konzentration von zyklischem Guanosin-Monophosphat beschrieben (Lolley et al. 1977, Farber und Lolley 1974).

cGMP ist ein wichtiger Bestandteil der Phototransduktion, indem es unter anderem an CNG-Kanäle bindet und Enzyme wie die Proteinkinase G aktiviert. Eine vermehrte Bindung von cGMP an die CNG-Kanäle führt zu einem exzessiven Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zellen, was als Hauptursache für die Retinadegeneration angesehen wird (Wang et al. 2017b). Somit kommt es bei einer pathologisch erhöhten Konzentration dieses *Second messengers* zur massiven Aktivierung von Signalwegen, die letztendlich zum Untergang der Photorezeptoren führen.

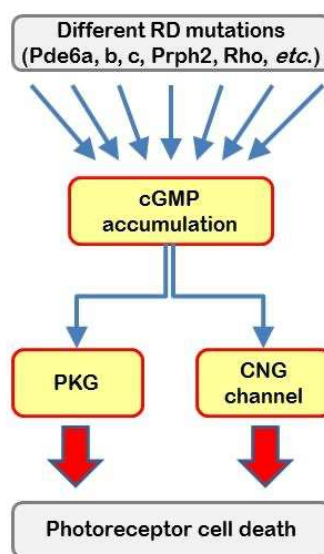


Abbildung 5. Die Akkumulation von cGMP führt zum Photorezeptorzelluntergang.

Bei *Retinitis pigmentosa*-Patienten verursachen verschiedene Genmutationen die Anreicherung von cGMP in den Photorezeptoren. Dies hat zur Folge, dass die beiden Targets von cGMP, die PKG und die CNG-Kanäle, vermehrt aktiviert werden. Die überschießenden Signalwege führen letztendlich zur Degeneration der Photorezeptoren (Paquet-Durand 2017).

Es erfolgten jedoch auch Untersuchungen auf die cGMP-Toxizität, bei denen ein CNGA3-Kanal-Mangel induziert wurde, so dass folglich kein erhöhter Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen erfolgen konnte (Xu et al. 2013). Folglich mussten auch Ursachen für den Zelluntergang der Photorezeptoren unabhängig von einer erhöhten Ca^{2+} -Konzentration bestehen. Wie bereits erwähnt ist als ein weiteres Target von cGMP das Enzym Proteinkinase G bekannt, von dem ebenfalls in degenerierenden Retinae eine Korrelation zwischen erhöhten cGMP-Levels, einer gesteigerten Aktivität dieses Enzyms und vermehrtem Zelltod festgestellt werden konnte. Als Ursache werden Feedback-Prozesse, die zu einer weiteren Hochregulation der cGMP-Produktion führen, die Herunterregulation des Transkriptionsfaktors CREB, was in Verbindung mit Zelltod beschrieben wird, und die Aktivierung von Calpain diskutiert (Paquet-Durand et al.

2009). Somit existieren sowohl Hinweise für einen Ca^{2+} -abhängigen als auch einen Ca^{2+} -unabhängigen Mechanismus in Bezug auf die cGMP-abhängige Zytotoxizität der Photorezeptoren (Xu et al. 2013).

Eine erhöhte cGMP-Konzentration triggert also den Zelluntergang über verschiedene Wege. Die primäre Ursache der Erkrankung liegt dabei jedoch in vielen Fällen in den Mutationen von verschiedenen Genen, die eine Überaktivierung des cGMP-Systems zur Folge haben. Die meisten davon stehen in Verbindung mit dem Auf- und Abbau von cGMP oder kodieren für CNG-Kanäle (Power et al. 2019).

Verantwortlich für die Hydrolyse von cGMP ist das Enzym Phosphodiesterase 6. Bei *Retinitis pigmentosa*-Patienten konnten Mutationen in den Genen, die für die Untereinheiten PDE6A, PDE6B und PDE6G kodieren, aufgezeigt werden (Dryja et al. 1999, McLaughlin et al. 1993). Diese haben eine Dysfunktion des Enzyms und somit eine exzessive Akkumulation von cGMP in den Photorezeptoren zur Folge (Farber und Lolley 1974). Der gleiche Effekt wird erreicht, wenn das für die Retina spezifische, cGMP-bildende Enzym retinale Guanylatzyklase (retGC) zu viel des *Second messengers* produziert. Die retGC wird von Guanylatzyklase-aktivierenden Proteinen reguliert. *Loss-of-function*-Mutationen in den GCAPs führen zu einer verminderten Inhibition des Enzyms und somit zu einer Überproduktion von cGMP (Sato et al. 2005). Weiterhin wurden Mutationen in den Ionenkanälen CNGA1 (Dryja et al. 1995) und CNGB1 (Bareil et al. 2001) bei RP-Patienten gefunden. In Abwesenheit von funktionellen CNG-Kanälen fehlt der negative Ca^{2+} -abhängige Feedback-Mechanismus auf die retinale Guanylatzyklase, so dass es zu einer fehlenden Inhibition des Enzyms und folglich einer exzessiven Produktion von cGMP mit den bereits beschriebenen Folgen kommt (Power et al. 2019).

Die hier aufgeführten Beispiele sind nur einige der bereits erforschten Mutationen, die sich im Hinblick auf das Thema der Arbeit hauptsächlich auf den cGMP-Metabolismus beziehen. Nichtsdestotrotz bedarf es der sorgfältigen Analyse jeder einzelnen individuellen Genmutation für weitere Untersuchungen und der Entwicklung von Therapiemöglichkeiten.

1.3.3 Therapiemöglichkeiten von *Retinitis pigmentosa*

1.3.3.1 cGMP-unabhängige Behandlungsmethoden

Bis zum jetzigen Zeitpunkt der Forschung existiert keine Therapie, die sich in der Verhinderung der Entwicklung und der Progression der Erkrankung bewährt hat. Vor allem die bereits beschriebene starke Heterogenität der *Retinitis pigmentosa* und die vielen verschiedenen

kausalen Mutationen erschweren die Therapieentwicklung (Fischer und Paquet-Durand 2019, Dias et al. 2018).

Aufgrund ihrer Zugänglichkeit und der starken Kompartimentierung der anatomischen Strukturen, wodurch Immunantworten vermindert und inhibitorische systemische Nebeneffekte verhindert werden können, ist die Retina für die Gentherapie grundsätzlich geeignet (Dias et al. 2018). Durch den Ersatz mutierter Gene mithilfe von Vektoren könnte die richtige Expression der inaktiven Proteine realisiert und die Symptome vermindert werden. Erfolge der Gentherapie konnten bei Tierversuchen in Form eines verlangsamten Fortschreitens der Erkrankung und Wiederherstellung des Sehvermögens aufgezeigt werden (Dias et al. 2018). Auch Studien zur Gentherapie am Menschen befinden sich bereits in der klinischen Phase (Dias et al. 2018).

Des Weiteren werden verschiedene Typen von elektronischen Retina-Implantaten getestet, die vor allem Patienten im Endstadium mit vollständiger Erblindung zumindest teilweise ihr Sehvermögen wieder zurückgeben sollen. Durch die elektrische Stimulation der nicht-degenerierten, verbliebenen meist Photorezeptoren initiieren die Implantate eine visuelle Wahrnehmung, so dass die erblindeten Probanden wieder Umrisse erkennen oder Objekte lokalisieren konnten (Stingl et al. 2015, Stingl et al. 2013).

Eine weitere Möglichkeit der Behandlung ist die Zelltransplantation, bei der einerseits retinale Photorezeptor-Vorläuferzellen oder embryonale Stammzellen in die Retina integriert werden und gesunde Photorezeptoren bilden sollen (Shintani et al. 2009). Andererseits können degenerierte Zellen durch neue ersetzt werden, indem zeitlich unmittelbar zuvor präparierte Zellschichten von fetalen Retina-Vorläuferzellen zusammen mit dem Pigmentepithel in die Patientennetzhaut transplantiert werden. Diese sollen sich mit dem noch funktionierenden Teil der Wirts-Retina verbinden und so die degenerierende Retina wiederherrichten (Seiler und Aramant 2012).

Auch keine pharmakologische Therapie konnte sich bisher in der Verhinderung des Fortschreitens der Erkrankung hervorheben. Somit zielen die meisten Therapieansätze auf eine supportive und konservative Behandlung (Dias et al. 2018).

Es ist bekannt, dass bei *Retinitis pigmentosa* die Photorezeptoren vor allem durch Apoptose zugrunde gehen, weshalb auch anti-apoptotische Substanzen zur Behandlung eingesetzt werden. Unter anderem konnte eine erhöhte Konzentration von Ceramiden, pro-apoptotischen Sphingolipiden, mit der Retinadegeneration in Verbindung gebracht werden. Daraufhin wurde Myriocin, ein Stoff, der die Ceramid-Synthese inhibiert, getestet und es zeigten sich verminderte Sphingolipid-Level. Somit soll die Substanz weiter als Therapieoption erprobt werden (Strettoi et al. 2010, Platania et al. 2019).

Aufgrund der ständigen Aussetzung von Licht und dem hohen Sauerstoffverbrauch ist die Retina eine der empfindlichsten Gewebe gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies. Somit können auch Anti-Oxidantien wie zum Beispiel Vitamin A, DHA oder Lutein in der Therapie zum Einsatz kommen (Dias et al. 2018). Im Mausmodell zeigte sich nach der Injektion von Anti-Oxidantien ein längeres Überleben der Photorezeptoren (Komeima et al. 2007). Auch klinisch konnte bei Patienten ein Nutzen durch eine Substitution von Vitamin A und Vitamin E herausgestellt werden (Berson et al. 1993).

1.3.3.2 cGMP-abhängige Behandlungsmethoden

Wie bereits erwähnt ist bei *Retinitis pigmentosa* die cGMP-Konzentration in den Photorezeptorzellen erhöht (Lolley et al. 1977, Farber und Lolley 1974), was zu einer gesteigerten Aktivität der CNG-Kanäle und der Proteinkinase G führt (Wang et al. 2017b, Paquet-Durand et al. 2009). Forschungen hinsichtlich neuer Behandlungsmethoden zielen somit auf den cGMP-Signalweg ab, bei denen das Potential von cGMP-Analoga als eine neue pharmakologische Klasse erprobt werden soll. Dies erfolgte durch die Modifikation von verschiedenen chemischen Gruppen am cGMP-Grundgerüst, so dass diese entwickelten cGMP-Derivate als Inhibitor von PKG und CNG-Kanälen getestet wurden. Als Folge sollen die ursächlich pathologisch verstärkt aktivierten cGMP-abhängigen Signalwege in der Zelle gebremst werden können. Sowohl die Erhaltung der Zellen in der Netzhaut als auch die Bewahrung der retinalen Funktionsfähigkeit konnten in Tiermodellen aufgezeigt werden, so dass hiermit ein neuer Ansatz zur Behandlung von *Retinitis pigmentosa* geschaffen wurde. Zudem zeigte die Therapie bei Mäusen mit verschiedenen Mutationen ihre Wirkung, so dass diese Strategie sogar potenziell unabhängig von der kausalen Mutation Anwendung finden kann (Vighi et al. 2018).

1.3.3.2.1 cGMPS-Derivate als PKG-Inhibitoren

cGMP-Analoga, die als PKG-Inhibitoren verwendet werden, sind üblicherweise Rp-konfigurierte Phosphorothioate, bei denen das exozyklische Sauerstoff-Atom des zyklischen 3',5'-Phosphats am cGMP durch ein Schwefel-Atom ersetzt wurde. Die Vorsilbe „Rp“ definiert die Konfiguration dieser funktionellen Gruppe bezüglich der Chiralität (Tolone et al. 2019).

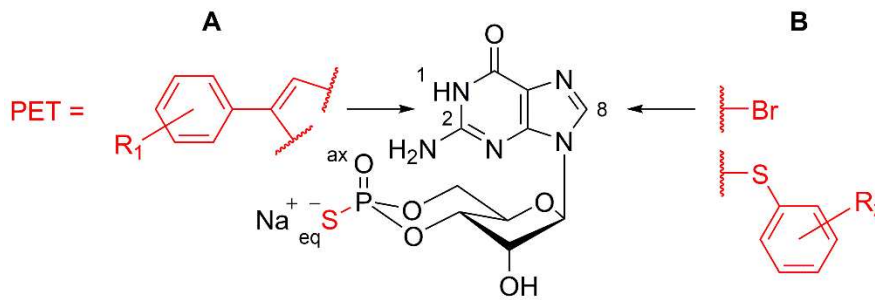


Abbildung 6. Schematische Struktur der cGMP-Analoga.

Die Pfeile markieren typische Stellen des Rp-cGMPS-Grundgerüsts, die für die Einführung von Substituten verwendet wurden, um cGMP-Analoga mit einem hohen inhibitorischen Potential auf die Proteinkinase G zu generieren. (A) An Position 1 wurde die PET-Modifikation mit variierenden zusätzlichen Substituenten (R₁), (B) an Position 8 Halogene wie Brom oder über ein Schwefel-Atom verbundene aromatische Ringsysteme mit variierenden zusätzlichen Substituenten (R₂) angehängt (Tolone et al. 2019).

Diese sogenannten Rp-cGMPSs binden zwar die cGMP-abhängige Proteinkinase G, bewirken aber scheinbar nicht die nötige Konformationsänderung des Enzyms, die für dessen Aktivierung benötigt wird. Somit stellen diese Derivate einen kompetitiven Inhibitor für cGMP-abhängige PKGs dar (Butt et al. 1990). Zusätzlich werden die Rp-cGMPSs langsamer von der Phosphodiesterase abgebaut. Dadurch gelten sie als Hydrolyse-resistent und werden zusätzlich ähnlich wie kompetitive Inhibitoren der PDE angesehen (Zimmerman et al. 1985). Zusammengefasst sind drei Faktoren für die Wirksamkeit von hoch entwickelten Rp-cGMPS-Analoga verantwortlich: das Potenzial der Inhibition der PKG, die Beständigkeit gegenüber dem Abbau der Derivate und eine hohe Lipophilie und Membranpermeabilität für die Applikation (Tolone et al. 2019). Verschiedene Substituenten wurden an typischen Stellen der Grundstruktur des Rp-cGMPS angesetzt oder ausgetauscht, um Rp-cGMPS-Analoga mit dem besten inhibitorischen Potenzial zu generieren und zu finden. Dabei stellte sich Rp-8-Br-PET-cGMPS als der potenteste und selektivste Inhibitor für die Proteinkinase G heraus (Butt et al. 1995). Dieses cGMP-Derivat wurde daraufhin sowohl an Photorezeptor-ähnlichen Zellen *in vitro* als auch an Explant-Kulturen und zusätzlich am Mausmodell *in vivo* auf den Einfluss der Photorezeptoren untersucht. Für letzteres wurde ein Drug-Delivery-System entwickelt, bei dem die Substanz in mit Gluthation-konjugierte Liposomen eingebracht und so über die Blut-Retina-Schranke hinweg zu den Photorezeptorzellen gelangen konnte. Die Daten zeigten einen neuroprotektiven Effekt auf post-mitotische Photorezeptorzellen, *in vivo* den Erhalt der retinalen Funktion und somit das Aufhalten der Photorezeptordegeneration (Vighi et al. 2018).

1.3.3.2.2 cGMPS-Derivate als Agonisten/Antagonisten für CNG-Kanäle

Neben dem Einfluss der cGMP-Analoga auf die Proteinkinase G sollte auch die Wirkung der Substanzen auf die CNG-Kanäle untersucht werden, da diese ebenfalls eine Bindestelle für zyklische Nukleotide besitzen. Es war bereits bekannt, dass verschiedene Substituenten sowohl agonistische als auch antagonistische Wirkungen auf den CNG-Kanal haben können. Dabei wurden drei verschiedene Stellen des cGMP-Moleküls beschrieben, die wahrscheinlich mit den Kanalproteinen interagieren: das Vorhandensein oder Fehlen eines Brom-Atoms an Position 8 des Guanin-Rings, einer Thiophosphat-Gruppe im zyklischen Phosphatrest und einer PET-Substitution am Guanin-Ring (Wei et al. 1996). So zeigte sich beispielsweise, dass ein Analogon, welches eine pCPT-Gruppe an Position 8 des cGMP-Moleküls enthält, 8-pCPT-cGMP, 80-mal potenter war als cGMP. Dieses Derivat wurde somit als potentester CNG-Kanal-Agonist beschrieben. Auch Rp-8-Br-cGMPS und Rp-8-pCPT-cGMPS stellten sich als Agonisten heraus, wobei Rp-8-pCPT-cGMPS bei hohen Konzentrationen zusätzlich als nicht-kompetitiver Antagonist wirkte (Wei et al. 1998).

Um reine kompetitive Antagonisten des cGMP-abhängigen Kanals in den Photorezeptoren zu identifizieren, wurden β -phenyl-1, N²-etheno-substituierte (PET) cGMP-Analoga untersucht. Hierbei zeigte sich Rp-8-Br-PET-cGMPS als kompetitiver Inhibitor von cGMP an der Bindestelle der α -Untereinheit des CNG-Kanals der Stäbchen (Wei et al. 1996).

Diese Untersuchungen stellten die Grundlagen für die weitere Entwicklung und Erprobung von cGMP-Analoga *in vivo* und später auch für die Untersuchungen dieser Arbeit dar. Wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben testeten Vighi und Mitarbeiter vor allem Rp-8-Br-PET-cGMPS als kompetitiven Inhibitor sowohl der PKG als auch der CNG-Kanäle an verschiedenen Modellen und konnte den Erhalt der retinalen Funktion und eine Verminderung der Photorezeptordegeneration aufzeigen (Vighi et al. 2018).

Da dieses Analogon jedoch auf beide untersuchten physiologischen Targets von cGMP eine Wirkung besitzt und es in Zellen getestet wurde, in denen die natürlichen Prozesse des Sehens ablaufen und alle Zellbestandteile für geregelte Prozesse miteinander agieren müssen, ist nicht eindeutig geklärt, welches Target für den beschriebenen Effekt verantwortlich ist. Komplexe mehrzellige Organismen benötigen eine schnelle und genaue Transmission von Informationen zwischen Zellen und Geweben, für die unter anderem spannungsabhängige Ionenkanäle wie der CNG-Kanal benötigt werden (Yu et al. 2005). Nicht nur in den Stäbchen und Zapfen sind jedoch weitere Ionenkanäle vorhanden, die eine Bindungsstelle für zyklische Nukleotide

besitzen, die *Hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-modulated cation channels* (HCN-Kanäle) (Moosmang et al. 2001).

1.3.3.2.3 HCN-Kanäle in der Retina und als Target von cGMPS-Derivaten

Alle vier Isoformen der HCN-Kanäle (HCN1-4) werden in der Retina exprimiert. Dabei unterscheiden sie sich jedoch in ihrer Lokalisation in den verschiedenen Schichten der Netzhaut. HCN1 konnte in der Plasmamembran der Somata, in den Innensegmenten und den Axonen sowohl der Stäbchen als auch der Zapfen nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich in der histochemischen Untersuchung ein Signal bei den Zapfen-Bipolarzellen, deren Axone in der Mitte der inneren plexiformen Schicht enden, bei amakrinen Zellen, bei einigen Somata in der Ganglienzellschicht und bei Axonen von Ganglienzellen in der Nervenfaserschicht. HCN2 wurde in einigen Banden in der inneren plexiformen Schicht, in einigen Zellkörpern von amakrinen Zellen und in geringer Form auch in den Somata und Fortsätzen der Zapfen entdeckt. HCN3 stellte sich besonders stark an den Synapsen der Zapfen in der äußeren plexiformen Schicht und weniger stark in der inneren Körnerschicht dar. In einigen amakrinen Zellen und zwei Bipolarzelltypen fanden sich auch HCN4. Zusammenfassend kommen HCN-Kanäle also konzentriert an den synaptischen Endigungen der Bipolarzellen und der Photorezeptoren vor (Muller et al. 2003).

Einige Untersuchungen mit Blockern des Hyperpolarisations-aktivierten Stroms weisen darauf hin, dass dessen Rolle in der Retina in der Filterung von Signalen bei der Überleitung der Stäbchen auf die nachgeschalteten Zellen besteht (Demontis et al. 1999). HCN-Kanäle spielen also eine Rolle in der Verarbeitung visueller Informationen. Beispielsweise führt die Aktivierung von HCN1, die ja vor allem in den Stäbchen und Zapfen exprimiert werden (Moosmang et al. 2001), zu einer Verkürzung und Modulation der Reizantwort, was sowohl Einfluss auf die skotopischen als auch die photopischen Signalwege zur Folge hat (Knop et al. 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich die einzelnen HCN-Isoformen in ihrer Rolle unterscheiden. Während HCN2-Kanäle, die vor allem an den Dendriten der Bipolarzellen vorhanden sind, die Antwort auf gedämpftes Licht beeinflussen können, kontrollieren die HCN1-Kanäle vor allem den zeitlichen Verlauf der Reaktion auf helles Licht (Della Santina et al. 2012).

Um herauszufinden, inwieweit Proteine, die ebenfalls Einfluss auf die elektrischen Eigenschaften von Photorezeptoren haben, auch das Fortschreiten von *Retinitis pigmentosa* beeinflussen können, wurde untersucht, welche Bedeutung der HCN1-Kanal für das Überleben der Photorezeptoren besitzt (Schon et al. 2016). Dafür wurden durch Kreuzung Mäuse

gezüchtet, die sowohl keine funktionsfähigen CNGB1- als auch keine HCN1-Kanäle exprimieren konnten, und mit CNGB1-*Knock-out*-Kontrollmäusen und Wildtyp-Mäusen verglichen. Schön et al. zeigten, dass die genetische Deletion oder die pharmakologische Inhibition des HCN1-Kanals in degenerierenden Photorezeptoren dramatisch den Krankheitsverlauf verstärkt und schlossen somit darauf, dass der Kanal einen entscheidenden Faktor darstellt, der Photorezeptordegeneration entgegenzuwirken. Mittels Elektroretinografie untersuchten sie sowohl das photopische als auch das skotopische Sehen der Mäuse und fanden einen nahezu vollständigen Verlust der Stäbchen- und Zapfenantworten im Vergleich zu einer besseren Antwort der CNGB1-*Knock-out*-Kontrollmäuse. Diese Ergebnisse wiesen auf eine schnellere oder verstärkte Degeneration beider Photorezeptorarten in Verbindung mit dem Fehlen des HCN1-Kanals hin. Wurden jedoch Adeno-assoziierte virale Vektoren mit der genetischen Information für den HCN1-Kanal in einen Teil der doppelt-mutierten Retina eingebracht, so fanden sich an diesen Stellen besser erhaltene Netzhautanteile. Somit konnte bestätigt werden, dass funktionsfähige HCN1-Kanäle entscheidend für das Überleben von CNGB1-Kanal-defizienten Stäbchen-Photorezeptoren sind. Schön et al. zeigten demzufolge mit ihren Untersuchungen einen protektiven Effekt der HCN1-Kanäle auf die Photorezeptordegeneration und konnten die Ansicht, dass der HCN1-Kanal unter anderen einen der Hauptfaktoren für das Überleben und die Funktionsfähigkeit von dysfunktionalen Photorezeptoren darstellt, untermauern. Fehlt allerdings der funktionsfähige Kanal oder wird er inhibiert, so führt dies zu einem schnelleren Fortschreiten des Krankheitsverlaufs.

So wiesen die Autoren auch auf eine Neubewertung der Unbedenklichkeit des klinischen Einsatzes von HCN-Inhibitoren bei Patienten mit degenerativen Netzhauterkrankungen hin. Da HCN-Kanälen auch eine Schlüsselrolle in der kardialen Schrittmacheraktivität zugeschrieben wird, wurde bereits ein HCN-Kanal-Blocker, Ivabradin, zur Senkung der Herzfrequenz bei stabiler Angina pectoris klinisch getestet (Postea und Biel 2011). Bei der Anwendung dieses Medikaments fielen allerdings bei einigen Patienten Nebenwirkungen auf, die auch als Phosphene bezeichnet werden. Dies sind visuelle Sinneseindrücke, die jedoch nicht durch Licht selbst, sondern durch andere Reize hervorgerufen werden. Dabei steht als Ursache die Inhibition der HCN-Kanäle in der Retina zur Diskussion (Cervetto et al. 2007). Schlussendlich zeigen diese möglichen Auswirkungen der pharmakologischen Einflussnahme auf den HCN-Kanal die Beeinflussung der retinalen Funktion und bestärken die wichtige Rolle dieses Kanals in den ablaufenden Prozessen der Netzhaut.

Es ist schon länger bekannt, dass der *Second messenger* cAMP an der Modulation des HCN-Kanals beteiligt ist und dessen durch Hyperpolarisation aktivierter Strom durch eine direkte

Interaktion von cAMP mit der intrazellulären Domäne des Kanals beeinflusst werden kann (DiFrancesco und Tortora 1991). Auch cGMP führt zu einer Aktivierung dieses Stromes. Beide zyklische Nukleotide steigern so die Stromamplitude, indem sie die Aktivierungskurve zu positiveren Werten der Spannung verschieben (Ludwig et al. 1998).

Mit dem Wissen, dass der HCN-Kanal auch durch cGMP aktiviert werden und seine Inhibition negative Auswirkungen auf den Krankheitsprozess von *Retinitis pigmentosa* haben kann, stellt sich die Frage, welche Bedeutung die HCN-Kanäle in der Behandlung dieser Erkrankung, vor allem in Bezug auf die cGMP-Derivate, besitzen. Dabei sind sie einerseits als mögliches therapeutisches Target interessant. Andererseits könnten sie jedoch auch Ursache für unerwünschte Nebenwirkungen sein, wenn beispielsweise das cGMP-Analogon nicht nur als Inhibitor von PKG oder CNG-Kanal fungiert, sondern auch die Funktion des HCN-Kanals einschränken würde. Somit bedarf es einer Untersuchung des Einflusses der cGMP-Derivate auf den HCN-Kanal.

1.4 HCN-Kanäle

1.4.1 Struktur der HCN-Kanäle

Die HCN-Kanäle können der spannungsgesteuerten Ionenkanal-Superfamilie zugeordnet werden, zu der neben mehr als 140 weiteren Kanälen beispielsweise auch der CNG-Kanal gehört. Dabei stellt sie eine der größten Gruppen von Proteinen dar, die in Verbindung mit der Signaltransduktion stehen (Yu et al. 2005). Weiterhin werden bei den HCN-Kanälen vier Isoformen (HCN1-4) unterschieden, die in verschiedenen Geweben exprimiert werden (Santoro und Tibbs 1999). Grundsätzlich bestehen HCN-Kanäle aus vier Untereinheiten, die so angeordnet sind, dass eine zentral lokalisierte, ionenleitende Pore entsteht.

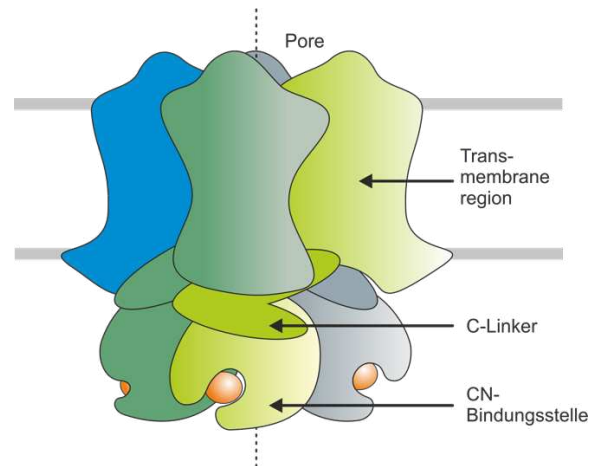


Abbildung 7. Schematische Darstellung des HCN-Kanals.

Der HCN-Kanal ist in die Zellmembran integriert und setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen. Diese bilden nach entsprechender Anordnung eine ionenleitende Pore (bereitgestellt von Dr. J. Kusch).

Jede einzelne Untereinheit setzt sich wiederum aus drei Strukturen zusammen: dem NH₂-Terminus und dem COOH-Terminus, die sich beide intrazellulär befinden, und der dazwischen liegenden transmembranären Domäne. Letztere beinhaltet sechs α -helikale Segmente (S1-S6), die durch die Zellmembran ziehen. Dabei bilden die jeweiligen Segmente 5 und 6 gemeinsam die symmetrische, ionenleitende Pore, die von den in die Membran eingebetteten Spannungssensoren (Helices 1-4) von außen umgeben ist (Lee und MacKinnon 2017). Vor allem verantwortlich für den Mechanismus der Spannungserkennung ist allerdings das Segment 4, welches durch eine Einwärtsbewegung als Reaktion auf eine Hyperpolarisation der Zelle den Kanal öffnet. Demnach bewirkt eine Auswärtsbewegung als Folge einer Depolarisation den Schluss des Kanals. S4 stellt also den Hauptspannungssensor des HCN-Kanals dar (Mannikko et al. 2002). Zusätzlich besitzen S1 durch die Interaktion mit dem sich bewegenden Teil des Spannungssensors und S2 und S3 durch einen noch nicht vollständig geklärten Vorgang Einfluss auf den Schaltmechanismus des HCN-Kanals (Chen et al. 2000, Ishii et al. 2007). Ein S4-S5-Linker stellt die Verbindung zwischen dem Spannungssensor und der Kanalpore her, so dass er ebenfalls eine Rolle in der Übertragung der Reaktion auf eine Spannungsänderung und somit in der Öffnung und Schließung des Kanals spielt (Prole und Yellen 2006).

Unter physiologischen Bedingungen leiten HCN-Kanäle sowohl Na⁺- als auch K⁺-Ionen (Ho et al. 1994, DiFrancesco 1981), wobei das Verhältnis der Durchlässigkeit der Ionen (K⁺ : Na⁺) bei etwa 4:1 liegt (Ludwig et al. 1998). Der Selektivitätsfilter für die spezifische Durchlässigkeit der Ionen befindet sich in der Porenschleife, die die porenbildenden Segmente 5 und 6 miteinander verbindet. Wie bei den K⁺-selektiven Kanälen findet sich hier ebenfalls die spezifische GYG-Sequenz, jedoch zeigen sich im HCN-Kanal dazu Unterschiede in den umgebenden Aminosäuren, die mit dem Filter interagieren (Lee und MacKinnon 2017).

HCN-Kanäle können durch die intrazelluläre Bindung von *Second messenger* in ihrem Schaltverhalten beeinflusst werden (DiFrancesco und Tortora 1991). Dafür besteht der C-Terminus aus zwei Domänen. Eine Domäne ist die Bindungsstelle für zyklische Nukleotide (*Cyclic nucleotide-binding domain*, CNBD). Sie beinhaltet vier α -Helices (A, P, B, C) mit einem β -Faltblatt zwischen den A- und B-Helices, an welchem das zyklische Nukleotid bindet und mit der C-Helix interagiert (Zagotta et al. 2003). Sowohl cAMP als auch cGMP können als Liganden fungieren, wobei die Sensitivität des Kanals für cAMP höher ist (DiFrancesco und Tortora 1991). Als Ursache dafür wird diskutiert, dass cAMP in seiner anti-Konfiguration an der CNBD bindet, währenddessen es für cGMP die syn-Konformation ist. Dadurch ergeben sich andere Kontaktstellen zwischen den Aminosäuren im Protein und dem Ligandenmolekül. Diese Kontakte sind wichtig, um den Liganden in der gebundenen Position zu stabilisieren (Zagotta et al. 2003). Da der Kanal aus vier Untereinheiten besteht und jede davon eine Bindungsstelle für einen Liganden besitzt, können gleichzeitig vier Moleküle an einem Kanal binden.

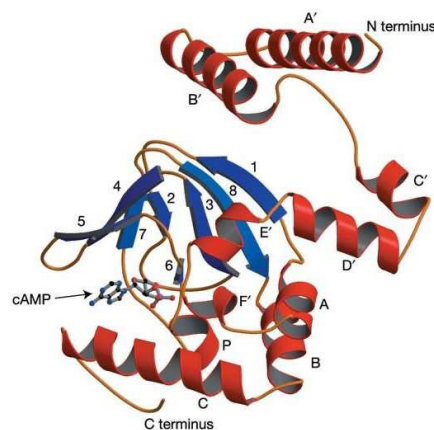


Abbildung 8. Struktur eines CNBD-C-Linker-Konstrukts mit gebundenem cAMP.

Dargestellt sind die die CNBD bildenden Helices (rot) mit dem sich dazwischen befindlichen β -Faltblatt (blau), an das das cAMP bindet (Zagotta et al. 2003).

Die zweite Domäne am C-Terminus, der C-Linker zwischen S6 und der CNBD, verbindet nicht nur die ionenleitende mit der ligandenbindenden Domäne des Kanals, sondern vermittelt auch zahlreiche Interaktionen zwischen den einzelnen Untereinheiten. Die vier C-Linker der vier Untereinheiten bilden gemeinsam die C-Linker-Scheibe (Zagotta et al. 2003). Der Komplex aus den vier CNBDs und der C-Linker-Scheibe formt in gebundenem Zustand eine tetramere Struktur aus, die charakteristisch für die Ionenkanäle ist (Biel et al. 2009).

Am N-terminalen Ende gehen dem S1-Segment noch 45 Aminosäuren voraus, die eine 3- α -helikale Domäne bilden und sich zwischen Spannungssensor und der zytoplasmatischen Einheit

befinden. Da diese Struktur bis jetzt nur bei den HCN-Kanälen identifiziert werden konnte, wird sie auch als HCN-Domäne bezeichnet. Sie hat sowohl Kontakt zu Segment S4 der eigenen Untereinheit als auch zum C-Linker einer benachbarten und der gegenüberliegenden Untereinheit, so dass sie wahrscheinlich wie eine Zange fungiert und den Kanal auf der Ebene des C-Linkers einengen kann (Lee und MacKinnon 2017).

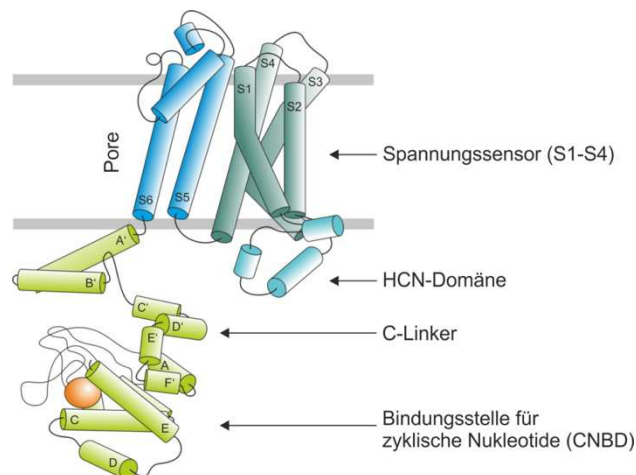


Abbildung 9. Schematische Darstellung einer HCN-Untereinheit.

Eine Untereinheit des HCN-Kanals wird von sechs transmembranären Segmenten (S1-S6) gebildet. S5 und S6 bilden die ionenleitende Pore. S1-S4 stellen den Spannungssensor dar. Am C-Terminus befinden sich der C-Linker für Interaktionen zwischen den einzelnen Untereinheiten und die CNBD, an die die zyklischen Nucleotide binden können. Am N-Terminus liegt die HCN-Domäne (bereitgestellt von Dr. J. Kusch).

1.4.2 Schaltverhalten der HCN-Kanäle

Der HCN-Kanal ist ein Ionenkanal, dessen Schaltverhalten sowohl durch die Spannungsänderung als auch durch die direkte Bindung von zyklischen Nucleotiden reguliert werden kann (DiFrancesco und Tortora 1991). Bei der Spannungsabhängigkeit des Kanals spricht man auch von einer umgekehrten Polarität (Lee und MacKinnon 2017), denn während sich die meisten Ionenkanäle bei Depolarisation der Membran öffnen, reagieren die HCN-Kanäle im Gegensatz dazu auf Hyperpolarisation mit der Öffnung des Kanals. Als Erklärung dafür werden verschiedene strukturelle Eigenschaften diskutiert. Der Kanal besitzt ein ungewöhnlich langes S4-Segment, welches wie bereits beschrieben den Hauptspannungssensor darstellt (Mannikko et al. 2002). Das verlängerte S4 bringt den S4-S5-Linker mit dem C-Linker einer benachbarten Untereinheit in Kontakt, so dass die C-Linker-Scheibe die Konfiguration der geschlossenen Pore bei Depolarisation stabilisiert. Zusätzlich wird die Konformation bei Depolarisation durch die dichte Anordnung von S4, S5 und S6 unterstützt, indem sich die Seitenketten der Aminosäuren wie ein Reißverschluss verzahnen und somit wie eine Fläche

zusammengepackt sind. Außerdem scheint die HCN-Domäne diese Fläche zu stützen und das intrazelluläre Ende von S4 in die Richtung der Pore zu drängen, um diese noch zusätzlich zu verdichten.

Wenn nun als Folge einer Hyperpolarisation das S4-Segment durch eine Art Abknicken eine Einwärtsbewegung vollzieht, werden all diese stabilisierenden Interaktionen durchbrochen, indem die Hemmung des C-Linkers und der S6 freigelassen werden, und der Kanal öffnet sich (Lee und MacKinnon 2017).

Im Allgemeinen aktiviert der Kanal bei durch Hyperpolarisation entstehenden Potentialen, die negativer als -50 mV bis -60 mV sind. Dabei entwickelt sich die Hauptkomponente des Stroms verhältnismäßig langsam, so dass durch den Einstrom der Kationen das Gleichgewicht erst nach Millisekunden bis Sekunden erreicht wird. Die Geschwindigkeit hängt dabei jedoch auch von der beteiligten HCN-Isoform sowie vom Zelltyp ab, in dem der HCN-Kanal exprimiert ist (Biel et al. 2009). Typischerweise zeigt bei den meisten Formen das Verhältnis zwischen der Membranspannung und der Stromaktivierung einen sigmoidalen Verlauf (Edman et al. 1987). Die Kanalaktivität kann zusätzlich durch zyklische Nucleotide beeinflusst werden, indem sowohl cAMP als auch cGMP von intrazellulär an die CNBD des Kanals bindet (DiFrancesco und Tortora 1991). Dies bewirkt eine Konformationsänderung der CNBD, die wiederum auf den C-Linker übertragen wird. Somit kommt es durch Rotation der C-Linker-Scheibe und einer Verschiebung der vier S6-Helices zur Öffnung der Pore. Zusammengefasst bewirkt die Bindung des zyklischen Nucleotids letztendlich eine Veränderung der Quartärstruktur des Kanals, wodurch die Inhibition durch die C-terminale Region entfernt (Autoinhibition) und die Öffnung des Kanals bewirkt wird (Zagotta et al. 2003, Lee und MacKinnon 2017).

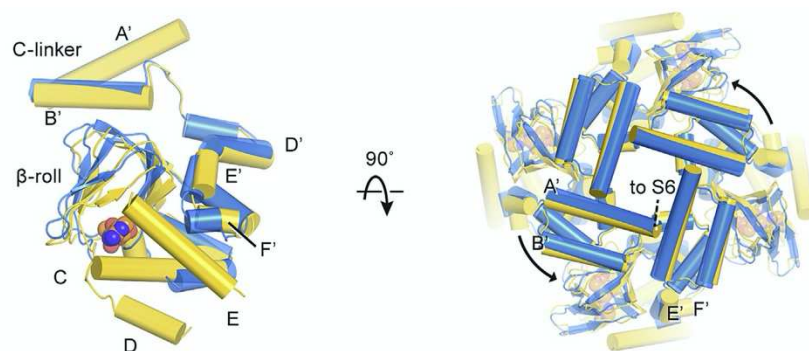


Abbildung 10. Modulation des HCN-Kanals durch cAMP.

Die Abbildung zeigt eine Überlagerung von C-Linker und CNBD in der cAMP-ungebundenen (blau) und der cAMP-gebundenen (gelb) Form. Dabei wurden die Helices als Zylinder und cAMP als Kugeln dargestellt. Die durch die Bindung von cAMP hervorgerufenen Konformationsänderungen der CNBD und folglich auch des C-Linkers bewirken eine Rotation der Verbindungen, die in einer stärkeren Öffnung der Kanalpore resultiert (rechts) (Lee und MacKinnon 2017).

Durch diese Vorgänge wird die Aktivierungskurve des Stroms in Richtung positivere Werte der Spannung verschoben, so dass der Kanal bereits bei geringeren negativen Werten der Spannung öffnet. Zusätzlich führt die Bindung der zyklischen Nukleotide zu einer beschleunigten Aktivierung und einer verlangsamten Deaktivierung (DiFrancesco und Tortora 1991). Sowohl cAMP als auch cGMP bewirken eine höhere Stromamplitude, wobei die maximale Aktivierung des Kanals bereits durch kleinere Konzentrationen von cAMP erreicht werden kann (Ludwig et al. 1998). Dennoch können die zyklischen Nukleotide allein nicht zur Öffnung des Kanals führen. Dazu benötigt es eine hyperpolarisierende Membranspannung (DiFrancesco und Tortora 1991).

Die vier verschiedenen HCN-Kanal-Subtypen unterscheiden sich bezüglich ihrer Aktivierungsgeschwindigkeit, der Spannungsabhängigkeit und dem Maß der Modulierbarkeit durch zyklische Nukleotide voneinander. Beim Vergleich der Aktivierungszeitkonstante zeigt sich bei -100 mV bei HCN4 gegenüber HCN1 eine Erhöhung um ungefähr den Faktor 40 (Ishii et al. 2001). Die Subtypen HCN2 und HCN3 reihen sich zwischen den Erstgenannten ein, so dass gesagt werden kann, dass HCN1-Kanäle am schnellsten und HCN4-Kanäle am langsamsten öffnen (Ludwig et al. 1999, Stieber et al. 2005). Dagegen lassen sich die HCN2- und die HCN4-Kanäle am besten durch cAMP modulieren, während HCN1-Kanäle nur eine geringe Verschiebung der Aktivierungskurve bei sättigender cAMP-Konzentration zeigen. Bei HCN2 und HCN4 kann in Anwesenheit der zyklischen Nukleotide die Spannung der halbmaximalen Aktivierung $V_{1/2}$ um rund 20-30 mV zu mehr hyperpolarisierenden Spannungen verschoben werden, wohingegen bei HCN1 nur Veränderungen von rund 5,6 mV gemessen werden können (Ludwig et al. 1999, Viscomi et al. 2001). Im Gegensatz dazu steht der HCN3-Kanal, der durch sich intrazellulär befindliches cAMP nicht beeinflusst werden kann (Stieber et al. 2005).

1.4.3 Vorkommen der HCN-Kanäle

HCN-Kanäle besitzen auch außerhalb der Retina in verschiedenen Geweben der Organismen zahlreiche Funktionen. Vor allem im Herzen und im Nervensystem spielen sie eine Rolle in der Informationsweiterleitung.

Alle Isoformen HCN1-4 konnten im Gehirn nachgewiesen werden, wobei die stärkste Ausprägung bei den HCN2-Kanälen liegt. Diese sind weit über das gesamte Gehirn verbreitet, während HCN1-Kanäle im Neokortex, Hippocampus, Colliculus superior und im Kleinhirn prädominieren. Die Subtypen HCN3 und HCN4 dagegen wurden konzentriert im Thalamus und im Hypothalamus lokalisiert (Notomi und Shigemoto 2004).

In den Zellen des Sinusknoten des Herzens stellt der HCN4-Subtyp den am stärksten exprimierten Kanal dar. Er ist gemeinsam mit dem am zweithäufigsten auftretenden HCN2-Kanal für die Generierung des Schrittmacherpotentials des Herzens von Bedeutung. Der HCN1-Subtyp kommt dagegen nur in geringen Konzentrationen im Sinusknoten vor (Moosmang et al. 2001). Neben diesen beiden Hauptausprägungen konnten die Kanäle auch in den β -Zellen des Pankreas (El-Kholy et al. 2007), im enterischen Nervensystem (Xiao et al. 2004), in glatten Muskelzellen der Portalvene (Greenwood und Prestwich 2002) und im Hoden (Seifert et al. 1999) nachgewiesen werden.

2 Ziele der Arbeit

Retinitis pigmentosa beschreibt eine erbliche, durch eine starke genetische Heterogenität geprägte Erkrankung der Netzhaut. Sie ist gekennzeichnet durch den progressiven Verlust der Photorezeptoren der Retina, was sich symptomatisch in einer zu Beginn fortschreitenden Nachtblindheit über im Verlauf entstehende Gesichtsfeldausfälle bis hin zum vollständigen Sehverlust der Patienten äußert (Hartong et al. 2006, Berson et al. 1985). Eine erhöhte Konzentration von zyklischem Guanosin-Monophosphat in den Photorezeptoren wird als ursächlich für den ablaufenden Pathomechanismus in der Retina angesehen (Farber und Lolley 1974). Dieses cGMP-Überangebot resultiert in einer gesteigerten Aktivität sowohl der sich in der Zellmembran der Photorezeptoren befindlichen CNG-Kanäle als auch der Proteinkinase G, die einen Mediator in zellulären Signalwegen darstellt, und führt somit zu einem vermehrten Zelltod der Photorezeptoren (Paquet-Durand et al. 2009).

Um Einfluss auf die cGMP-abhängige Zytotoxizität zu nehmen, wurde ein neuer Therapieansatz durch die Entwicklung von cGMP-Derivaten geschaffen. Diese sollen durch die Inhibition der CNG-Kanäle und der Proteinkinase G mit der Aktivierung des Zelltod-Signalwegs der Photorezeptoren interferieren (Vighi et al. 2018). Allerdings ist der genaue Wirkmechanismus der cGMP-Derivate noch nicht vollständig geklärt und das tatsächliche Target, welches für die Ergebnisse der Untersuchungen verantwortlich ist, ist in Diskussion. Sowohl die Proteinkinase G als auch durch zyklische Nukleotide gesteuerte Ionenkanäle (CNG- oder HCN-Kanäle) kommen in Frage.

Eine genauere Untersuchung der modifizierten Nukleotide auf den CNG-Kanal erfolgte in einer vorangegangenen Dissertation (Wucherpfennig 2020). Allerdings zeigten Forschungen in einer Arbeit zum Einfluss des HCN-Kanals auf das Überleben der Photorezeptoren bei *Retinitis pigmentosa* einen protektiven Effekt. Fehlte der funktionsfähige HCN-Kanal oder wurde er inhibiert, so führte dies zu einem schnelleren Fortschreiten des Krankheitsverlaufs (Schon et al. 2016). Alle vier HCN-Kanal-Isoformen werden in der Retina exprimiert und stellen somit ein potentiell Target der cGMP-Analoga dar, da sie eine Bindungsstelle für zyklische Nukleotide besitzen (Muller et al. 2003, Zagotta et al. 2003). Schön et al. schrieben dem HCN-Kanal in Bezug auf *Retinitis pigmentosa* eine Hauptfunktion für das Überleben der dysfunktionalen Photorezeptoren zu. Würden die cGMP-Derivate zu einer Inhibition der HCN-Kanäle führen, so wäre ein iatrogen induziertes schnelleres Fortschreiten der Erkrankung anzunehmen.

Ziel der Arbeit ist es daher, die cGMP-Derivate auch auf ihren Einfluss auf die HCN-Kanäle zu untersuchen. Dabei sollen die cGMP-Analoga identifiziert werden, die einen agonistischen Effekt auf den HCN-Kanal besitzen und diesen somit nicht in seiner nachgewiesenen essentiellen Funktion beeinträchtigen würden.

Dafür soll zu Beginn eine elektrophysiologische Untersuchung der Wirkung der physiologischen Liganden cAMP und cGMP auf den HCN-Kanal mittels Patch-Clamp-Methode durchgeführt werden, um Daten als Referenz zu ermitteln. Daraufhin werden die cGMP-Derivate auf ihren Einfluss auf den HCN-Kanal elektrophysiologisch charakterisiert und die Wirkung der verschiedenen cGMP-Modifikationen auf den HCN-Kanal untersucht und verglichen. Abschließend soll eine Neubewertung geeigneter cGMP-Analoga für die Therapie der *Retinitis pigmentosa* unter Einbeziehung der neuen Erkenntnisse hinsichtlich ihres Einflusses auf den HCN-Kanal erfolgen.

3 Methodik

3.1 RNA-Herstellung

Die Auswirkungen der verschiedenen Liganden auf den HCN2-Kanal wurden an Oozyten des südafrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* unter Anwendung der Patch-Clamp-Methode untersucht.

Den Oozyten wurde cRNA, die für HCN2 kodiert, injiziert, woraufhin die Zellen die Kanäle in ihrer Zellmembran exprimierten. Zur Herstellung der cRNA wurde eine cDNA des mHCN2 (HCN2 der Maus, mouse = m) benötigt, welche durch Prof. Dr. Ulrich Benjamin Kaupp (Center of Advanced European Studies and Research, Bonn) zur Verfügung gestellt wurde.

Nach Integration der cDNA in den Oozytenvektor pGemHEnew (Liman et al. 1992) folgte die Vervielfältigung im Wirt *Escherichia coli*. Daraufhin konnte die Plasmid-DNA isoliert und mit SaI (mHCN2) linearisiert werden. Danach fand die *in vitro*-Transkription der DNA in cRNA mit Hilfe des Kits mMESSAGE mMACHINE (Ambion®, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA) statt. Um mittels NanoDrop die Konzentration der cRNA zu bestimmen, wurde diese mit LiCl gefällt und in RNase-freiem H₂O gelöst. Daraufhin erfolgte die Verdünnung auf die Standardkonzentration von 100 ng/μl und schließlich die Lagerung bei -80 °C. Die Durchführung dieser molekularbiologischen Arbeiten wurde freundlicherweise von Frau Karin Schoknecht, Frau Claudia Ranke und Herrn Prof. Thomas Zimmer (Institut für Physiologie II, Jena) vollzogen.

3.2 Oozytenpräparation

Die Entnahme der Oozyten des südafrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* wurde chirurgisch unter Narkotisierung der Tiere mit 0,1% Tricainlösung (3-Aminobenzoessäure ethylester methansulfat = MS222 (Pharmaq, Fordinbridge, Großbritannien)) durchgeführt. Dabei betrug der pH-Wert der MS222-Lösung 7,1, der mit Natriumhydrogencarbonat eingestellt wurde. Daraufhin schloss sich das Schwenken der Oozyten für 105 Minuten bei 20 °C in Kollagenase-Lösung (3mg/ml Kollagenase A (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland)) in OR-2-Lösung (Tab. 1) an. Schlussendlich wurde die Follikelmembran mit Pinzetten entfernt und die Oozyten in Barth-Medium (Tab. 2) bei 18°C aufbewahrt. Die Operation stand mit dem deutschen Tierschutzgesetz unter Genehmigung des Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz am 30.08.2013 bzw. am 09.05.2018 im Einklang.

Nach einer fünf- bis zwölfstündigen Wartezeit schloss sich die Injektion der zuvor hergestellten cRNA in die Oozyten an, so dass die Zellen die mHCN2-Kanäle in ihre Zellmembran einbauen konnten. Dafür kamen Injektionspipetten zur Anwendung, die mit Hilfe eines Mikromanipulators in die Oozyten eingeführt wurden und mit manuell erzeugtem Überdruck 7-17 ng cRNA/Zelle injizierten. Zur Herstellung der Injektionspipetten wurde das Pipettenziehgerät des Modells P-97 Flaming/Brown (Sutter Instruments Company, Novato, USA) verwendet, mit dessen Hilfe Borosilikatkapillaren (Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Deutschland) mit einem Außendurchmesser von 2 mm und einem Innendurchmesser von 1,6 mm erhitzt und in zwei Hälften mit spitzem Ende geteilt und geformt wurden. Für den Erhalt einer kanülenartigen Spitzenform schloss sich das Abbrechen der Enden unter Zuhilfenahme eines dünnen Metalldrahtes unter dem Mikroskop an. Nach Beendigung des Verfahrens folgte die Inkubation der Oozyten in Barth-Medium in 24-Loch-Zellkultur-Platten bei 18 °C im Kühlbrutschrank für 2-7 Tage.

Tabelle 1. Calciumfreie OR-2-Lösung.

NaCl	82,5 mM
KCl	2 mM
MgCl ₂	1 mM
TRIS-HEPES	5 mM
pH	7,4 (NaOH)

Tabelle 2. Barth-Medium.

NaCl	84 mM
KCl	1 mM
NaHCO ₃	2,4 mM
MgSO ₄	0,82 mM
Ca(NO ₃) ₂	0,33 mM
CaCl ₂	0,41 mM
TRIS	7,5 mM
pH	7,4 (NaOH)

3.3 Patch-Clamp-Methode

3.3.1 Patch-Clamp-Messstand

Als Hauptbestandteil des Messstandes zur Durchführung der Patch-Clamp-Methode lässt sich ein inverses Mikroskop Axiovert 100 (Carl-Zeiss, Jena, Deutschland) mit Achrostigmat-Objektiven 10-facher Vergrößerung und ein Objektisch beschreiben. Letzterer beinhaltet die Messkammer mit einem Deckgläschen als Kammerboden. Die gesamte Apparatur war auf einem schwingungsfähigen Tisch befestigt und durch einen Faraday-Käfig von der Umgebung elektrisch abgeschirmt. An der seitlichen Wand des Käfigs wurde über Magnete eine Halterung

mit 10-ml-Spritzen angebracht, in die die Badlösung (Tab. 3) und die verschiedenen Ligandenkonzentrationen (Tab. 4) eingefüllt wurden. Von den Spritzen liefen dünne Kunststoffschläuche aus PTFE (Polytetrafluorethylen) zum Zuflusssystem der Messkammer, welches aus gekürzten, im Außendurchmesser 6 mm dicken Kanülen aus Chrom-Nickelstahl (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) bestand.

Die Messpipette wurde in einem Pipettenhalter befestigt. Dieser wiederum konnte durch einen Mikromanipulator (Unit MRE/MLE (3 axes Mini 25)) mit Fernsteuereinheit SM1 (Luigs & Neumann Feinmechanik und Elektrotechnik GmbH, Ratingen, Deutschland) in seiner Position verändert werden, um die optimale Einstichstelle in die Oozyte einstellen zu können. Des Weiteren bestand eine Verbindung zwischen dem Pipettenhalter und einer 5-ml-Spritze durch einen flexiblen Kunststoffschlauch und einen Drei-Wege-Hahn, worüber es möglich war, den Druck im Pipettenhalter zu regulieren.

Als Beleuchtung diente eine Kaltlichtquelle. Während die Badelektrode aus einem Silberchloridpellet (Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) bestand, wurde für die Pipettenelektrode ein chlorierter Silberdraht genutzt.

Während der Messung erfolgte die Weiterleitung des Signals des Vorverstärkers zum Verstärker. Dort wurden die Signale mit Hilfe des Programms PatchMaster (HEKA Elektronik, Lamprecht, Deutschland) aufgezeichnet und auf einem Bildschirm sichtbar gemacht.

3.3.2 Patch-Clamp-Messung

Zur Vorbereitung auf die Messung musste im ersten Schritt die Vitellinmembran der Oozyte mit Hilfe von Pinzetten unter einem Stereomikroskop abgestreift werden. Somit wurde erreicht, dass die Zellmembran in einem späteren Abschnitt unmittelbar von der Pipette berührt werden konnte. Weiterhin wurde die Oozyte unter Zuhilfenahme einer Glaspipette in die Messkammer gelegt, die mit Badlösung gefüllt war.

Quarzglaskapillaren (Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) mit einem Außendurchmesser von 1 mm und einem Innendurchmesser von 0,7 mm dienten als Messpipetten, die mit Hilfe eines Pipettenziehgeräts des Typs P-2000 Laser Based (Sutter Instruments Company, Novato, USA) über zwei Heizschritte hergestellt wurden. Unter Verwendung einer Spritze mit Spritzenvorsatzfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm (Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne Cedex, Frankreich) wurde die Pipettenlösung (Tab. 5) in die Messpipette überführt, welche daraufhin im Pipettenhalter befestigt wurde.

Die Durchführung der Messungen erfolgte in der *Inside-out*-Konfiguration. Dies bedeutet, dass die intrazelluläre Seite der Plasmamembran dem Applikationssystem zugewandt ist und mit

verschiedenen Lösungen umspült werden kann. Das intrazelluläre Milieu der Zelle hat somit keinen Einfluss mehr auf die HCN2-Kanäle.

Ein Überdruck wurde in der Messpipette angelegt, noch bevor diese in die Badlösung eintauchte. Damit sollte einer Verschmutzung der Pipettenöffnung vorgebeugt werden. Daraufhin wurde die Pipettenspitze mit Hilfe des Mikromanipulators unmittelbar an die Zellmembran herangeführt und nach Kontakt mit der Zelloberfläche der Überdruck wieder aus der Pipette entlassen. Ziel dabei war es, eine sehr enge Verbindung mit hohem elektrischem Widerstand zwischen der Wand der Messpipette und der Oozytenmembran herzustellen. Diese wird auch Gigaseal genannt und stellt eine Voraussetzung für die Durchführung der Messung dar. In einigen Fällen kam es zur Spontanausbildung des Gigaseals, andernfalls bildete er sich durch Anlegen eines leichten Unterdrucks aus. Um nun die *Inside-out*-Konfiguration zu erreichen, wurde die Pipette schnell von der Eizelle zurückgefahren und es verblieb ein Stück der Membran an der Pipettenspitze, welches sich in deren Öffnung aufspannte. Dieser Vorgang wird auch Exzidieren genannt.

Nun konnte die Pipette langsam vor das Zuflusssystem gefahren und dem Experiment entsprechend die Lösungen appliziert werden. Zu Beginn wurde der rein spannungsabhängige Strom ermittelt, bei dem sich keine Liganden in der Lösung befanden. Danach wurde die Pipette auf die Position mit dem Zufluss der sättigenden cAMP-Konzentration eingestellt, so dass die maximale Kanalaktivität herausgefunden werden konnte. Im Folgenden konnten nun die Auswirkungen der verschiedenen Liganden und Konzentrationen auf den Strom der Kanäle getestet werden.

Tabelle 3. Bad-Lösung.

KCl	100 mM
EGTA	10 mM
HEPES	10 mM
pH	7,2 (KOH)

Tabelle 4. Verwendete Ligandenkonzentrationen (BIOLOG LSI GmbH, Bremen).

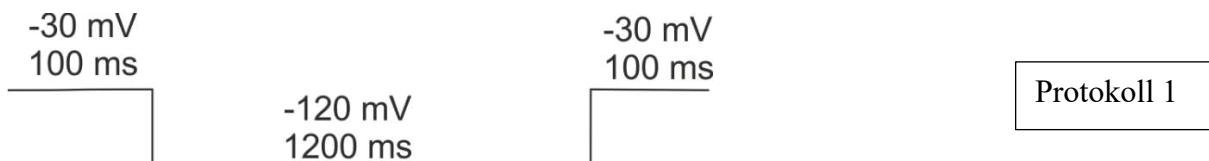
cAMP	1 nM, 10 nM, 1 μ M, 10 μ M
cGMP	0,05 μ M; 0,25 μ M; 0,5 μ M; 5 μ M; 50 μ M; 500 μ M
PET-cGMP	50 μ M
Rp-8-pCPT-cGMPS	50 μ M
Rp-8-Br-PET-cGMPS	0,001 μ M; 0,01 μ M; 0,1 μ M; 1 μ M; 10 μ M; 50 μ M
Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS	50 μ M
Rp-(2-N)ET-cGMPS	50 μ M

Tabelle 5. Pipetten-Lösung.

KCl	120 mM
CaCl ₂	1 mM
HEPES	10 mM
pH	7,2 (KOH)

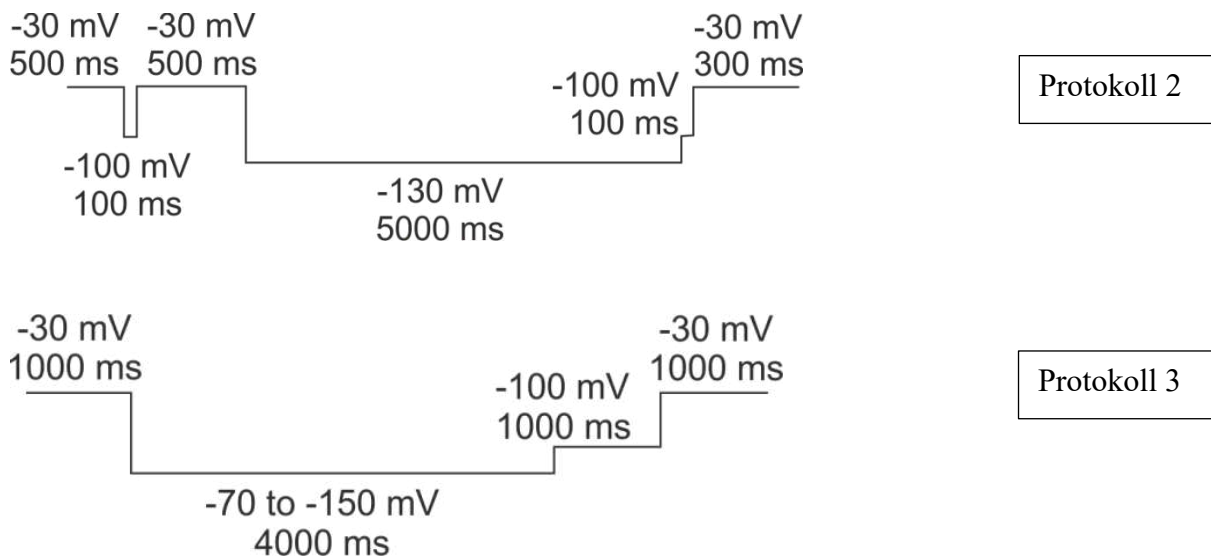
3.3.3 Messprotokoll

Für die Durchführung und Aufzeichnung der Patch-Clamp-Messungen wurde das Programm PatchMaster mit drei verschiedenen Messprotokollen verwendet. Mit der Berührung der Pipettenspitze an die Zellmembran und der Ausbildung eines Gigaseals stellte sich die sogenannte *Cell-attached*-Konfiguration ein, bei der das sich innerhalb der Pipette befindliche Membranstück noch intakt und im Membranverband verankert ist. Um den Strom in dieser Konfiguration noch vor dem Exzidieren zu überprüfen, wurde Protokoll 1 genutzt. Hierbei wurde für 100 ms eine Spannung von -30 mV angelegt, auf die für 1,2 Sekunden -120 mV folgten. Daraufhin schlossen sich erneut für 100 ms -30 mV an. Die Sampling-Rate betrug 5 kHz.



In der *Inside-out*-Konfiguration konnten nun die Dosis-Wirkungs-Kurven (Protokoll 2) und die Strom-Spannungs-Beziehungen (Protokoll 3) erstellt werden. Hier betrug die Sampling-

Raten 2 kHz. Dem Schema sind die aufeinanderfolgenden Spannungen mit der entsprechenden Zeitdauer zu entnehmen.



Zwischen den einzelnen Traces wurde eine Wartezeit von 15 Sekunden eingehalten.

3.4 Datenanalyse

Zu Beginn der Datengenerierung wurde der Einfluss der Liganden cAMP und cGMP auf das Schaltverhalten des HCN2-Kanals untersucht. Hierzu wurden zuerst mit den Konzentrationen 1 nM, 10 nM, 1 μ M und 10 μ M die Stromkurven über die Zeit für cAMP gemessen. Dabei zeigte sich eine maximale Aktivierung des Kanals bei 10 μ M cAMP, so dass dieser Wert als Referenzwert für den Vergleich mit cGMP und den modifizierten Liganden genutzt werden konnte. Nun schlossen sich die gleichen Messuntersuchungen für cGMP mit den Konzentrationen 0,05 μ M; 0,25 μ M; 0,5 μ M; 5 μ M; 50 μ M und 500 μ M im Vergleich mit 10 μ M cAMP an. Für cGMP erfolgte dabei sowohl die Erstellung von Dosis-Wirkungs- als auch von Strom-Spannungs-Kurven.

Fünf modifizierte Liganden wurden auf ihre Wirkung auf den HCN2-Kanal untersucht: PET-cGMP, Rp-8-pCPT-cGMPS, Rp-8-Br-PET-cGMPS, Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS und Rp-(2-N)ET-cGMPS. Dabei erfolgte die Applikation von jeweils 50 μ M der einzelnen Liganden für die Erstellung von Strom-Spannungs-Kurven. Für Rp-8-Br-PET-cGMPS wurde zusätzlich die Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt. Dabei standen folgende Konzentrationen unter Verwendung: 0,001 μ M; 0,01 μ M; 0,1 μ M; 1 μ M und 10 μ M.

Die gemessenen Ströme sollten nun unabhängig vom elektrochemischen Gradienten über dem Patch ausgewertet werden. Dafür erfolgte die Quantifizierung des sogenannten Tail-Stroms, der auf die variable Kommandospannung als Testspannung von 100 mV folgt. Die Korrektur aller Ströme fand durch den Leckstrom statt, dessen Messung bei einer nicht-kanalaktivierenden Spannung von -70 mV erfolgte. Dieser Leckstrom wurde von den anderen Testströmen abgezogen, woraufhin die korrigierten Testströme auf den Maximalstrom I_{max} normiert werden konnten.

In den Experimenten wurden, wie bereits erwähnt, zum einen die Abhängigkeit der Kanalaktivierung von der Ligandenkonzentration bei vorgegebener Spannung (Dosis-Wirkungs-Beziehung) und zum anderen die Abhängigkeit der Kanalaktivierung von der Spannung in ligandenfreier Lösung bzw. bei sättigender Ligandenkonzentration (Strom-Spannungs-Beziehung) bestimmt.

Die Ligandenabhängigkeit konnte beschrieben werden, indem die einzelnen Konzentrationen des Liganden bei gleichbleibender Spannung gegen die normierten Stromamplituden, die der Aktivierung des Kanals entsprechen, logarithmisch aufgetragen wurden. Somit entstand ein I/I_{max} -Konzentrations-Diagramm. Zusätzlich erfolgte die Annäherung der Hill-Funktion (Gleichung 1) an die experimentellen Daten (Kusch et al. 2010).

$$\frac{I}{I_{max}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{x}\right)^H}$$

Gleichung 1. Modifizierte Hill-Funktion.

I = Stromamplitude, I_{max} = maximaler Strom bei sättigender Ligandenkonzentration, EC_{50} = Konzentration bei halbmaximalem Effekt, x = Konzentration des Liganden, H = Hill-Koeffizient.

Um einen Vergleich des Einflusses der getesteten Liganden auf das Schaltverhalten der HCN2-Kanäle vornehmen zu können, waren die halbmaximale Aktivierungsdosis EC_{50} und der Hill-Koeffizient von Bedeutung. Deren Werte konnten aus der oben genannten Gleichung bestimmt werden und gaben Aufschluss über die Konzentration des Liganden, die vorliegen muss, um den Kanal halbmaximal zu aktivieren (EC_{50}) bzw. stellten ein Maß für die Kooperativität der einzelnen Untereinheiten des HCN2-Kanals dar (H).

Anhand der Untersuchungen zur Spannungsabhängigkeit des HCN2-Kanals sollte die jeweilige Spannung $V_{1/2}$ identifiziert werden, bei der der Kanal durch den jeweiligen Liganden halbmaximal aktiviert war. Dafür erfolgte der Vergleich der Messreihe unterschiedlicher Kommandospannungen einer Messung ohne Liganden mit der Messreihe unterschiedlicher Kommandospannungen einer Messung bei Zugabe des Liganden. Aus diesem Vergleich konnte

daraufhin geschlossen werden, wie sich die Spannung bei halbmaximaler Aktivierung des Kanals verschiebt, wenn ein Ligand an den Kanal bindet und der Kanal somit eine erhöhte Aktivierungsbereitschaft besitzt.

Mithilfe des Programmes OriginPro 8.1G wurde eine Regression durchgeführt, so dass eine Übertragung der Daten in eine passende I / I_{\max} - V -Funktion gelingen konnte. Dafür wurde die modifizierte Boltzmann-Funktion (Gleichung 2) verwendet (Kusch et al. 2010).

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

Gleichung 2. Modifizierte Boltzmann-Gleichung.

I = Stromamplitude, I_{\max} = maximaler Strom bei sättigender Ligandenkonzentration, $I_{\max, \text{satcAMPVoltage}}$ = maximaler Strom in Anwesenheit von cAMP, e = Eulersche Zahl, $z\delta$ = Maß für den Anstieg der Kurve und die Kooperativität der Kanal-Untereinheiten, F = Faraday-Konstante, V = Spannung, $V_{1/2}$ = Spannung bei halbmaximaler Aktivierung, R = Gaskonstante, T = Temperatur (Raumtemperatur).

Für die statistische Auswertung kam der t-test (Student's-test) in allen Fällen zur Anwendung. Der Standardfehler des arithmetischen Mittels wurde für die Mittelwerte bestimmt. Mit dem Programm OriginPro 8.1G konnten die ermittelten Daten statistisch analysiert werden.

Die Erstellung von Abbildungen und Diagrammen für den Ergebnisteil diente der Veranschaulichung der gewonnenen Daten. Neben einer exemplarischen Stromspur für die jeweils durchgeführten Messungen werden in dieser Arbeit die einzelnen Ergebnisse der maximalen Stromaktivierung hervorgerufen durch die Applikation des Liganden auch in einem Box-Plot abgebildet. Dabei erfolgt die Darstellung der Ergebnisse jeweils im Vergleich zu den Werten bei Abwesenheit der Liganden und bei Zufuhr von cAMP als Referenz oder im Vergleich der einzelnen Liganden untereinander. In der Abbildung selbst stellt die Box die Standardabweichung, das Kästchen den Mittelwert und die Punkte die verschiedenen Einzelmessungen dar. In anderen Diagrammen wird für die einzelnen Liganden die Abhängigkeit der Stromamplitude (bezogen auf den Strom bei -140 mV) von der anliegenden Spannung oder der Vergleich von Dosis-Wirkungs-Kurven der einzelnen Liganden gezeigt. Auch die Abhängigkeit der Konzentration der Liganden von $V_{1/2}$ wird für einzelne Liganden in einem Diagramm dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Wirkung von cGMP auf HCN-Kanäle

Sowohl cAMP als auch cGMP stellen natürlich vorkommende, zyklische Nukleotide dar. Beide *Second messenger* sind dazu in der Lage, eine direkte Interaktion mit dem HCN-Kanal einzugehen und damit dessen Schaltverhalten zu modulieren. Hierbei reagiert der Kanal allerdings sensitiver auf cAMP als auf cGMP (DiFrancesco und Tortora 1991). Da die Regulation des HCN-Kanals durch cGMP bisher weniger beschrieben wurde, erfolgte einfürend ein Vergleich der beiden zyklischen Nukleotide hinsichtlich ihrer Einflussnahme auf das Schaltverhalten des HCN-Kanals.

Bei der Auswertung der Ergebnisse werden zum Vergleich der verschiedenen Liganden zwei Parameter herangezogen: Potenz und Effektivität. Dabei bezieht sich Potenz auf die Spanne einer Konzentration, in der der Ligand eine Wirkung auf den Kanal zeigt. In dieser Arbeit repräsentiert der EC_{50} -Wert als Konzentration der halbmaximalen Aktivierung die Potenz der Liganden. Bei der Effektivität handelt es sich um die Wirkung, die der Ligand maximal am Kanal hervorrufen kann. Hierbei wird zusätzlich unterschieden, wie effektiv die Liganden einerseits die Stromamplitude erhöhen (I / I_{max}) und andererseits wie effektiv sie die halbmaximale Spannung $V_{1/2}$ verschieben können. Dies folgt den Definitionen der Dualen Reihe Pharmakologie und Toxikologie (Graefe 2016).

4.1.1. Wirkung von cGMP auf den HCN1-Kanal

Alle vier Isoformen des HCN-Kanals werden in der Retina exprimiert, wobei sich HCN1 als der prädominante Subtyp sowohl in den Stäbchen als auch in den Zapfen herausstellte (Muller et al. 2003). Elektrophysiologische Untersuchungen zur Beeinflussbarkeit des HCN1-Kanals durch zyklische Nukleotide zeigten jedoch, dass diese Isoform nicht bzw. nur geringfügig durch zyklische Nukleotide moduliert werden kann (Viscomi et al. 2001). Um zu überprüfen, ob dies auch unter den bei dieser Arbeit herrschenden experimentellen Bedingungen gilt, wurden zu Beginn Messungen zur Erforschung der Einflussnahme des Schaltverhaltens von cGMP auf den HCN1-Kanal durchgeführt (Abb. 11). Dabei erfolgte der Vergleich des gemessenen Stroms bei Applikation von 500 μ M cGMP mit dem Strom in Abwesenheit des Liganden. Es zeigte sich eine identische Stromantwort in (Abb. 11A).

Die Spannung, die zur halbmaximalen Aktivierung des HCN1-Kanals notwendig war, betrug bei der Zugabe von cGMP $-92,8 \pm 0,8$ mV und in Abwesenheit des Liganden $-92,8 \pm 1,1$ mV. Die Werte unterschieden sich also nicht (Abb. 11B, C). Demzufolge konnte davon ausgegangen werden, dass durch die Ligandenzufuhr die durch die Spannung applizierte Energie zur Kanalaktivierung nicht vermindert werden konnte. Somit konnte die fehlende Wirkung von cGMP auf das Schaltverhalten des HCN1-Kanals bestätigt werden.

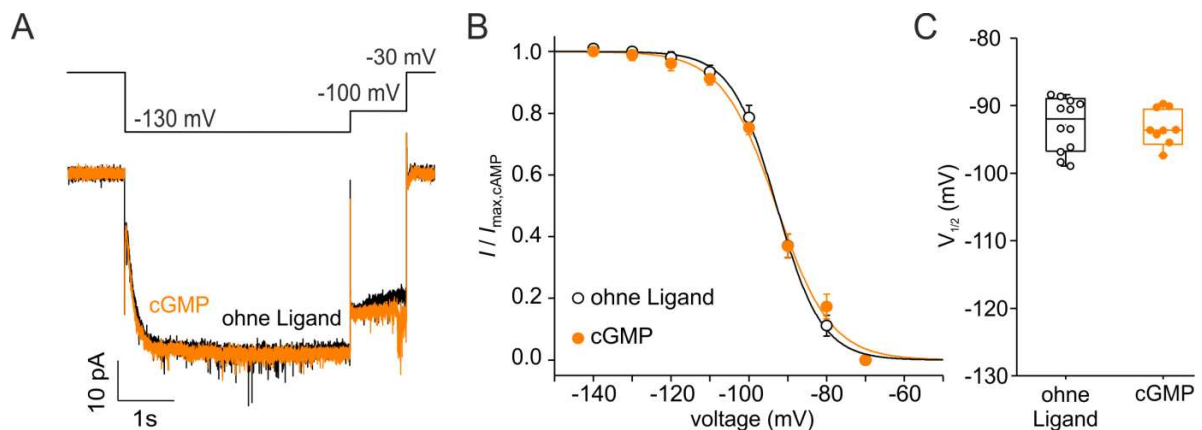


Abbildung 11. HCN1 kann nicht durch cGMP moduliert werden.

- A) Abgebildet ist eine exemplarische Stromantwort des HCN1-Kanals bei der Applikation von cGMP (orange) im Vergleich zu keiner Ligandenzufuhr (schwarz). Die Kurven unterschieden sich nicht.
- B) Die Abbildung zeigt die Abhängigkeit der Stromamplitude (bezogen auf den Strom bei -140 mV) von der anliegenden Spannung. Es ist ersichtlich, dass durch die Applikation von cGMP (orange) keine Rechtsverschiebung der Kurve erreicht wird.
- C) Dargestellt ist ein Box-Plot für die $V_{1/2}$ -Werte bei keiner Ligandenzufuhr (schwarz) und bei sättigender cGMP-Konzentration (orange). Im Vergleich stellte sich kein Unterschied heraus.

4.1.2. Wirkung von cGMP auf den HCN2-Kanal

Da in der Literatur bereits beschrieben wurde, dass der HCN2- und der HCN4-Kanal am sensitivsten auf cAMP reagieren, die HCN2-Isoform allerdings in der Aktivierungskinetik den schnelleren Strom aufweist, erfolgten alle weiteren Untersuchungen am HCN2-Kanal (Ludwig et al. 1999).

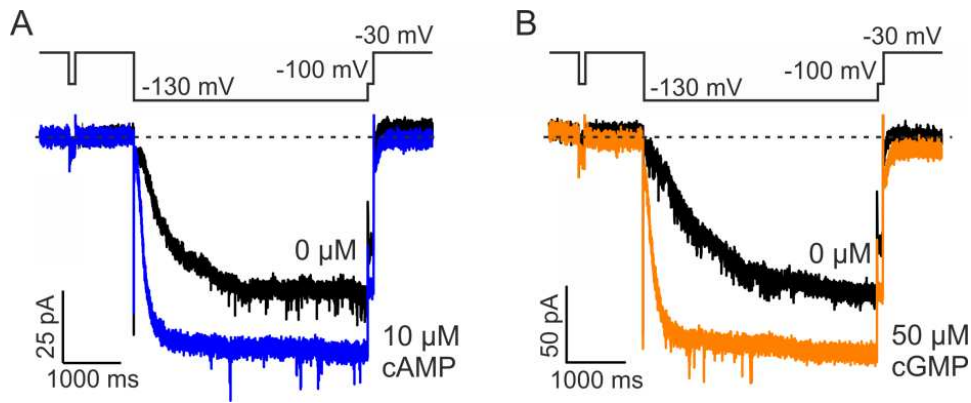


Abbildung 12. Exemplarische Stromantworten für cAMP und cGMP.

Abgebildet ist eine exemplarische Stromantwort nach Applikation von A) 10 μM cAMP (blau) und B) 50 μM cGMP (orange) im Vergleich zu einer Stromantwort ohne Ligandenzufuhr (schwarz). Darüber befindet sich das verwendete Spannungsprotokoll.

Auch in den für diese Arbeit durchgeführten Messungen wurde eine Aktivierung des HCN2-Kanals unter unseren Bedingungen für beide Liganden sichtbar. Durch die Applikation verschieden hoher Konzentrationen zeigte sich eine Erhöhung der Stromamplitude und eine Beschleunigung der Stromkinetik sowohl bei cAMP als auch bei cGMP (Abb. 12).

Für die Erstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen erfolgte die Zufuhr von cGMP bzw. cAMP unterschiedlicher Konzentrationen in einem weiten Konzentrationsbereich. Dazu wurden die Ströme auf einen Referenzwert von 10 μM cAMP normiert (I / I_{max}), da bei diesem Wert eine maximale Aktivierung des Kanals vorlag. Daraufhin wurde die Hill-Funktion an die gemittelten I / I_{max} -Daten angepasst, um den EC_{50} -Wert und den Hill-Koeffizienten (H) zu bestimmen. Während der HCN2-Kanal bei einer Konzentration (c) von $c = 0,027 \mu\text{M}$ cAMP halbmaximal aktiviert war, benötigte es dagegen 0,189 μM cGMP zum Erreichen des halbmaximalen Stroms (Abb. 13A).

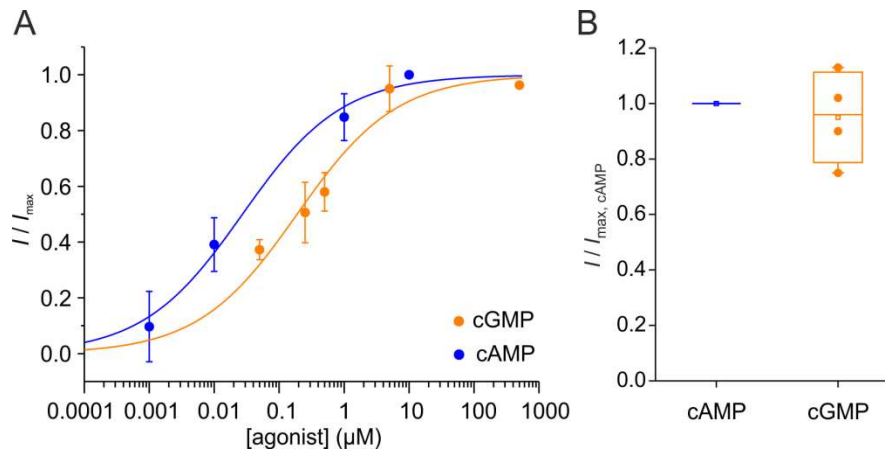


Abbildung 13. Aktivierung des HCN2-Kanals durch cAMP und cGMP.

A) Verglichen werden die Konzentrations-Wirkungs-Kurven von cAMP (blau) und cGMP (orange). Die Graphen stellen die Ergebnisse der Anpassung der Hill-Funktion dar. Es konnten EC_{50} -Werte von $0,027 \mu M$ für cAMP und $0,189 \mu M$ für cGMP berechnet werden. cGMP zeigte eine geringere Potenz als cAMP in der halbmaximalen Aktivierung des HCN2-Kanals.

B) Abgebildet ist ein Box-Plot für die maximale Stromaktivierung bei sättigender Liganden-Konzentration in Bezug zur Stromaktivierung nach Applikation von sättigendem cAMP. cGMP erreichte die gleiche maximale Stromaktivierung wie cAMP.

Der Hill-Koeffizient dient der Beschreibung des Anstiegs der Kurve und ist ein Maß für die Kooperativität der einzelnen Untereinheiten des Kanals bei Bindung und Aktivierung. Er betrug für die Untersuchungen sowohl mit cAMP als auch mit cGMP $H = 0,57$. Diese Werte geben einen Hinweis darauf, dass die Untereinheiten während des Schaltvorgangs nicht miteinander kooperieren. Allerdings steht die Aussagekräftigkeit dieses Parameters in Diskussion (Biskup et al. 2007).

Um eine Aussage über die Effektivität des Liganden cGMP gegenüber cAMP treffen zu können, wurden die maximalen Stromamplituden bei sättigender Konzentration der beiden zyklischen Nukleotide ins Verhältnis gesetzt ($I_{max,-cGMP} / I_{max,-cAMP}$). Hierbei lag der Mittelwert bei $0,95 \pm 0,08$ (Abb. 13B).

Zur Analyse der Spannungsabhängigkeit des Kanals in Anwesenheit und Abwesenheit von cAMP bzw. cGMP erfolgte die Applikation verschiedener Spannungen bei einer zuvor festgelegten Konzentration des zyklischen Nukleotids. Daraufhin konnten die Strom-Spannungs-Beziehungen durch die Normierung der Ströme auf den Wert bei -140 mV erstellt werden (Abb. 14). Zur Bestimmung der Spannung der halbmaximalen Aktivierung ($V_{1/2}$) und $z\delta$ als ein Maß für den Anstieg der Kurve und für die Kooperativität der Untereinheiten wurde die Boltzmann-Funktion an die Daten der Einzelmessungen angepasst. Dabei gibt $V_{1/2}$ die Spannung an, die bei gleichzeitiger Ligandenbindung anliegen muss, um eine halbmaximale Aktivierung des Kanals zu erzeugen. Je positiver (weniger negativ) hierbei die Werte erscheinen, umso weniger Spannungsenergie wird zur Öffnung des Kanals benötigt. Während

bei einer Konzentration von 10 μM cAMP eine Spannung von $-101,6 \pm 2,9$ mV zur halbmaximalen Aktivierung des Kanals notwendig war, lag der Wert für cGMP bei einer Konzentration von 500 μM bei $V_{1/2} = -100,1 \pm 2,1$ mV. Die Differenz der $V_{1/2}$ -Werte in Bezug auf die Spannung der halbmaximalen Aktivierung des Kanals ohne Ligandenzufuhr ($V_{1/2,\text{ohne Ligand}} - V_{1/2,\text{-cAMP bzw. cGMP}}$) stellt ebenfalls ein Maß für die Effektivität des zyklischen Nukleotids dar, da dadurch die Fähigkeit des Liganden, die Kurve zu positiveren Werten der Spannung zu verschieben, ersichtlich wird. Dafür ließen sich $\Delta V_{1/2}$ -Werte für cAMP von $19,8 \pm 1,90$ mV und für cGMP von $16,4 \pm 1,80$ mV bestimmen. Folglich lässt sich feststellen, dass cGMP ähnlich effektiv wie cAMP die Spannungsenergie verringerte, die es zur Öffnung des HCN2-Kanals benötigte.

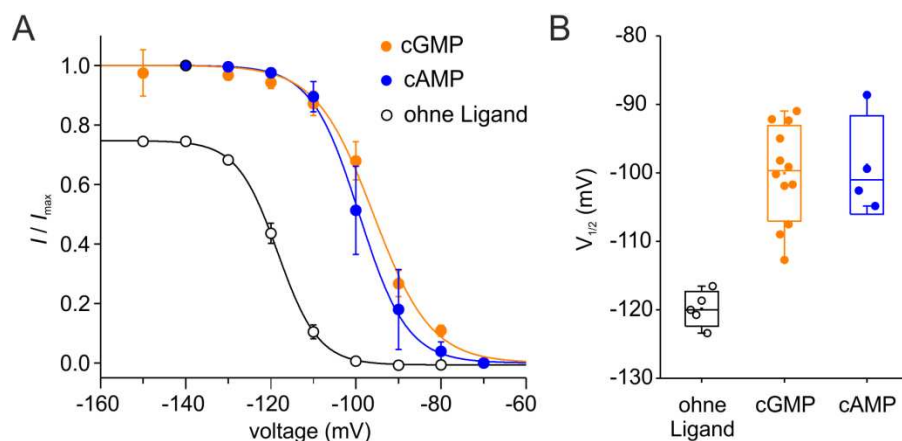


Abbildung 14. Strom-Spannungs-Beziehung für cAMP und cGMP.

A) Die Abbildung zeigt die Abhängigkeit der Stromamplitude (bezogen auf den Strom bei -140 mV und 10 μM cAMP) von der anliegenden Spannung. Daraus wird ersichtlich, dass cGMP (orange) im gleichen Maße wie cAMP (blau) die Kurve ausgehend von der Kontrolle ohne Ligandenapplikation (schwarz) nach rechts verschieben konnte.

B) Im Box-Plot ist der Vergleich der $V_{1/2}$ -Werte ohne Ligandenzufuhr (schwarz, $V_{1/2} = -121,2 \pm 1,9$ mV), für cGMP (orange, $V_{1/2} = -100,1 \pm 2,1$ mV) und für cAMP (blau, $V_{1/2} = -101,6 \pm 2,9$ mV) dargestellt. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den applizierten Liganden.

Anhand der $\Delta V_{1/2}$ -Werte ließ sich die Potenz der zyklischen Nukleotide messen. Dies wurde für cGMP realisiert. Dafür erfolgte die Bestimmung der Strom-Spannungs-Kurven am HCN2-Kanal für die Konzentrationen 5 μM , 50 μM und 500 μM cGMP im Vergleich zu keiner Ligandenapplikation (Abb. 15). Hierbei zeigte sich, dass mit steigender cGMP-Konzentration auch die Stromkurve zu immer positiveren Werten der Spannung verschoben wird. Aus den Daten konnte erneut ein EC_{50} -Wert bestimmt werden, der die Ligandenkonzentration anzeigt, die eine halbmaximale Verschiebung der Spannung erzeugt. Diese betrug $EC_{50} = 11,7$ μM . Zusätzlich konnte ein Hill-Koeffizient von $H = 1,47$ bestimmt werden.

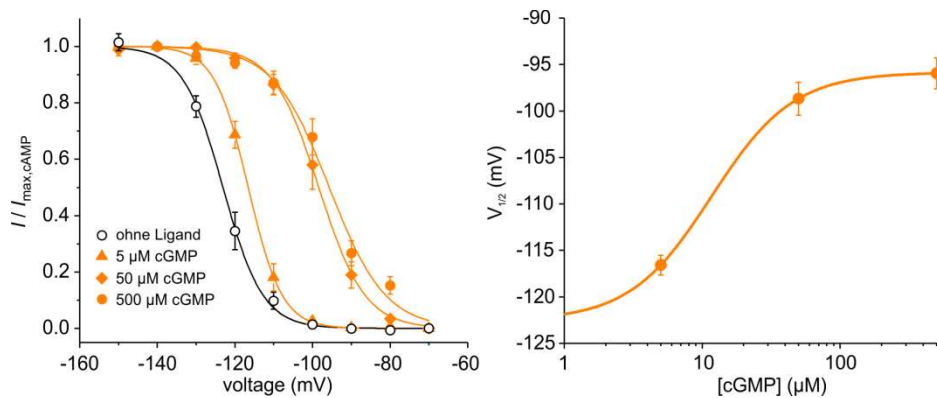


Abbildung 15. Konzentrationsabhängigkeit von $V_{1/2}$ für cGMP.

A) In der Abbildung erfolgte die Auftragung der Spannung im Verhältnis zum Quotienten aus den maximalen Strömen der verschiedenen applizierten Konzentrationen cGMP und cAMP. Mit steigender Konzentration konnte die Stromkurve zu immer positiveren Spannungswerten verschoben werden.

B) Dargestellt sind die cGMP-Konzentrationen mit ihren zugehörigen Spannungen $V_{1/2}$, die zur halbmaximalen Aktivierung des HCN2-Kanals führten. Mit steigender Konzentration war eine geringere anliegende Spannung nötig, um den HCN2-Kanal halbmaximal zu aktivieren.

Der $z\delta$ -Wert gilt als ein Maß für den Anstieg der Kurve und dient der Untersuchung der Kooperativität der Untereinheiten des Kanals. Es konnten Werte von $z\delta = 4,66 \pm 0,47$ für cAMP und $z\delta = 5,83 \pm 0,59$ für cGMP berechnet werden.

Zusammenfassend stellt cGMP einen effektiven Liganden des HCN2-Kanals dar, allerdings besitzt es eine geringere Potenz als cAMP in der Beeinflussung des Schaltverhaltens des Kanals.

Tabelle 6. Vergleich der Ergebnisse zwischen cAMP und cGMP.

	cAMP	cGMP
$I_{\max,-cGMP} / I_{\max,-cAMP}$		$0,95 \pm 0,08$
$V_{1/2}$ (in mV)	$-101,6 \pm 2,9$	$-100,1 \pm 2,1$
$\Delta V_{1/2}$ (in mV)	$19,8 \pm 1,90$	$16,4 \pm 1,80$
$z\delta$	$4,66 \pm 0,47$	$5,83 \pm 0,59$
EC_{50} (in μM) für die Stromerhöhung	0,027	0,189
H	0,57	0,57
EC_{50} (in μM) für die $V_{1/2}$ -Verschiebung		11,7
H		1,47

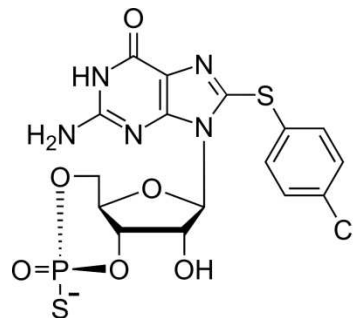
4.2 Wirkung der Rp-cGMPS-Derivate

Als cGMPS-Derivate werden alle cGMP-Analoga bezeichnet, bei denen eines der beiden exozyklischen Sauerstoff-Atome des zyklischen Phosphatrests durch ein Schwefel-Atom modifiziert wurde. Das „R“ gibt den Austausch des äquatorialen Sauerstoff-Atoms durch ein Schwefel-Atom an. Das „p“ definiert die Konfiguration der funktionellen Gruppe bezüglich der Chiralität. Für die zu testenden Derivate wurde für jede Messung eine Konzentration von 50 μM verwendet.

4.2.1 Wirkung von Rp-8-pCPT-cGMPS

Das cGMP-Derivat Rp-8-pCPT-cGMPS (C013) erhielt im Austausch gegen ein Wasserstoff-Atom an Position 8 der Nukleinbase einen para-Chlorthiophenol-Rest. Zudem wurde das äquatorial gelegene Sauerstoff-Atom durch ein Schwefel-Atom ersetzt.

Schema 1. Rp-8-pCPT-cGMPS.



In Folge der Untersuchungen des cGMP-Derivats Rp-8-pCPT-cGMPS auf den HCN2-Kanal kann festgestellt werden, dass dieser modifizierte Ligand ebenfalls den Kanal aktivierte (Abb. 16A). Zur Bestimmung der Effektivität des Liganden gegenüber cAMP erfolgte die Ermittlung des Quotienten aus den Werten der maximalen Stromaktivierung ($I_{\text{max,-Rp-8-pCPT-cGMPS}} / I_{\text{max,-cAMP}}$), bei der ein Wert von $0,96 \pm 0,05$ errechnet wurde. Rp-8-pCPT-cGMPS erhöht somit den Strom des HCN2-Kanals mit der gleichen Effektivität wie cAMP (Abb. 16B).

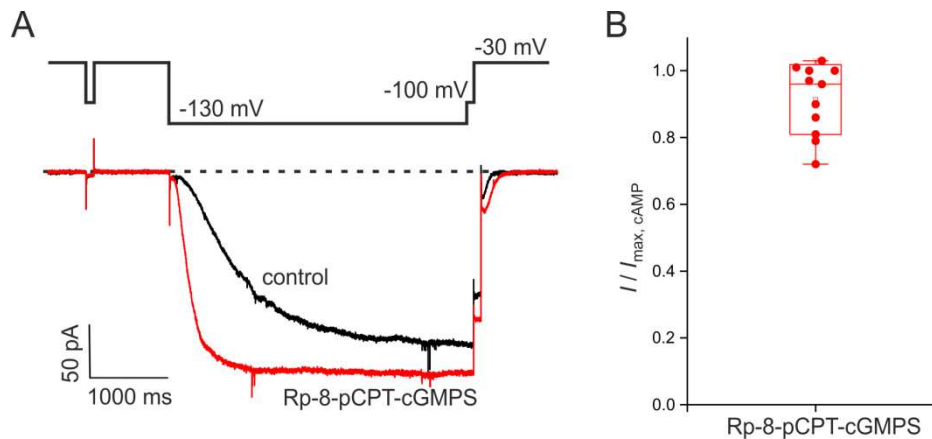


Abbildung 16. Rp-8-pCPT-cGMPS hat einen agonistischen Effekt auf den HCN2-Kanal.

A) Abgebildet ist eine exemplarische Stromantwort nach Applikation von 50 μM Rp-8-pCPT-cGMPS (rot) im Vergleich zu einer Stromantwort ohne Ligandenzufuhr (schwarz). Darüber befindet sich das verwendete Spannungsprotokoll.

B) Die Abbildung zeigt einen Box-Plot für die maximale Stromaktivierung des HCN2-Kanals hervorgerufen durch die Applikation von Rp-8-pCPT-cGMPS. Das Kästchen stellt den Mittelwert, die Punkte die verschiedenen Einzelmessungen dar. Rp-8-pCPT-cGMPS (rot) erreichte nahezu die gleiche maximale Stromaktivierung wie cAMP (schwarz).

Nach der Gewinnung dieser Erkenntnis wurde auch die Strom-Spannungs-Beziehung für 50 μM Rp-8-pCPT-cGMPS untersucht (Abb. 17). Dabei betrug bei Applikation des cGMP-Derivats die Spannung, die zur halbmaximalen Aktivierung des HCN2-Kanals bei gleichzeitiger Ligandenbindung benötigt wurde, $V_{1/2} = -97,8 \pm 1,7$ mV.

Die Effektivität des modifizierten Nukleotids zeigt sich jedoch erst in der Verschiebung der halbmaximalen Spannung $V_{1/2}$ hin zu positiveren Werten im Vergleich zum Ausgangswert ohne Ligandenapplikation. Für jede individuelle Messung wurde die Subtraktion für $V_{1/2, \text{-ohne Ligand}} - V_{1/2, \text{-Rp-8-pCPT-cGMPS}}$ durchgeführt und daraufhin die einzelnen $\Delta V_{1/2}$ -Werte gemittelt.

Somit ergab sich eine Differenz von $17,0 \pm 0,8$ mV. Im Vergleich dazu steht die errechnete Differenz bei der Zufuhr von cAMP mit $19,8 \pm 1,9$ mV, was zeigt, dass das cGMP-Derivat Rp-8-pCPT-cGMPS mit der gleichen Effektivität die Spannungsabhängigkeit des HCN2-Kanals verschieben kann wie cAMP.

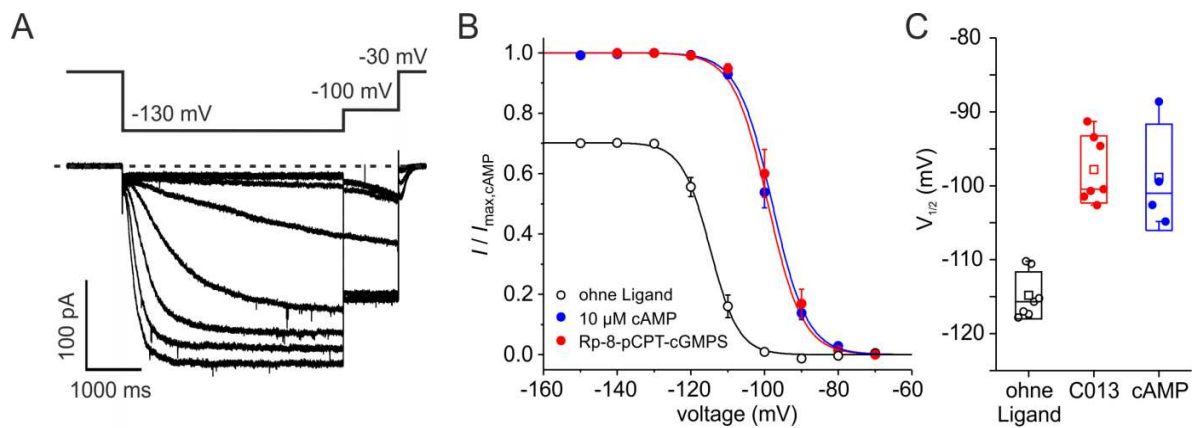


Abbildung 17. Strom-Spannungs-Beziehung von Rp-8-pCPT-cGMPS.

A) Dargestellt sind exemplarische Stromspuren bei der Applikation von 50 μM Rp-8-pCPT-cGMPS bei schrittweise zunehmender Spannung (10 mV-Schritte). Dazu wurde das verwendete Spannungsprotokoll angegeben.

B) Aufgetragen sind die relevanten Ströme in Abhängigkeit von der angelegten Spannung. Es zeigt sich im gleichen Maße eine Rechtsverschiebung der beiden Kurven für cAMP (rot) und Rp-8-pCPT-cGMPS (blau) ausgehend von der Kurve ohne Ligandenzufuhr (schwarz).

C) Die Abbildung zeigt einen Box-Plot der $V_{1/2}$ -Werte für cAMP (blau, $V_{1/2} = -101,6 \pm 2,9$ mV), Rp-8-pCPT-cGMPS (rot, $V_{1/2} = -97,8 \pm 1,7$ mV) und ohne Ligandenapplikation (schwarz, $V_{1/2} = -114,8 \pm 1,2$ mV). Rp-8-pCPT-cGMPS besitzt die gleiche Effektivität in der Verschiebung der Stromkurve zu positiveren Spannungswerten wie cAMP.

$z\delta$ nahm einen Wert von $z\delta = 3,35 \pm 0,12$ ohne jegliche Ligandenbindung und $z\delta = 3,73 \pm 0,06$ für Rp-8-pCPT-cGMPS an.

Tabelle 7. Vergleich der Ergebnisse zwischen Rp-8-pCPT-cGMPS, cAMP und cGMP.

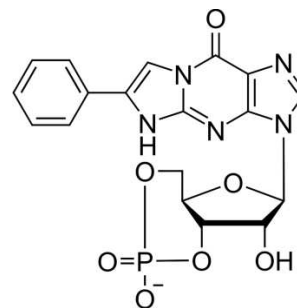
	Rp-8-pCPT-cGMPS	cAMP	cGMP
$I_{\text{max,-Ligand}} / I_{\text{max,-cAMP}}$	$0,96 \pm 0,05$		$0,95 \pm 0,08$
$V_{1/2}$ (in mV)	$-97,8 \pm 1,7$	$-101,6 \pm 2,9$	$-100,1 \pm 2,1$
$\Delta V_{1/2}$ (in mV)	$17,0 \pm 0,8$	$19,8 \pm 1,90$	$16,4 \pm 1,80$
$z\delta$	$3,73 \pm 0,06$	$4,66 \pm 0,47$	$5,83 \pm 0,59$

4.2.2 Wirkung von Rp-8-Br-PET-cGMPS

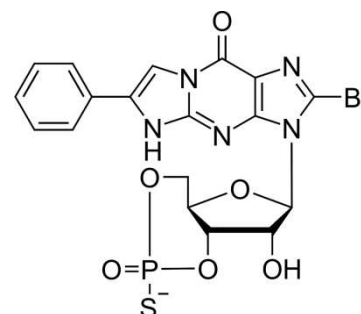
In den durchgeführten Experimenten von Vighi et al. zur Entwicklung von cGMP-Analoga als pharmakologische Behandlungsmöglichkeit von *Retinitis pigmentosa* stellte sich Rp-8-Br-PET-cGMPS als der vielversprechendste Ligand heraus (Vighi et al. 2018). Es konnte ein protektiver Effekt auf die Photorezeptoren von Modellmäusen nachgewiesen werden, indem dieses cGMP-Derivat sowohl die PKG als auch den CNG-Kanal inhibieren konnte.

Zum besseren Verständnis des genauen Wirkmechanismus erfolgte bereits eine elektrophysiologische Untersuchung der Wirkung von Rp-8-Br-PET-cGMPS auf unterschiedliche CNG-Kanal-Isoformen (Wucherpfennig 2020). Da neben den CNG-Kanälen auch die cGMP-bindenden HCN-Kanäle in den Photorezeptoren vorkommen, das zelluläre Target der pathologisch erhöhten cGMP-Konzentration bei *Retinitis pigmentosa* nicht eindeutig geklärt ist und ein protektiver Effekt des funktionstüchtigen HCN-Kanals bei *Retinitis pigmentosa* nachgewiesen werden konnte, war auch die Wirkung des cGMP-Derivats Rp-8-Br-PET-cGMPS auf den HCN-Kanal von besonderem Interesse. Zur Untersuchung der Bedeutung des PET-Substituenten erfolgte ein Vergleich zwischen Rp-8-Br-PET-cGMPS und PET-cGMP.

Schema 2. PET-cGMP.



Schema 3. Rp-8-Br-PET-cGMPS.



PET-cGMP (P001) ist ein cGMP-Analogon, bei dem die Purinstruktur mit einem aus fünf Atomen bestehenden Ringsystem fusioniert ist. Die Verbindung stellen die Aminogruppe an Position 2 und das Stickstoff-Atom an Position 1 dar. Zusätzlich trägt die Ringstruktur einen Phenylrest. Im Vergleich zu cGMP allein besitzt PET-cGMP durch das zusätzliche Kohlenwasserstoff-System eine höhere Lipophilie und eine bessere Membranpermeabilität. Rp-8-Br-PET-cGMPS (P007) als ein weiteres cGMP-Analogon enthält ebenfalls wie PET-cGMP die PET-Struktur (siehe oben). An Position 8 der Nukleinbase wurde das Wasserstoff-Atom durch ein Brom-Atom ersetzt. Am zyklischen Phosphat-Rest erfolgte die Substitution des äquatorial gelegenen Sauerstoff-Atoms durch ein Schwefel-Atom.

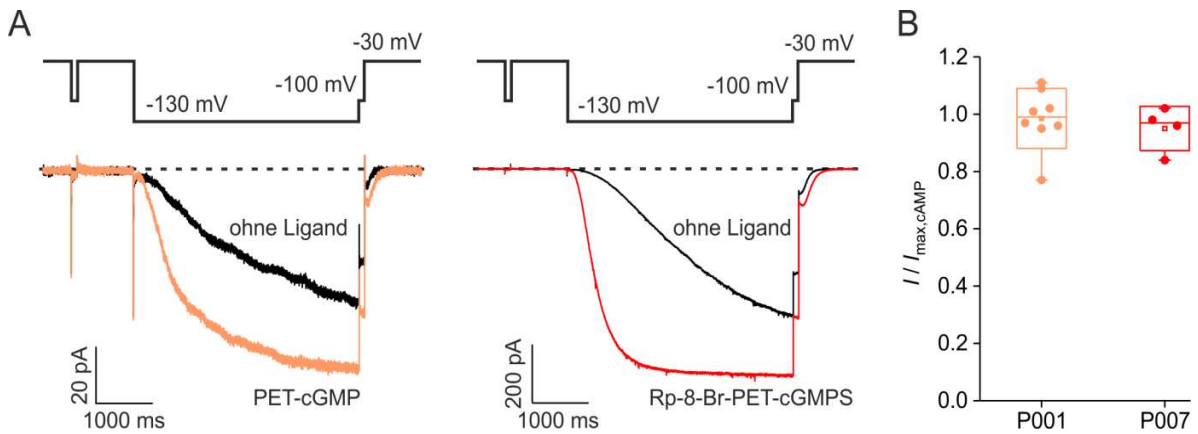


Abbildung 18. PET-cGMP und Rp-8-Br-PET-cGMPS haben einen agonistischen Effekt auf den HCN2-Kanal.

A) Abgebildet sind exemplarische Stromspuren nach Applikation von 50 μM PET-cGMP (orange) bzw. Rp-8-Br-PET-cGMPS (rot) jeweils im Vergleich zum Kontrollstrom (schwarz), der ohne Ligandenzufuhr bestimmt wurde. Über den Kurven befinden sich die verwendeten Spannungsprotokolle.

B) Dargestellt ist ein Box-Plot für die maximale Stromaktivierung des HCN2-Kanals hervorgerufen durch die Applikation von PET-cGMP (orange) und Rp-8-Br-PET-cGMPS (rot). PET-cGMP und Rp-8-Br-PET-cGMPS erreichten nahezu die gleiche maximale Stromaktivierung wie cAMP.

Sowohl für PET-cGMP als auch für Rp-8-Br-PET-cGMPS konnte eine HCN2-Kanalaktivierung gezeigt werden (Abb. 18). In der Erhöhung der Stromamplitude zeigte sich die Effektivität der beiden Derivate. Dabei betrug das Verhältnis der maximalen Stromaktivierung von Rp-8-Br-PET-cGMPS zu der von cAMP ($I_{\max, \text{Rp-8-Br-PET-cGMPS}} / I_{\max, \text{cAMP}}$) $0,98 \pm 0,04$. Zur Untersuchung des Beitrags der PET-Gruppe allein erfolgte die Bestimmung der Effektivität mithilfe von PET-cGMP. Auch hier ergab sich ein Verhältnis von $0,98 \pm 0,02$, so dass hinsichtlich der Effektivität der beiden cGMP-Derivate in der Erhöhung der Stromamplitude kein Unterschied festgestellt werden konnte.

Da wie bereits beschrieben Rp-8-Br-PET-cGMPS einen vielversprechenden Liganden in vorangegangenen Untersuchungen darstellte, wurde eine genauere Analyse zur Konzentrations- und Spannungsabhängigkeit des HCN2-Kanals durchgeführt. Zur Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven wurden die Konzentrationen 0,001 μM , 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM und 10 μM Rp-8-Br-PET-cGMPS appliziert und die Ströme auf 10 μM cAMP als Referenzwert normiert. Dabei zeigte sich, dass eine Konzentration von $c = 0,024 \mu\text{M}$ zur halbmaximalen Aktivierung des HCN2-Kanals führte. Der Hill-Koeffizient betrug $H = 0,52$. Somit ist die scheinbare Affinität der freien Bindungsstellen des HCN2-Kanals für Rp-8-Br-PET-cGMPS genauso groß wie für cAMP, für das ein EC_{50} -Wert von 0,027 μM ermittelt wurde. Im Gegensatz dazu benötigte es jedoch 0,189 μM cGMP zum Erreichen des halbmaximalen

Stroms. Daraus wurde ersichtlich, dass durch die Modifikation des cGMP-Grundgerüsts die Potenz des Liganden gesteigert werden kann (Abb. 19).

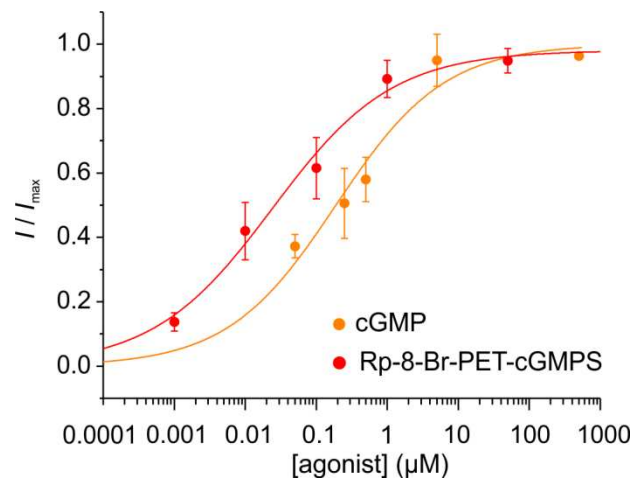


Abbildung 19. Aktivierung des HCN2-Kanals durch cGMP und Rp-8-Br-PET-cGMPS.

Die Abbildung zeigt die Dosis-Wirkungs-Beziehung für Rp-8-Br-PET-cGMPS (rot) im Vergleich zu cGMP (orange). Die Graphen stellen die Ergebnisse der Anpassung der Hill-Funktion dar. Der EC_{50} -Wert für Rp-8-Br-PET-cGMPS betrug $0,024 \mu\text{M}$. Von Rp-8-Br-PET-cGMPS benötigt es demnach eine geringere Konzentration als von cGMP, um den HCN2-Kanal halbmaximal zu aktivieren.

Bei den Untersuchungen der Spannungsabhängigkeit des cGMP-Derivats Rp-8-Br-PET-cGMPS ergab sich für die Spannung der halbmaximalen Aktivierung des HCN2-Kanals ein Wert von $V_{1/2} = -101,0 \pm 1,5 \text{ mV}$, während der HCN2-Kanal ohne Ligandenbindung bei einer Spannung von $-120,7 \pm 1,3 \text{ mV}$ halbmaximal aktiviert war. Aus diesen Daten ergab sich eine Differenz von $17,1 \pm 1,2 \text{ mV}$, die sowohl dem $\Delta V_{1/2}$ von cGMP als auch dem $\Delta V_{1/2}$ von cAMP nahezu gleicht. Somit scheint die Effektivität des modifizierten zyklischen Nukleotids in der Verschiebung der halbmaximalen Spannung des HCN2-Kanals gleich dem der natürlichen zyklischen Nukleotide zu sein (Abb. 20D-F)

Zur Untersuchung des Beitrags der PET-Modifikation auf die Spannungsabhängigkeit erfolgte zudem die Messung der Strom-Spannungs-Beziehungen für PET-cGMP allein. Auch hier war der HCN2-Kanal ohne Ligandenbindung bei einer Spannung von $-119,9 \pm 1,1 \text{ mV}$ halbmaximal aktiviert. Allerdings waren für eine halbmaximale Aktivierung bei Applikation von PET-cGMP Spannungen von $-110,1 \pm 1,6 \text{ mV}$ notwendig. Die Differenz der beiden $V_{1/2}$ -Werte ergab $\Delta V_{1/2} = 8,52 \pm 1,75 \text{ mV}$. Somit scheint die PET-Modifikation allein einen geringeren Einfluss auf das Schaltverhalten des HCN2-Kanals nehmen zu können als ein cGMP-Analogon mit einem zusätzlichen Brom-Atom an Position 8 der Nukleinbase und einem Schwefel-Atom am zyklischen Phosphat-Rest (Rp-8-Br-PET-cGMPS) (Abb. 20A-C).

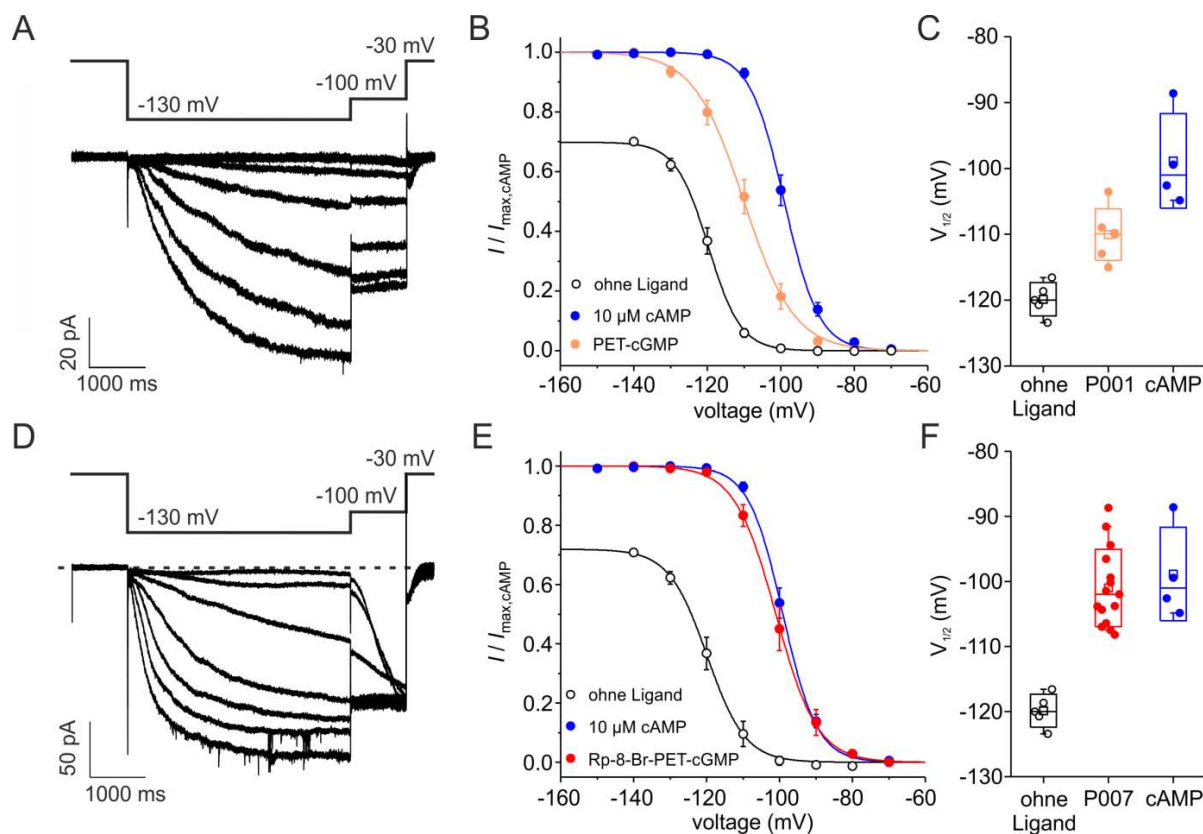


Abbildung 20. Strom-Spannungs-Beziehung für PET-cGMP und Rp-8-Br-PET-cGMPS.

A) Dargestellt sind exemplarische Stromspuren bei der Applikation von 50 μM PET-cGMP bei schrittweise zunehmender Spannung (10 mV-Schritte). Dazu wurde das verwendete Spannungsprotokoll angegeben.

B) Aufgetragen sind die relevanten Ströme in Abhängigkeit von der angelegten Spannung. Es wird ersichtlich, dass PET-cGMP (orange) nur mit geringerer Effektivität die Kurve zu positiveren Spannungswerten verschieben kann als cAMP (blau).

C) Der Box-Plot für die $V_{1/2}$ -Werte zeigt einen Unterschied zwischen keiner Ligandenzufuhr (schwarz, $V_{1/2} = -119,9 \pm 1,1$ mV), der Applikation von PET-cGMP (orange, $V_{1/2} = -110,1 \pm 1,6$ mV) und der von cAMP (blau, $V_{1/2} = -101,6 \pm 2,9$ mV).

D) Die Abbildung stellt die exemplarischen Stromspuren für die Applikation von 50 μM Rp-8-Br-PET-cGMPS bei schrittweise zunehmender Spannung (10 mV-Schritte) dar. Zusätzlich ist das Spannungsprotokoll angegeben.

E) Die Abbildung zeigt die Abhängigkeit der Stromamplitude (bezogen auf den Strom bei -140 mV) von der anliegenden Spannung. Dabei zeigt sich nahezu kein Unterschied zwischen den zyklischen Nukleotiden cAMP (blau) und Rp-8-Br-PET-cGMPS, die Kurve zu positiveren Spannungswerten zu verschieben.

F) Dargestellt ist ein Box-Plot für die $V_{1/2}$ -Werte durch die Zugabe von keinem Liganden (schwarz, $V_{1/2} = -119,9 \pm 1,1$ mV), Rp-8-Br-PET-cGMPS (rot, $V_{1/2} = -101,0 \pm 1,5$ mV) und cAMP (blau, $V_{1/2} = -101,6 \pm 2,9$ mV). Rp-8-Br-PET-cGMPS und cAMP benötigen nahezu die gleiche Spannung zur halbmaximalen Aktivierung des HCN2-Kanals.

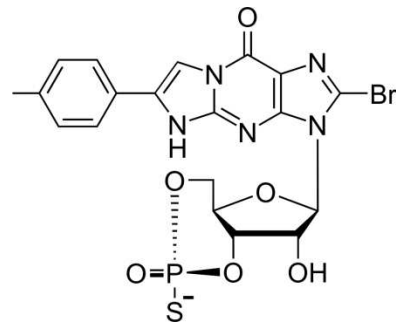
Für die Untersuchung der Kooperativität der Untereinheiten des Kanals konnten Werte von $z\delta = 4,03 \pm 0,18$ ohne Ligandenbindung, $z\delta = 4,12 \pm 0,20$ für Rp-8-Br-PET-cGMPS und $z\delta = 6,46 \pm 0,48$ für PET-cGMP berechnet werden.

Tabelle 8. Vergleich der Ergebnisse zwischen Rp-8-Br-PET-cGMPS, PET-cGMP, cAMP und cGMP.

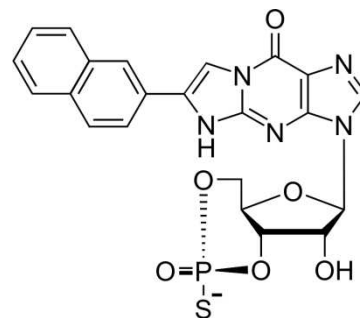
	Rp-8-Br-PET-cGMPS	PET-cGMP	cAMP	cGMP
$I_{\max, \text{Ligand}} / I_{\max, \text{cAMP}}$	$0,98 \pm 0,02$	$0,98 \pm 0,02$		$0,95 \pm 0,08$
$V_{1/2}$ (in mV)	$-101,0 \pm 1,5$	$-110 \pm 1,6$	$-101,6 \pm 2,9$	$-100,1 \pm 2,1$
$\Delta V_{1/2}$ (in mV)	$17,1 \pm 1,2$	$8,52 \pm 1,75$	$19,8 \pm 1,90$	$16,4 \pm 1,80$
$z\delta$	$4,12 \pm 0,20$	$6,46 \pm 0,48$	$4,66 \pm 0,47$	$5,83 \pm 0,59$
EC_{50} (in μM) für die Stromerhöhung	0,024		0,027	0,189
H	0,52		0,57	0,57

4.2.3 Wirkung von Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS und Rp-(2-N)ET-cGMPS

Aus den elektrophysiologischen Untersuchungen zu Rp-8-Br-PET-cGMPS wurde ersichtlich, dass die PET-Substitution in Verbindung mit weiteren Modifikationen Einfluss auf das Schaltverhalten des HCN2-Kanals nehmen kann. Somit war es von großem Interesse, die Bedeutung weiterer cGMP-Derivate zu analysieren, bei denen die PET-Struktur noch in anderer Weise modifiziert wurde.



Schema 4. Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS.



Schema 5. Rp-(2-N)ET-cGMPS.

Bei dem cGMP-Derivat Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS (B244) sind die Aminogruppe an Position 2 und das Stickstoff-Atom an Position 1 der Purinstruktur Teil eines Imidazol-Rings, der mit der Purinstruktur fusioniert ist, jedoch nun eine para-Methylphenyl-Gruppe trägt. Außerdem enthält die Nukleinbase an Position 8 anstatt eines Wasserstoff-Atoms ein Brom-Atom und der zyklische Phosphatrest ein Schwefel-Atom anstelle des exozyklischen Sauerstoff-Atoms.

Bei dem Analogon Rp-(2-N)ET-cGMPS (N061) erfolgte ebenfalls die Verbrückung der Aminogruppe in Position 2 und des Stickstoff-Atoms in Position 1 zu einem fünfgliedrigen Imidazol-Ring. Dieser trägt zusätzlich einen Naphthyl-Ring. Außerdem wurde das äquatorial gelegene Sauerstoff-Atom am zyklischen Phosphat-Rest durch ein Schwefel-Atom ausgetauscht.

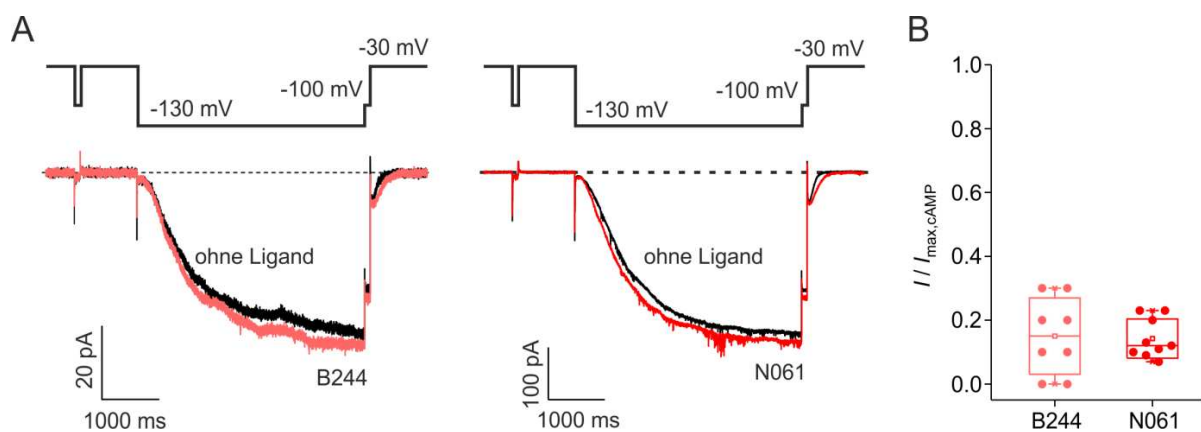


Abbildung 21. Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS und Rp-(2-N)ET-cGMPS haben einen partiell agonistischen Effekt auf HCN2.

A) Dargestellt ist eine exemplarische Stromspur nach Applikation von Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS (hellrot) und Rp-(2-N)ET-cGMPS (dunkelrot) im Vergleich zur Situation ohne Ligandenzufuhr (schwarz). Das Spannungsprotokoll ist dargestellt.

B) Abgebildet ist ein Box-Plot für die maximale Stromaktivierung des HCN2-Kanals hervorgerufen durch die Applikation von Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS (hellrot) und Rp-(2-N)ET-cGMPS (dunkelrot). Beide cGMP-Analoga können nur eine geringe Öffnung des HCN2-Kanals induzieren.

Für die cGMP-Derivate Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS und Rp-(2-N)ET-cGMPS erfolgten die elektrophysiologischen Messungen in gleicher Weise wie für die bisher beschriebenen Derivate, um herauszufinden, wie effektiv sie die Stromamplitude des HCN2-Kanals erhöhen können (Abb. 21). Dabei ergab sich für das Verhältnis der maximalen Stromamplitude der modifizierten zyklischen Nukleotide zu der von cAMP für Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS ein Wert von $0,15 \pm 0,04$ und für Rp-(2-N)ET-cGMPS ein Wert von $0,14 \pm 0,02$. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Modifikationen zu einer verringerten Effektivität in der Erhöhung der Stromamplitude sowohl im Vergleich zu den physiologischen Liganden cAMP und cGMP als auch zu Rp-8-Br-PET-cGMPS führten.

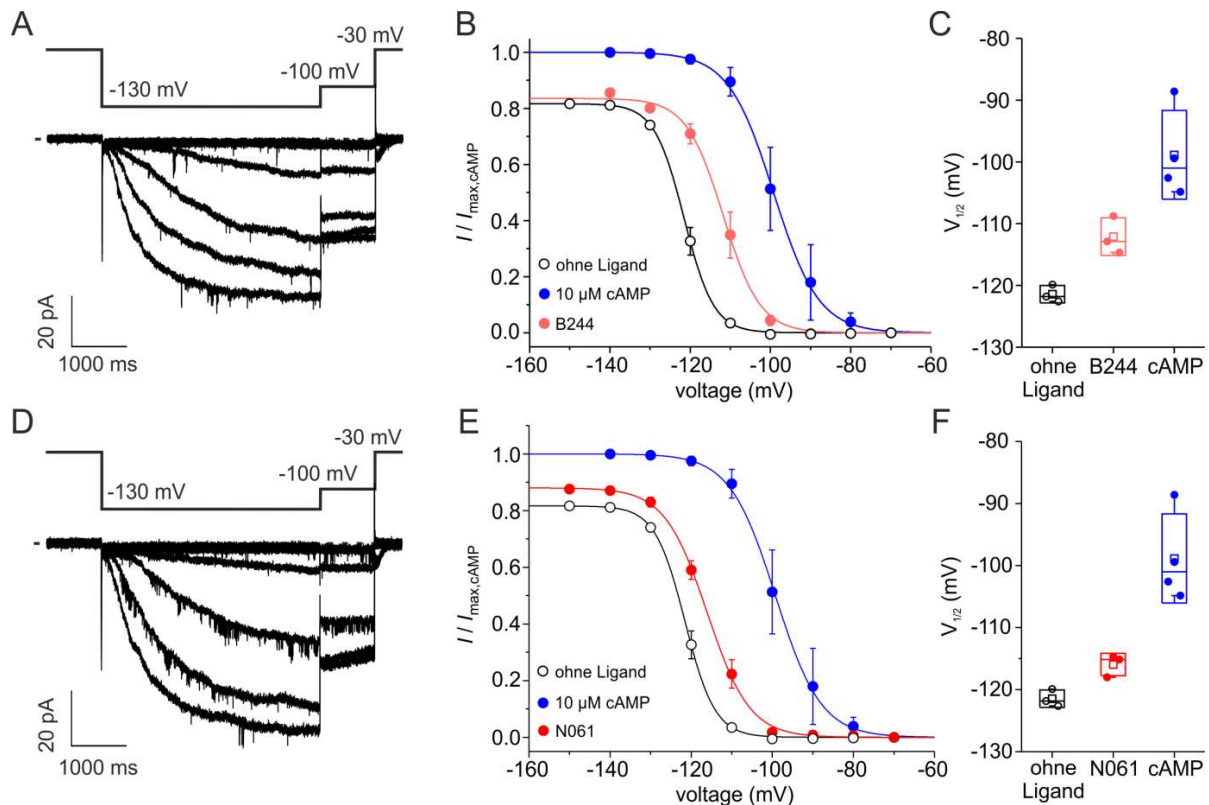


Abbildung 22. Strom-Spannungs-Beziehung von Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS und Rp-(2-N)ET-cGMPS auf HCN2.

A) Die Abbildung zeigt die exemplarischen Stromspuren bei Untersuchung der Abhängigkeit von Strom und Spannung bei Applikation von 50 μM Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS. Das Spannungsprotokoll ist angegeben.

B) Die Effektivität von Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS in der Verschiebung der halbmaximalen Spannung $V_{1/2}$ zeigt sich in dieser Darstellung im Vergleich zu cAMP. Es wird ersichtlich, dass Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS (hellrot) nur eine geringere Aktivierung des HCN2-Kanals als cAMP (blau) erreichen kann.

C) Der Box-Plot stellt die $V_{1/2}$ -Werte von Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS im Vergleich zu cAMP und ohne Ligand dar. Um den HCN2-Kanal halbmaximal zu aktivieren, benötigte es eine größere Spannung bei Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS (hellrot, $V_{1/2} = -112,1 \pm 1,8$ mV) als bei cAMP (blau, $V_{1/2} = -101,6 \pm 2,9$ mV).

D) Abgebildet sind exemplarische Stromspuren für die Strom-Spannungs-Beziehung bei Applikation von 50 μM Rp-(2-N)ET-cGMPS. Über der Abbildung befindet sich das Spannungsprotokoll.

E) Aufgetragen sind die Spannungen im Verhältnis zur Effektivität des Liganden Rp-(2-N)ET-cGMPS (dunkelrot), den HCN2-Kanal im Vergleich zu cAMP (blau) maximal zu aktivieren. Es zeigt sich, dass Rp-(2-N)ET-cGMPS weniger effektiv eine Rechtsverschiebung des Graphen ermöglichen kann als cAMP.

F) Der Box-Plot stellt die $V_{1/2}$ -Werte von Rp-(2-N)ET-cGMPS im Vergleich zu einer cAMP- und keiner Ligandenzufuhr dar. Um den HCN2-Kanal halbmaximal zu aktivieren, benötigte es eine größere Spannung bei Zugabe von Rp-(2-N)ET-cGMPS (dunkelrot, $V_{1/2} = -115,94 \pm 1,04$ mV) als bei cAMP (blau, $V_{1/2} = -101,6 \pm 2,9$ mV).

Ähnliche Erkenntnisse konnten aus den Untersuchungen zur Effektivität der Liganden in der Verschiebung der halbmaximalen Spannung $V_{1/2}$ gewonnen werden. Der HCN2-Kanal war bei einer Spannung von $-121,5 \pm 0,8$ mV ohne Ligandenbindung und bei einer Spannung von $-112,1 \pm 1,8$ mV mit der Zufuhr von Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS halbmaximal aktiviert. Ähnlich

lagen die Werte bei der Applikation von Rp-(2-N)ET-cGMPS bei $-115,94 \pm 1,04$ mV und in Abwesenheit des Liganden bei $-121,5 \pm 0,8$ mV. Daraus ergaben sich die Differenzen als das eigentliche Maß der Effektivität von $\Delta V_{1/2} = 9,34 \pm 2,27$ mV für Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS und $\Delta V_{1/2} = 5,51 \pm 1,07$ mV für Rp-(2-N)ET-cGMPS. Auch diese unterscheiden sich maßgeblich zu den $\Delta V_{1/2}$ - Werten von cAMP, cGMP und Rp-8-Br-PET-cGMPS (Abb. 22). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass sich der HCN2-Kanal durch die Applikation sowohl von Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS als auch von Rp-(2-N)ET-cGMPS nur schlecht aktivieren lässt.

Tabelle 9. Vergleich der Ergebnisse zwischen Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS, Rp-(2-N)ET-cGMPS, cAMP und cGMP.

	Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS	Rp-(2-N)ET-cGMPS	cAMP	cGMP
$I_{\max, \text{-Ligand}} / I_{\max, \text{-cAMP}}$	$0,15 \pm 0,04$	$0,14 \pm 0,02$		$0,95 \pm 0,08$
$V_{1/2}$ (in mV)	$-112,1 \pm 1,8$	$-115,94 \pm 1,04$	$-101,6 \pm 2,9$	$-100,1 \pm 2,1$
$\Delta V_{1/2}$ (in mV)	$9,34 \pm 2,27$	$5,51 \pm 1,07$	$19,8 \pm 1,90$	$16,4 \pm 1,80$

Um die Ursache dafür zu finden und die Wirksamkeit der beiden cGMP-Analoga auf den HCN2-Kanal weiter zu untersuchen, erfolgten Messungen mit einer Ligandenmischung aus 50 μM Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS oder Rp-(2-N)ET-cGMPS und zusätzlichen 0,2 μM cGMP. Bei den Versuchen zur Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven zeigten sich jedoch nahezu identische Stromspuren für beide Analoga im Vergleich zur alleinigen cGMP-Zufuhr von 0,2 μM cGMP. Um die Effektivität der Ligandenmischungen und von cGMP bei subsättigender Konzentration gegenüber der Referenz von 10 μM cAMP allein zu bestimmen, wurde das Verhältnis aus den Werten der maximalen Stromaktivierung ($I_{\max, \text{-Ligand}} / I_{\max, \text{-cAMP}}$) ermittelt. Dieser betrug für die Mischung mit Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS $0,58 \pm 0,11$, für die Mischung mit Rp-(2-N)ET-cGMPS $0,76 \pm 0,12$ und für cGMP allein $0,70 \pm 0,11$. Somit zeigten sich im Vergleich zur alleinigen Applikation von cGMP keine signifikanten Unterschiede in der Effektivität der Ligandenmischungen, den HCN2-Kanal maximal zu aktivieren (Abb. 23). Daraus lässt sich vermuten, dass die Stromantwort unter diesen Bedingungen vor allem durch die zugefügten 0,2 μM cGMP hervorgerufen wurde.

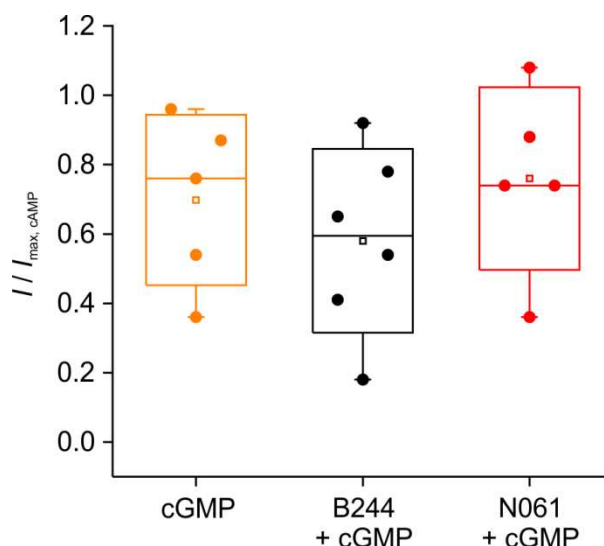


Abbildung 23. Die Ligandenmischungen und cGMP allein unterscheiden sich nicht in der maximalen HCN2-Kanalaktivierung.

Der Box-Plot zeigt einen Vergleich der maximalen Stromaktivierung des HCN2-Kanals bei subsättigender Konzentration von cGMP und Ligandenmischungen aus sowohl Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS als auch aus Rp-(2-N)ET-cGMPS in Koapplikation mit cGMP. Das Verhältnis aus den Werten der maximalen Stromaktivierung ($I_{\max, \text{Ligand}} / I_{\max, \text{cAMP}}$) betrug für die Mischung mit Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS $0,58 \pm 0,11$, für die Mischung mit Rp-(2-N)ET-cGMPS $0,76 \pm 0,12$ und für cGMP allein $0,70 \pm 0,11$. Somit ergibt sich, dass keine Unterschiede zwischen der Applikation der Ligandenmischungen und cGMP allein besteht, den HCN2-Kanal maximal zu aktivieren.

Tabelle 10. Vergleich der Ergebnisse zwischen Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS + cGMP, Rp-(2-N)ET-cGMPS + cGMP und cGMP.

	Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS + cGMP	Rp-(2-N)ET-cGMPS + cGMP	cGMP
$I_{\max, \text{Ligand}} / I_{\max, \text{cAMP}}$	$0,58 \pm 0,11$	$0,76 \pm 0,12$	$0,70 \pm 0,11$

5 Diskussion

Retinitis pigmentosa beschreibt eine hereditäre Erkrankung der Netzhaut, für die Mutationen in bereits 71 identifizierten Genen ursächlich sind (Daiger 2020). Diese genetischen Veränderungen wirken sich auf den cGMP-Metabolismus in den Photorezeptorzellen aus, der physiologisch einen essentiellen Bestandteil der Phototransduktionskaskade der Sehsinneszellen darstellt. In den erkrankten Zellen kommt es zu einer Akkumulation dieses zyklischen Nukleotids, was als Hauptursache für die Degeneration der Stäbchen und Zapfen angesehen wird (Lolley et al. 1977). Der genaue Pathomechanismus der Erkrankung ist jedoch bis heute nicht vollständig verstanden und bleibt Gegenstand aktueller Forschungen. In einem der Projekte wurde ein neuer Therapieansatz zur Behandlung der *Retinitis pigmentosa* geschaffen. Dabei wurden cGMP-Derivate entwickelt und deren Auswirkungen auf den Photorezeptorzelltod untersucht. Es zeigte sich ein protektiver Effekt hinsichtlich des Zelluntergangs bei den getesteten Geweben und Mausmodellen (Vighi et al. 2018). Auch hier bleiben jedoch die genauen ursächlichen zellulären Signalwege ungeklärt, da als physiologische Targets von cGMP sowohl die zyklischen Nukleotid-gesteuerten Ionenkanäle (CNG- oder HCN-Kanäle) als auch die Proteinkinase G in Betracht gezogen werden können. Nachdem in einer vorangegangenen Arbeit am Institut für Physiologie II der Einfluss der cGMP-Derivate auf die CNG-Kanäle genauer untersucht wurde (Wucherpfennig 2020), erfolgte nun die Erforschung der Auswirkungen der cGMP-Analoga auf das Schaltverhalten des HCN-Kanals.

5.1 cGMP als Ligand des HCN-Kanals

cGMP stellt als ein sogenannter *Second messenger* einen entscheidenden Mediator im geregelten Ablauf von Signalkaskaden bei biochemischen Prozessen verschiedener Organismen dar. Dazu gehört auch die Phototransduktion in den Stäbchen und Zapfen der Retina.

Eines der allgemeinen Zielmoleküle von cGMP ist der HCN-Kanal, mit welchem das zyklische Nukleotid über eine direkte Bindungsstelle interagieren und das Schaltverhalten beeinflussen kann. Dennoch wird cAMP als der eigentliche physiologische Ligand des HCN-Kanals beschrieben, da dieser sensitiver auf cAMP als auf cGMP reagiert und neben vielen weiteren Funktionen eine entscheidende Rolle in der Generierung und Modulierung der Schrittmacheraktivität im Herzen spielt (DiFrancesco und Tortora 1991, Brown et al. 1979).

Da das Zusammenspiel des HCN-Kanals mit cAMP im Gegensatz zu cGMP sehr gut untersucht ist, erfolgten auch die Auswertungen der Messungen im Vergleich zu cAMP, um eine bessere Einschätzung der Ergebnisse erreichen zu können.

Alle vier HCN-Kanal-Isoformen werden in der Retina exprimiert. In den Stäbchen und Zapfen kommen dabei HCN1-Kanäle am häufigsten vor, so dass es naheliegend gewesen wäre, auch die Wirkung von cGMP und den cGMP-Analoga auf diesen Kanal zu untersuchen (Muller et al. 2003). Allerdings zeigten bereits Untersuchungen zur Wirkung von cAMP auf den HCN1-Kanal eine geringe Sensitivität dieses Liganden auf den Kanal (Viscomi et al. 2001). Um diese Eigenschaft auch für cGMP untersuchen zu können, erfolgten elektrophysiologische Messungen bei der Applikation von cGMP auf den HCN1-Kanal im Vergleich zu keiner Ligandenzufuhr. Dabei wurde erkennbar, dass der HCN1-Kanal auf die Zugabe von cGMP mit der gleichen Stromantwort reagierte, wie er sie auch ohne Ligandenanwesenheit zeigte. Auch die beiden Spannungen der halbmaximalen Aktivierung des HCN1-Kanals unterschieden sich praktisch überhaupt nicht. Somit scheint eine cGMP-Zufuhr keinen Beitrag zur Verringerung der zur Kanalaktivierung notwendigen Spannungsenergie leisten zu können. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass der HCN1-Kanal im Vergleich zu den anderen Subtypen schon bei einer geringeren Spannung aktivierbar ist. Demzufolge besitzt auch cGMP auf den HCN1-Kanal eine geringe Wirksamkeit.

Tabelle 11. Vergleich der Spannungswerte zur halbmaximalen Aktivierung des HCN1-Kanals.

	ohne Ligand	cGMP
$V_{1/2}$ (in mV)	$-92,8 \pm 1,1$	$-92,8 \pm 0,8$

Da jedoch das Ziel der Arbeit war, den Einfluss von cGMP und seinen Derivaten auf das Schaltverhalten des HCN-Kanals zu untersuchen, sollten die Messungen möglichst an einem gut durch zyklische Nukleotide modulierbaren HCN-Subtypen durchgeführt werden. Eine hohe Sensitivität gegenüber cAMP besaßen bei Experimenten bereits die HCN2- und HCN4-Isoformen. Aus den vielen experimentellen Untersuchungen des Instituts mit dem HCN-Kanal bestand jedoch die Erfahrung, dass der HCN4-Kanal nur schlecht durch die Oozyten exprimiert wird. Zusätzlich zeigte der HCN2-Kanal in seiner Aktivierungskinetik eine schnellere Aktivierung als HCN4 (Ludwig et al. 1999). Somit wurden alle weiteren Untersuchungen am HCN2-Kanal durchgeführt.

Wie ebenfalls bereits in der Literatur beschrieben (Ludwig et al. 1998), aktivierten beide *Second messenger* den HCN2-Kanal auch bei unseren Messungen, wobei es nach der Bindung sowohl zu einer Erhöhung der Stromamplitude als auch zu einer Beschleunigung der Stromkinetik kam. Für beide Liganden erfolgte die Untersuchung der maximalen Stromaktivierung bei sättigender Konzentration. Um die Effektivität von cGMP im Vergleich zu cAMP zu bestimmen, wurden die maximalen Stromamplituden miteinander verglichen. Bei Gegenüberstellung der beiden gemittelten Werte ($I_{\max,-cGMP} / I_{\max,-cAMP}$) konnte ein Quotient von $0,95 \pm 0,081$ errechnet werden. Somit wird ersichtlich, dass cGMP im Vergleich zu cAMP den HCN2-Kanal mit einer Effektivität von 95% maximal aktivieren kann. cGMP scheint demnach nahezu genauso wirksam eine maximale Stromaktivierung beim HCN2-Kanal hervorrufen zu können und stellt sich als potenter Agonist des Kanals dar.

Um eine halbmaximale Aktivierung des HCN2-Kanals erreichen zu können, benötigte es abhängig vom Liganden unterschiedlich hohe Konzentrationen. Der EC_{50} -Werte betrug für cAMP $0,027 \mu\text{M}$, während er für cGMP bei $0,189 \mu\text{M}$ lag. Diese Unterschiede zeigen die Differenzen in der Potenz der beiden Liganden auf. Die scheinbare Affinität der zyklischen Nukleotide zum HCN2-Kanal ist somit für cAMP 6,9-fach höher als für cGMP. Es benötigt also eine geringere Konzentration an cAMP, um den gleichen Effekt am HCN2-Kanal erzeugen zu können. Ähnliche Schlussfolgerungen konnten auch Zagotta und Mitarbeiter ziehen, bei welchen eine 10-fach höhere Menge an cGMP für die gleichen Auswirkungen auf den HCN2-Kanal nötig war (Zagotta et al. 2003).

Um zu analysieren, inwieweit cAMP und cGMP die Aktivierungen zu positiveren Werten der Spannung verschieben können, erfolgte die Untersuchung der Beziehung von Strom zu Spannung bei Applikation der Liganden. Damit ließ sich auf die Spannung schließen, die anliegen muss, um den Kanal halbmaximal zu aktivieren ($V_{1/2}$). Um die Effektivität der zyklischen Nukleotide untereinander vergleichen zu können, wurde daraufhin die Differenz ($\Delta V_{1/2}$) zwischen gemessener Spannung mit und ohne Ligandenbindung bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass sich die Verschiebungen der halbmaximalen Stromaktivierungskurven im gleichen Bereich befinden. Während bei der Applikation von cAMP $19,5 \pm 2,7$ weniger Millivolt anliegen mussten, um bei sättigender Konzentration eine halbmaximale Aktivierung erreichen zu können, verursachte cGMP eine Verschiebung der Aktivierungskurve um $22,1 \pm 1,1$ mV. Dies bedeutet, dass der HCN2-Kanal durch die Zufuhr der Liganden weniger Spannungsenergie benötigt, um geöffnet zu werden. Die beiden zyklischen Nukleotide unterschieden sich dabei in ihrer Effektivität jedoch nur geringfügig, was sich auch mit der Analyse der Spannungsabhängigkeit des HCN-Kanals bei Bindung von cAMP und cGMP in

der Literatur in Einklang befindet. Zagotta et. al beschrieben in ihren Experimenten bereits eine Verschiebung der Aktivierungsspannung durch cAMP um $19,2 \pm 0,2$ mV und durch cGMP um $18,6 \pm 1,8$ mV (Zagotta et al. 2003). Ludwig et. al konnten $\Delta V_{1/2}$ -Werte für beide zyklischen Nukleotide von 12 – 14 mV zeigen (Ludwig et al. 1998).

Anhand der $\Delta V_{1/2}$ -Werte konnte zusätzlich die Potenz von cGMP auf den HCN2-Kanal ermittelt werden, eine halbmaximale Verschiebung der Stromaktivierungskurve zu bewirken. Demnach benötigte es $11,7 \mu\text{M}$ cGMP, um die Kurve um die Hälfte des maximal möglichen nach rechts zu versetzen. Diese Konzentration entspricht auch der aus der Literatur, indem sich der hier bestimmte Werte nahezu in der Mitte der EC_{50} -Werte von Zagotta et. al mit $8,3 \mu\text{M}$ und von Lolicato et. al mit $13,2 \mu\text{M}$ befindet (Zagotta et al. 2003, Lolicato et al. 2014). Im Vergleich dazu existieren Daten aus der Literatur für cAMP, die von $0,06 \mu\text{M}$ bis $0,72 \mu\text{M}$ reichen (Sartiani et al. 2017). Da sich diese Werte von denen des cGMP um das 16 – 200-fache unterscheiden, wird ersichtlich, dass cGMP eine deutlich geringere Potenz als cAMP auf den HCN2-Kanal besitzt, die Stromkurve zu positiveren Werten der Spannung zu verschieben.

Zusammenfassend konnte aus allen diesen Ergebnissen zur Untersuchung der Wirkung von cGMP und cAMP bestätigt werden, dass cGMP zwar ein effektiver Ligand des HCN2-Kanals ist, es allerdings weniger potent das Schaltverhalten des HCN2-Kanals beeinflussen kann als cAMP.

Da im weiteren Verlauf cGMP-Analoga auf den HCN2-Kanal getestet werden sollten, dienten die Messungen zusätzlich der Generierung von Referenzwerten sowohl für cGMP als auch für cAMP, so dass Aussagen über die Wirksamkeit der cGMP-Derivate im Vergleich zu cGMP und zu cAMP getroffen werden können.

5.2 Auswahl der Analoga

Die Entwicklung von kausalen, effektiven Behandlungsmöglichkeiten der *Retinitis pigmentosa* wird durch das große Maß an unterschiedlichen ursächlichen Mutationen der Erkrankung erschwert. Um Einfluss auf den gestörten cGMP-Signalweg in den erkrankten Photorezeptoren der Retina nehmen zu können, entwickelten Vighi et. al zehn verschiedene cGMP-Analoga (Vighi et al. 2018). Die Basis dafür bildeten vorherige Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Substituenten auf die Proteinkinase G und die CNG-Kanäle, bei welchen sowohl Inhibitoren als auch Aktivator detektiert werden konnten. Ziel war es nun, diese cGMP-Analoga in Zellen, Gewebe- und Mausmodellen auf ihren Einfluss auf den Photorezeptoruntergang zu untersuchen. Hierbei wurde vermutet, dass die wirksamsten cGMP-

Derivate sowohl die PKG als auch die CNG-Kanäle hemmen, da durch eine vermehrte Aktivierung beider Targets bereits eine erhöhte Rate an Zelluntergängen in der Retina nachgewiesen werden konnte (Paquet-Durand et al. 2009, Wang et al. 2017b). Vier der getesteten zyklischen Nukleotide zeigten eine signifikante Neuroprotektion der Photorezeptoren sowohl bei Zell- als auch bei Gewebeuntersuchungen. Zusätzlich sollten die Analoga jedoch die Phototransduktionskaskade und die Licht-induzierte Antwort der Zapfen-Photorezeptorzellen intakt halten, da diese zu Beginn der Erkrankung noch funktionsfähig sind und somit nicht inhibiert werden sollen (Campochiaro und Mir 2018). Dieses Kriterium erfüllten nur noch Rp-8-Br-PET-cGMPS und Rp-8-pCPT-cGMPS der zehn getesteten Derivate. Um nun weitere Erkenntnisse in der Wirkungsweise dieser Analoga erhalten zu können, wurden auch für diese Arbeit die beiden Liganden ausgewählt und auf ihren Einfluss auf das Schaltverhalten des HCN2-Kanals untersucht. Letztendlich stellte sich Rp-8-Br-PET-cGMPS bei Vighi et. al als der vielversprechendste Ligand heraus. Da dieser die PET-Substitution am Rp-cGMPS-Rückgrat enthält, welche die zyklischen Nukleotide zum kompetitiven Antagonist des Stäbchen-CNG-Kanals werden lässt, waren auch weitere PET-substituierte Liganden mit zusätzlichen Modifikationen an anderen Stellen interessant (Wei et al. 1996). Deshalb erfolgte des Weiteren die Untersuchung der Wirkung von Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS und Rp-(2-N)ET-cGMPS auf den HCN2-Kanal. Inwieweit die PET-Gruppe allein Einfluss auf den HCN2-Kanal zeigt, wurde durch Überprüfung des Liganden PET-cGMPS erforscht.

Bei den Experimenten von Vighi et. al zeigte die Applikation von 50 μM Ligandenlösung keine toxischen Nebenwirkungen an Explant-Kulturen von Wildtyp-Mäusen, so dass diese Menge auch als eine potentielle Behandlungsdosis der *in vivo*-Studien an Mausmodellen erachtet wurde (Vighi et al. 2018). Folglich wurden auch alle elektrophysiologischen Untersuchungen in dieser Arbeit mit einer Ligandenkonzentration von 50 μM durchgeführt.

Für den potentiellen Einsatz der cGMP-Analoga zur Behandlung von *Retinitis pigmentosa* war es nun entscheidend, die Liganden zu identifizieren, die neben dem inhibitorischen Einfluss auf den CNG-Kanal der Stäbchen und der Proteinkinase G den HCN-Kanal entweder aktivieren oder in seiner Funktion nicht beeinflussen. Diese Überlegung stammt aus der Beobachtung und Feststellung, dass die Inhibition des HCN-Kanals zu einem schnelleren Fortschreiten des Krankheitsprozesses führt und somit diesem Kanal eine protektive Funktion im Rahmen der Erkrankung zugeschrieben wurde (Schon et al. 2016). Demzufolge waren von besonderem Interesse hierbei die Untersuchungen des Einflusses von Rp-8-Br-PET-cGMPS und Rp-8-pCPT-cGMPS auf den HCN-Kanal.

5.3 Rp-8-pCPT-cGMPS als Agonist des HCN-Kanals

Um weitere Erkenntnisse über die physiologische Rolle von cGMP in biochemischen Prozessen der Organismen zu gewinnen, erfolgten bereits einige Untersuchungen mit dem cGMP-Derivat Rp-8-pCPT-cGMPS. Dabei konnte herausgefunden werden, dass dieser Ligand die cGMP-abhängige Proteinkinase inhibiert, ohne dabei die cAMP-abhängige Proteinkinase oder die cGMP-regulierte Phosphodiesterase zu beeinflussen (Butt et al. 1994). Zusätzlich zeigte er bei niedrigen Konzentrationen einen agonistischen Effekt am CNG-Kanal der Stäbchen, während er bei höheren Konzentrationen als nicht-kompetitiver Antagonist wirkte (Wei et al. 1998). Dieser divergente Einfluss auf die Kanalaktivität konnte auch durch Wucherpfennig bestätigt werden (Wucherpfennig 2020).

Bei den Untersuchungen zur Wirkung auf den HCN2-Kanal stellte sich Rp-8-pCPT-cGMPS als ein potenter Agonist dar. Er aktivierte den HCN2-Kanal bei einer Konzentration von 50 μM genauso wirksam wie cAMP, indem sich durch die Applikation des Liganden in gleichem Maße wie mit cAMP eine Erhöhung der Stromamplitude zeigte. Diese verhielt sich mit 99 % sogar noch effektiver als bei der Zufuhr von cGMP, durch die lediglich 95 % erreicht wurden. Genauso effektiv verhielt sich der Ligand auch bei der Untersuchung der Strom-Spannungs-Beziehung im Vergleich zu cAMP. Während durch die Zufuhr von cAMP eine Verschiebung der Aktivierung um $21,5 \pm 2,6$ mV erfolgte, betrug der $\Delta V_{1/2}$ -Wert für Rp-8-pCPT-cGMPS $17,03 \pm 0,68$ mV. Somit besitzt das modifizierte Nukleotid eine ähnliche Effektivität wie cAMP, die Aktivierung zu positiveren Werten der Spannung zu verschieben. Schlussfolgernd zeigte sich Rp-8-pCPT-cGMPS gleich in seiner Wirkung auf den HCN2-Kanal wie der native Ligand cAMP. Den vorangegangenen Überlegungen zur Folge wäre aus reiner Sicht der HCN-Kanal-Untersuchungen Rp-8-pCPT-cGMPS als cGMP-Analogen für eine Anwendung in der Therapie der *Retinitis pigmentosa* potenziell geeignet. In den elektrophysiologischen Untersuchungen durch Wucherpfennig zeigte sich jedoch eine Wirkung auf sowohl Stäbchen- als auch die Zapfen-Kanäle, indem Rp-8-pCPT-cGMPS inhibitorisch auf beide Isoformen wirkte. Somit würden die zu Beginn der Erkrankung aber noch intakten Zapfen ebenfalls beeinflusst und möglicherweise in ihrer Funktion gestört und vorzeitig iatrogen geschädigt werden (Wucherpfennig 2020). Auch bei den Experimenten von Vighi et. al zeigte sich durch Rp-8-pCPT-cGMPS ein gesteigerter Ca^{2+} -Einstrom in die Zapfen-Photorezeptorzellen (Vighi et al. 2018). Eine langfristige Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist jedoch mit einer schädigenden Auswirkung auf die retinalen Zellen verbunden (Fox et al. 1999).

Zusammenfassend scheint der Ligand also nicht den Anforderungen an ein therapeutisch anwendbares cGMP-Analogon gerecht werden zu können.

5.4 Rp-8-Br-PET-cGMPS als der vielversprechendste Ligand

Wie bereits beschrieben stellte sich Rp-8-Br-PET-cGMPS bei den Experimenten von Vighi et. al zur Vorauswahl der zehn Liganden als der vielversprechendste heraus und wurde für die weiterführenden Forschungen ausgewählt (Vighi et al. 2018).

Um zu ermitteln, wodurch dieses cGMP-Derivat seinen positiven Effekt auf das Überleben der Photorezeptoren ausübte, analysierten Vighi et. al molekulare Prozesse, die der CNG-Kanal- und der PKG-Aktivierung nachgeschaltet sind. Dabei zeigten sich sowohl verminderte Ca^{2+} -Level als auch eine verminderte Phosphorylierung eines Zielproteins der Proteinkinase G. Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass sowohl die PKG als auch die CNG-Kanäle durch Rp-8-Br-PET-cGMPS inhibiert wurden und als Folge dessen der Photorezeptordegeneration entgegengewirkt werden konnte. Zusätzlich konnten durch diese Untersuchungen auch andere vorangegangene experimentelle Studien mit cGMP-Analoga bestätigt werden, bei denen Rp-8-Br-PET-cGMPS bereits als kompetitiver Antagonist der Stäbchen-CNG-Kanäle und als Inhibitor der cGMP-abhängigen Proteinkinase definiert wurde (Wei et al. 1996, Butt et al. 1995).

Durch die Untersuchung der Wirkung von Rp-8-Br-PET-cGMPS auf den HCN2-Kanal in dieser Arbeit gelang eine zusätzliche Charakterisierung dieses cGMP-Derivats, indem es als HCN2-Kanal-Agonist eingeordnet werden konnte. Da die Erhaltung der Funktionsfähigkeit des HCN-Kanals eine entscheidende Rolle für den Verlauf der *Retinitis pigmentosa* zu spielen scheint (Schon et al. 2016), erfolgte eine genauere elektrophysiologische Untersuchung zur Wirkung von Rp-8-Br-PET-cGMPS auf den HCN2-Kanal.

Zunächst sollte überprüft werden, inwieweit das cGMP-Analogon im Vergleich zu cAMP als physiologischen Liganden des HCN-Kanals in der Lage ist, die Stromamplitude des Kanals zu erhöhen. Dabei zeigte sich, dass Rp-8-Br-PET-cGMPS 98 % der maximalen Stromamplitude von cAMP erreichen und somit in der Effektivität gleichwertig mit cAMP eingestuft werden kann. Zusätzlich erzeugte es sogar höhere maximale Stromamplituden als cGMP, welches eine größtmögliche Aktivierung des Stroms von 95% im Vergleich zu cAMP zeigte.

Zur weiteren Charakterisierung dieses cGMP-Analogons erfolgte auch die Untersuchung der Strom-Spannungs-Beziehungen. Dabei mussten Spannungen von $-119,3 \pm 1,77$ mV ohne Ligandenzufuhr und $-101,0 \pm 1,53$ mV bei zusätzlicher Applikation von Rp-8-Br-PET-cGMPS

anliegen, um den HCN2-Kanal halbmaximal zu aktivieren. Somit ergab sich ein $\Delta V_{1/2} = 17,09 \pm 1,24$ mV, welches den Differenzen von cAMP mit $\Delta V_{1/2} = 19,5 \pm 1,24$ mV und von cGMP mit $\Delta V_{1/2} = 22,1 \pm 1,1$ mV gegenübergestellt werden konnte. Folglich ließ sich erkennen, dass alle drei zyklischen Nukleotide mit sehr ähnlicher Effektivität dazu in der Lage waren, die Kurve zu positiveren Werten der Spannung zu verschieben.

Ersichtlich wurde der Unterschied in der Wirksamkeit der Liganden jedoch im Vergleich der notwendigen Konzentrationen zur halbmaximalen Aktivierung des HCN2-Kanals. Während $0,027 \mu\text{M}$ cAMP und $0,189 \mu\text{M}$ cGMP nötig waren, um den HCN2-Kanal halbmaximal zu aktivieren, lag der EC_{50} -Wert für Rp-8-Br-PET-cGMPS bei $0,024 \mu\text{M}$. Demnach zeigten sich für cAMP und Rp-8-Br-PET-cGMPS nahezu identische Konzentrationen, was dem modifizierten zyklischen Nukleotid eine hohe scheinbare Affinität zum HCN2-Kanal verleiht. Im Vergleich zu cGMP brauchte es allerdings nur 12,9% Rp-8-Br-PET-cGMPS, um eine halbmaximale Kanalaktivierung zu erreichen. Somit besitzt Rp-8-Br-PET-cGMPS in diesem Vergleich eine 7,8-fach höhere Potenz als cGMP. Schlussendlich lässt sich die Wirksamkeit von Rp-8-Br-PET-cGMPS auf den HCN2-Kanal im Vergleich zum physiologischen Liganden cAMP als nahezu identisch und im Vergleich zu cGMP sogar als noch größer beschreiben.

Tabelle 12. Effektivität und Potenz von cGMP und Rp-8-Br-PET-cGMPS im Vergleich zu cAMP.

	cGMP	Rp-8-Br-PET-cGMPS
Effektivität in der HCN2-Kanalaktivierung	95 %	98 %
Potenz	6,9-fach geringer	7,8-fach höher

Da diesen Auswertungen zur Folge die Modifikationen des cGMP-Grundgerüst, die Rp-8-Br-PET-cGMPS ausmachen, einen Einfluss auf das Schaltverhalten des HCN2-Kanals zu haben scheinen, war von großem Interesse, welchen Beitrag die PET-Gruppe an den Auswirkungen am HCN2-Kanal leistet. Bei vorangegangenen Untersuchungen auf den Zapfen-CNG-Kanal konnte PET-cGMP allein keine Aktivierung des Kanals hervorrufen, währenddessen durch die Ko-Applikation mit cGMP größere Ströme als durch cGMP allein induziert werden konnten (Wei et al. 1996). Im Gegensatz dazu war es durch PET-cGMP möglich, die Stromamplitude des HCN2-Kanals effektiv zu erhöhen. Auch dieser Ligand bewirkte eine maximale Stromaktivierung von 98 % im Verhältnis zu cAMP. Der Unterschied zum physiologischen Liganden wurde daraufhin jedoch beim Vergleich der Spannungsabhängigkeiten erkennbar. Hierbei zeigte sich, dass durch PET-cGMP lediglich eine Verschiebung der halbmaximalen Spannung um $8,51 \pm 1,74$ mV gelang, was einen Betrag von weniger als der Hälfte der $\Delta V_{1/2}$ -

Werte von cAMP, cGMP und Rp-8-Br-PET-cGMPS ausmachte. Die PET-Substitution am cGMP-Grundgerüst allein besitzt demnach eine negative Auswirkung auf die Effektivität der Liganden in ihrer Wirkung auf den HCN2-Kanal. Durch die anderen Substituenten an Rp-8-Br-PET-cGMPS in Form des Schwefel-Atoms am zyklischen Phosphat-Rest und des Brom-Atoms an Position 8 der Nukleinbase scheint dieser negative Effekt jedoch wieder aufgehoben zu werden. Somit bestätigte sich auch aus der Sicht unserer Experimente auf den HCN2-Kanal, dass Rp-8-Br-PET-cGMPS im Einsatz als zielgerichtete Therapie der *Retinitis pigmentosa* im Gegenteil zu PET-cGMP den Liganden mit dem größeren Potenzial darstellt.

Die in dieser Arbeit aufgeführten Untersuchungen zur Wirksamkeit des cGMP-Analogons Rp-8-Br-PET-cGMPS auf den HCN2-Kanal bauen auf die elektrophysiologischen Messungen von Wucherpfennig auf, bei denen unter anderem die Wirkung von Rp-8-Br-PET-cGMPS auf den CNG-Kanal untersucht wurde. Dabei konnte festgestellt werden, dass die alleinige Applikation des Liganden die CNG-Kanäle nicht aktivieren konnte, aber die Ko-Applikation des cGMP-Derivats gemeinsam mit cGMP zu einer gewünschten, konzentrationsabhängigen Inhibition des cGMP-induzierten Stroms führte. Allerdings zeigte sich dies sowohl für die CNG-Kanäle der Zapfen (CNGA3:B3) als auch der Stäbchen (CNGA1:B1a). Da die Zapfen zu Beginn der Erkrankung jedoch noch keine Pathologien und eine physiologische cGMP-Konzentration aufweisen, wäre eine alleinige Zufuhr des Liganden ungeeignet, weil somit auch die noch funktionsfähigen CNGA3:B3-Kanäle inhibiert werden würden. Deshalb erfolgte durch Wucherpfennig die Herstellung von Mischlösungen aus einem Inhibitor der CNGA1:B1a- und CNGA3:B3-Kanäle und einem selektiven CNGA3:B3-Agonist. Somit gelang es, eine konzentrationsabhängige Kanalselektivität zu erreichen, bei der der CNGA1:B1a-Kanal sehr stark inhibiert, der CNGA3:B3-Kanal jedoch nur gering in seiner Funktionsfähigkeit beschränkt wird. Dies hätte bei Applikation *in vivo* zur Folge, dass keine Auswirkungen auf den noch physiologisch wirksamen Kanal der Zapfen zu erwarten wären. Im Gegensatz dazu würde der Kanal der Stäbchen jedoch wieder nahe der physiologischen Form aktiviert werden, was zu einem verminderten Einstrom von Ca^{2+} und einer Verringerung der damit verbundenen Kaskaden mit der Folge des Zelltodes führen würde.

Beim Zusammenführen der Erkenntnisse von Vighi et. al, Wucherpfennig und den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen lässt sich weiterhin Rp-8-Br-PET-cGMPS als der wahrscheinlich aussichtsreichste Ligand zur Verhinderung des Fortschreitens der retinalen Degeneration bei *Retinitis pigmentosa* beschreiben. Durch die Untersuchungen dieses cGMP-Analogons in seiner Wirkung auf den HCN2-Kanal kann davon ausgegangen werden, dass bei seiner Applikation trotz der gewünschten Inhibition der Proteinkinase G und der CNG-Kanäle

in den Photorezeptoren der HCN-Kanal in seiner Aktivität nicht beeinträchtigt wird. Schön et al. zeigten, welche entscheidende Rolle der HCN-Kanal in der Homöostase der retinalen Funktion zu haben scheint (Schön et al. 2016). Wurde der HCN-Kanal in degenerierenden Photorezeptorzellen genetisch deletiert oder pharmakologisch inhibiert, so verstärkte sich die Progression der Erkrankung dramatisch. Die schädlichen Auswirkungen des Funktionsverlusts des HCN-Kanals manifestierten sich in einer gesteigerten Degeneration der Stäbchen-Photorezeptoren, die mit einem sekundär beschleunigten Untergang der Zapfen-Photorezeptoren und des Pigmentepithels assoziiert sind. Letztlich zeigte sich durch diese Untersuchungen der protektive Effekt von HCN-Kanälen auf die Photorezeptordegeneration, so dass sie als eine der Hauptfaktoren für die retinale Überlebensfähigkeit bei Erkrankungen der Photorezeptoren herausgestellt werden konnten. Umso entscheidender ist die Erkenntnis dieser Arbeit, dass die HCN-Kanäle durch die Applikation des cGMP-Analogons Rp-8-Br-PET-cGMPS wahrscheinlich weiterhin aktiv bleiben und ihren Beitrag zum Erhalt der retinalen Funktionsfähigkeit bei einer potentiellen Behandlung von *Retinitis pigmentosa* leisten können. Demnach eignet sich Rp-8-Br-PET-cGMPS mit seiner agonistischen Wirkung auf den HCN2-Kanal aus elektrophysiologischer Betrachtung für eine Therapie von *Retinitis pigmentosa*.

5.5 Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS und Rp-(2-N)ET-cGMPS als partielle Agonisten

Aus den Untersuchungen zum Einfluss von Rp-8-Br-PET-cGMPS im Vergleich zu PET-cGMP auf das Schaltverhalten des HCN2-Kanals wurde ersichtlich, dass durch die PET-Modifizierung der Liganden allein nur eine geringere Effektivität in der Aktivierung des HCN2-Kanals im Vergleich zu dem Liganden, an den weitere Substituenten zusätzlich zur PET-Verbindung angehängt wurden, erreicht werden konnte. Durch die Verschmelzung der Purinstruktur des nativen cGMP mit der PET-Struktur werden die Analoga zu einem Antagonisten der Stäbchen-CNG-Kanäle (Wei et al. 1996). Diese Eigenschaft soll therapeutisch genutzt werden, um die CNG-Kanäle in den Stäbchen in ihrer pathologisch gesteigerten Aktivität und dem daraus resultierenden exzessiven Ca^{2+} -Einstrom zu hemmen. Somit fiel die Auswahl zur Analyse der Auswirkungen weiterer cGMP-Derivate auf den HCN2-Kanal auf Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS, welches neben allen Substituenten von Rp-8-Br-PET-cGMPS zusätzlich eine para-Methylphenyl-Gruppe am Imidazol-Ring trägt.

Bei den elektrophysiologischen Untersuchungen zeigten sich jedoch einige Unterschiede im Vergleich zu Rp-8-Br-PET-cGMPS und cAMP. 8-Br-pMe-PET-cGMPS konnte bei

Applikation nur eine Erhöhung der Stromamplitude des HCN2-Kanals von zirka 14 % erreichen, während Rp-8-Br-PET-cGMPS eine Steigerung um 98 % bewirkte. Dies bedeutet, dass durch die Zugabe von 8-Br-pMe-PET-cGMPS nur eine sehr geringe Steigerung der Öffnung des HCN2-Kanals erfolgte, so dass dieses modifizierte zyklische Nukleotid nur eine weitaus schwächere Stromaktivierung im Vergleich zu Rp-8-Br-PET-cGMPS und cAMP hervorruft. Auch bei den Experimenten zur Spannungsabhängigkeit beliefen sich die Werte für die Spannung der halbmaximalen Aktivierung des HCN2-Kanals ohne Ligandenbindung auf $V_{1/2} = -121,45 \pm 0,81$ mV und mit Ligandenbindung auf $V_{1/2} = -112,1 \pm 1,76$ mV. Somit ergab sich aus der Differenz eine Verschiebung der halbmaximalen Spannung durch 8-Br-pMe-PET-cGMPS um $9,34 \pm 2,27$ mV. Demnach ist dieses cGMP-Analogon nur etwa halb so effektiv im Vergleich zu Rp-8-Br-PET-cGMPS und cAMP, die Aktivierung zu weniger negativen Werten der Spannung zu verschieben und die benötigte Spannungsenergie zur Öffnung des HCN2-Kanals zu verringern.

Ein weiteres cGMP-Derivat, welches außer der Brom-Substitution die gleiche Modifizierung wie 8-Br-PET-cGMPS besitzt, jedoch an der PET-Verbindung einen zusätzlichen Naphtyl-Ring trägt, lieferte ähnliche Ergebnisse bei den Messungen wie 8-Br-pMe-PET-cGMPS. Auch durch die Applikation dieses Derivats konnte nur eine Steigerung der Stromamplitude von zirka 14 % erreicht werden. Zusätzlich fiel die Fähigkeit des Liganden, die notwendige Spannung zur halbmaximalen Aktivierung des HCN2-Kanals zu verringern, mit einem $\Delta V_{1/2} = 5,51 \pm 1,07$ mV noch geringer aus als die von 8-Br-pMe-PET-cGMPS.

Somit besitzen die beiden getesteten Liganden eine weitaus geringere Effektivität sowohl in der Erhöhung der Stromamplitude als auch in der Verschiebung der halbmaximalen Spannung verglichen mit cAMP, cGMP und auch 8-Br-PET-cGMPS. Sie können also nur als partielle Agonisten des HCN2-Kanals eingestuft werden.

Da alle Messungen mit Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS oder Rp-(2-N)ET-cGMPS nur mit einer Konzentration durchgeführt wurden, konnte aus den Ergebnissen nicht geschlussfolgert werden, was als ursächlich für die Unterschiede in der Wirkungsweise zu den physiologischen Liganden cAMP und cGMP und zu 8-Br-PET-cGMPS betrachtet werden kann. Deshalb folgten weitere Untersuchungen auf den HCN2-Kanal mit einer Ligandenmischung aus 50 μ M Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS oder Rp-(2-N)ET-cGMPS und zusätzlichen 0,2 μ M cGMP und als Referenz mit 0,2 μ M cGMP allein. Diese sollten Aufschluss über die verschiedenen denkbaren Möglichkeiten der Wirkungsweise der cGMP-Analoga in Verbindung mit cGMP geben. Entweder könnten die cGMP-Derivate auch an die Bindungsstellen des HCN2-Kanals binden und mit cGMP gemeinsam eine stärkere Aktivierung des Kanals bewirken. Andererseits wäre

es möglich, dass die modifizierten Nukleotide bei gleichzeitiger Applikation mit cGMP auch an die Bindungsstellen des HCN2-Kanals binden, allerdings nicht die notwendige Konformationsänderung zur Aktivierung des Kanals hervorrufen oder sie nur eine geringe Affinität zum HCN2-Kanal besitzen und damit cGMP nahezu ungestört an den Kanal binden lassen.

Aus der Anpassung der Hill-Funktion der gemittelten Daten von den Untersuchungen mit sättigender cGMP-Konzentration auf den HCN2-Kanal ergab die cGMP-Konzentration, die zur halbmaximalen Aktivierung des HCN2-Kanals notwendig war, 0,189 μM . Somit wurden als gerundete Menge auch 0,2 μM cGMP für die Ligandenmischung verwendet. In den vorangegangenen Messungen war der HCN2-Kanal bei dieser nahezu gleichen Konzentration zu 50 % aktiviert, so dass in dieser Situation die beste Möglichkeit bestand, die Kompetitionen zwischen cGMP und dem modifizierten zyklischen Nukleotid zu testen und eventuelle Modulierungen am Kanal zu zeigen. Zusätzlich sollten die Messungen mit den angepassten 0,2 μM cGMP allein noch einmal Aufschluss über die Aktivierung des Kanals bei Zugabe dieser Konzentration geben.

In den elektrophysiologischen Untersuchungen stellten sich bei der Zufuhr der Ligandenmischungen im Vergleich mit cGMP allein nahezu identische Stromspuren dar. Dies ließ darauf schließen, dass die Zugabe der modifizierten zyklischen Nukleotide scheinbar keinen Einfluss auf die cGMP-Wirksamkeit auf den HCN2-Kanal besitzt.

Aus den Werten der maximalen Stromaktivierung für die verschiedenen Applikationen erfolgte die Bildung des Verhältnisses zwischen Ligandenmischung oder cGMP allein und cAMP als Referenz ($I_{\text{max,-Ligand}} / I_{\text{max,-cAMP}}$). Hierbei zeigte sich, dass die alleinige Zugabe von cGMP eine 70 %ige Öffnung des HCN2-Kanals bewirkte. Im Vergleich dazu konnte der HCN2-Kanal durch die Mischung von Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS und cGMP um 58 % und durch die Mischung von Rp-(2-N)ET-cGMPS und cGMP um 76 % geöffnet werden. Durch die hohe Streuung der Einzelwerte unterscheiden sich diese Ergebnisse nicht signifikant, so dass im Vergleich zu cGMP allein kein Unterschied in der Effektivität der Ligandenmischungen, den HCN2-Kanal maximal zu aktivieren, gezeigt werden konnte. Somit bestätigte sich der Verdacht durch die Untersuchungen der alleinigen Applikation von Br-pMe-PET-cGMPS oder Rp-(2-N)ET-cGMPS, dass die Ligandenmischungen keine verstärkte Öffnung des HCN2-Kanals hervorrufen können. Da die Ergebnisse der Ligandenmischungen im Vergleich zu cGMP die gleichen sind, trifft am ehesten die Möglichkeit zu, dass Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS und Rp-(2-N)ET-cGMPS eine geringere Affinität zum HCN2-Kanal besitzen als cGMP. Somit kann

auch bei gleichzeitiger Applikation cGMP die Bindungsstellen besetzen und den Kanal ohne Störung durch die modifizierten zyklischen Nukleotide aktivieren.

Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS und Rp-(2-N)ET-cGMPS sind demzufolge niedrig affin gegenüber der Bindung des HCN2-Kanals und verhalten sich damit gegensätzlich zu dem etwas weniger modifizierten cGMP-Derivat Rp-8-Br-PET-cGMPS. Schlussfolgernd scheint sich eine weitere Modifikation der PET-Struktur negativ auf die Effektivität der Liganden auszuwirken. Bei alleiniger Applikation besaß Rp-(2-N)ET-cGMPS mit seiner Naphthyl-Substitution eine noch geringere Affinität zum HCN2-Kanal als der eine para-Methylphenyl-Gruppe tragende Ligand Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS. Demnach kann angenommen werden, dass je größer die substituierten Verbindungen an der PET-Struktur sind, umso weniger affin sich das cGMP-Analogon zum Kanal verhält. Es benötigt jedoch wahrscheinlich die Substitution an Position 8 der Nukleinbase und das Schwefel-Atom am zyklischen Phosphat-Rest, um eine hohe Wirksamkeit der Liganden auf den HCN2-Kanal hervorzurufen.

Um nun die Anwendbarkeit der zwei cGMP-Analoga in der Therapie der *Retinitis pigmentosa* einschätzen zu können, waren auch die Ergebnisse der Experimente von Wucherpfennig von Bedeutung. Bei den Untersuchungen zur Wirksamkeit der Liganden auf den CNG-Kanal zeigte sich sowohl auf die Stäbchen- als auch auf die Zapfen-CNG-Kanäle ein inhibierender Effekt. Somit konnte Wucherpfennig den zyklischen Nukleotiden keine Eignung in der *Retinitis pigmentosa*-Therapie zuschreiben (Wucherpfennig 2020). Auch aus elektrophysiologischer Sicht in Bezug auf die Wirksamkeit von Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS und Rp-(2-N)ET-cGMPS auf den HCN2-Kanal kann aus den Daten eine Einschränkung der Funktionsfähigkeit des HCN-Kanals bei Applikation der cGMP-Analoga *in vivo* nicht ausgeschlossen werden. Da dem HCN-Kanal durch Schön et. al ein protektiver Effekt in den erkrankten Photorezeptoren zugeschrieben wurde, ist es möglich, dass durch den Gebrauch dieser Liganden sogar eine schnellere Progression des Krankheitsprozesses hervorgerufen werden könnte. Diese Beobachtungen fielen zumindest bei der Inhibition der HCN-Kanäle in den degenerierenden Photorezeptoren bei Schön et. al auf (Schön et al. 2016). Somit sind Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS und Rp-(2-N)ET-cGMPS primär nicht für den Einsatz in der Therapie der *Retinitis pigmentosa* geeignet.

5.6 Mögliche unerwünschte Wirkungen

Eine der großen Herausforderungen in der Behandlung von Netzhauterkrankungen stellt die Überwindung der Blut-Retina-Schranke dar, die als eine physiologische Barriere der Netzhaut

für die Regulation des Ein- und Ausstroms beispielsweise von Ionen, Proteinen und Wasser verantwortlich ist. Dabei befindet sich ein spezieller *Tight-Junction*-Komplex zwischen den retinalen Endothelzellen, um die Durchlässigkeit aller Moleküle steuern und die Netzhaut vor schädlichen Stoffen schützen zu können (Cunha-Vaz et al. 1966, Cunha-Vaz et al. 2011). Demzufolge sind auch systemisch applizierte Medikamente nicht einfach in der Lage, die Retina zu erreichen, und es benötigt besondere *Drug-Delivery*-Systeme, um die Blut-Retina-Schranke zu überwinden.

Auch Vighi et. al benutzten in ihrer Studie zur *in vivo* Untersuchung von Rp-8-Br-PET-cGMPS an Modellmäusen eine liposomale Transportkapsel. Vereinfacht beschrieben erfolgte eine Markierung dieser Kapsel mit Glutathion, einem endogenen Tripeptid, welches eine zentrale Rolle in der Detoxifikation von intrazellulären Metaboliten spielt. Da in der sehr ähnlich aufgebauten Blut-Hirn-Schranke ein aktiver Glutathion-Transporter existiert, der bereits nachgewiesenermaßen mit Glutathion markierte Transportkapseln über die Barriere brachte, sollte dieser auch für den Transport der cGMP-Analoga über die Blut-Retina-Schranke genutzt werden (Rip et al. 2014, Kannan et al. 1990). Das enkapsulierte Rp-8-Br-PET-cGMPS wurde den Modellmäusen nach intraperitoneal injiziert und der erfolgreiche Transport in die Retina über Fluoreszenz belegt, die bei einmaliger Injektion nach vier Tagen auch immer noch nachweisbar war. Außerdem erfolgte eine regelmäßige Untersuchung der Tiere hinsichtlich ihres Verhaltens, des Fells oder der Haut. Sowohl dabei als auch während der durchgeführten Augenuntersuchungen konnten keine Abnormitäten festgestellt werden. Die Mäuse zeigten eine normale Gewichtszunahme und waren im Allgemeinen äußerlich nicht von der Kontrollgruppe zu unterscheiden. Auch postmortal gab es bei den Untersuchungen der inneren Organe (Herz, Lunge, Leber, Nieren und Gehirn) keine makroskopischen Veränderungen hinsichtlich Größe, Form und Farbe bzw. Perfusion zu berichten. Somit konnten primär keine unerwünschten Wirkungen hervorgerufen durch die Applikation der cGMP-Analoga nachgewiesen werden.

Dennoch ist es von Bedeutung, Überlegungen zu möglichen unerwünschten Wirkungen durch das Medikament anzustellen, wenn auch Versuche am Menschen dazu stattfinden sollten. Vighi et. al bestätigten einen inhibitorischen Einfluss von Rp-8-Br-PET-cGMPS auf die Wirkungsweise der CNG-Kanäle und der Proteinkinase G. In der vorliegenden Arbeit stellte sich der Ligand zusätzlich als HCN2-Kanal-Agonist heraus.

Grundsätzlich befinden sich HCN-Kanäle jedoch nicht nur in der Retina. Neben einer nachgewiesenen Genexpression in beispielsweise Lunge, Pankreas oder Skelettmuskel werden die Kanäle vor allem auch im Gehirn und im Herz exprimiert (Santoro und Tibbs 1999).

Der durch Hyperpolarisation aktivierte Stromfluss I_h durch den HCN-Kanal wirkt beispielsweise an verschiedenen neuronalen Funktionen mit. Unter anderem zählen dazu die Determinierung des Ruhemembranpotentials, die Generierung von neuronalen Oszillationen und die Regulation von synaptischen Transmissionen. Auch an multiplen physiologischen Prozessen wie dem Schlaf und der Erregung, dem Lernen und dem Gedächtnis und der Wahrnehmung und der Empfindung ist I_h beteiligt. Auch einige Erkrankungen werden mit einer veränderten Wirkungsweise oder Expression von HCN-Kanälen in Verbindung gebracht. Während bei Experimenten beispielsweise die Inhibition von HCN-Kanälen in einer erhöhten Anfälligkeit für epileptische Anfälle resultierte, wies eine Studie daraufhin, dass ein erhöhter I_h an den Endigungen primärer afferenter Nervenfasern zu einer gesteigerten exzitatorischen synaptischen Übertragung führen und damit Teil der Pathogenese des neuropathischen Schmerzes sein soll (He et al. 2014).

Zusätzlich zeigten Untersuchungen an thalamokortikalen Neuronen, dass cGMP dort die Aktivierung von I_h begünstigt und an der tonischen Aktivität dieser Nervenzellen beteiligt ist. Somit scheint cGMP der Ligand zu sein, der die thalamischen und kortikalen HCN-Kanäle reguliert und eine exzitatorische Rolle im Thalamus einnimmt (Dahunashvili et al. 2018).

Das Prinzip der liposomalen Transportkapsel, die für die Beförderung der cGMP-Analoga verwendet wurde, hatte sich bereits bei Experimenten zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke von beispielsweise Opioid-Peptiden bewährt (Lindqvist et al. 2013). Somit könnte es bei der Applikation der cGMP-Derivate auch zu einem Übertritt über die Blut-Hirn-Schranke hinweg kommen. Da Rp-8-Br-PET-cGMPS als ein HCN2-Agonist charakterisiert wurde, könnte die Gabe dieses cGMP-Derivats auch zu einer höheren Erregbarkeit der Neurone und einer gesteigerten Transmitterausschüttung führen. Welche genauen Auswirkungen eine Agonisierung des HCN-Kanals durch Rp-8-Br-PET-cGMPS dabei haben könnte, sollte Bestandteil der Beobachtungen bei möglicherweise stattfindenden Applikationen am Menschen sein. Zuvor wäre dafür eine Untersuchung an Tiermodellen von Bedeutung, um zu überprüfen, ob überhaupt eine Anreicherung des cGMP-Analogons in Bereichen des Gehirns stattfinden würde.

Des Weiteren ist bekannt, dass die HCN-Kanäle eine entscheidende Rolle in der sinuatrialen Schrittmacheraktivität im Herzen spielen und einen der Hauptregulatoren der Herzfrequenz darstellen. Zusätzlich werden sie für die Ausbreitung der elektrischen Impulse benötigt und sind an der Koordination und Aufrechterhaltung des sinuatrialen Netzwerkes beteiligt. Demzufolge besitzen sie auch erhebliche Bedeutung in der Stabilisierung des kardialen Rhythmus (Wahl-Schott et al. 2014). Zusätzlich konnte bei Untersuchungen von humanen

atrialen Myozyten gezeigt werden, dass das durch Dehnung des Vorhofs ausgeschüttete atriale natriuretische Peptid (ANP) eine Verschiebung des mittleren Aktionspotentials zu positiveren Werten der Spannung bewirkte und parallel dazu eine Steigerung der I_h -Aktivierungsrate eintrat. Diese Effekte lagen am ehesten einer Modulation von intrazellulärem cGMP zugrunde und scheinen Auswirkungen auf den Zusammenhang zwischen Dehnung und der Arrhythmogenese des menschlichen Herzvorhofs zu haben, da durch diesen Mechanismus eine erhöhte Neigung zu spontaner Aktivität der Myozyten zu entstehen scheint (Lonardo et al. 2004). Somit besitzen die HCN-Kanäle auch im Zusammenhang mit cGMP eine wichtige Bedeutung in der physiologischen Wirkungsweise des Herzens.

Nun wäre es von Interesse, inwieweit die cGMP-Analoga Einfluss auf die Funktion des Herzens nehmen können. Als potentieller Agonist des HCN2-Kanals könnte auch durch die Applikation von Rp-8-Br-PET-cGMPS wie bei Lonardo et. al durch die Zugabe von 8-Br-cGMP eine Verschiebung der Aktivierungskurve zu positiveren Spannungswerten entstehen. Somit könnte es möglicherweise bei Applikation des cGMP-Analogons Rp-8-Br-PET-cGMPS zu Tachykardien oder Herzrhythmusstörungen kommen. Leider bestehen keine Informationen über die Vitalparameter wie zum Beispiel die Herzfrequenz bei den behandelten Mäusen von Vighi et. al. Diese sollten jedoch bei zukünftigen Experimenten eruiert werden, um eine eventuelle Beeinflussung der Herzaktion durch die cGMP-Derivate einschätzen zu können.

Schlussendlich zeigten die untersuchten Mäuse sowohl während der Behandlung mit Rp-8-Br-PET-cGMPS als auch *post mortem* keine Auffälligkeiten oder Unterschiede zu den Kontrolltieren. Dennoch sollte das nachweisliche Vorhandensein von HCN-Kanälen in vielen Organsystemen des menschlichen Körpers in Verbindung mit der in dieser Arbeit erfolgten Charakterisierung des cGMP-Analogons Rp-8-Br-PET-cGMPS als potenter HCN-Agonist dazu veranlassen, weiterhin auf mögliche unerwünschte Wirkungen während der Applikation des Derivats zu achten und genauere Untersuchungen vor allem am Herz und dem Gehirn durchzuführen.

Tabelle 13. Übersicht der gesamten Ergebnisse.

	cAMP	cGMP	Rp-8-pCPT- cGMPS	Rp-8-Br- PET-cGMPS	PET-cGMP	Rp-8-Br- pMe-PET- cGMPS	Rp-(2-N)ET- cGMPS	Rp-8-Br- pMe-PET- cGMPS + cGMP	Rp-(2-N)ET- cGMPS + cGMP
$I_{\max, \text{-Ligand}} / I_{\max, \text{-cAMP}}$		0,95 ± 0,08	0,96 ± 0,05	0,98 ± 0,02	0,98 ± 0,02	0,15 ± 0,04	0,14 ± 0,02	0,58 ± 0,11	0,76 ± 0,12
$V_{1/2}$ (in mV)	-101,6 ± 2,9	-100,1 ± 2,1	-97,8 ± 1,7	-101,0 ± 1,5	-110 ± 1,6	-112,1 ± 1,8	-115,94 ± 1,04		
$\Delta V_{1/2}$ (in mV)	19,8 ± 1,9	16,4 ± 1,8	17,0 ± 0,8	17,1 ± 1,2	8,52 ± 1,75	9,34 ± 2,27	5,51 ± 1,07		
$z\delta$	4,66 ± 0,47	5,83 ± 0,59	3,73 ± 0,06	4,12 ± 0,20	6,46 ± 0,48				
EC_{50} (in μM) für die Stromerhöhung	0,027	0,189		0,024					
H	0,57	0,57		0,52					
EC_{50} (in μM) für die $V_{1/2}$ -Verschiebung		11,7							
H		1,47							

6 Schlussfolgerungen

Ziel der Arbeit war es, cGMP-Derivate auf ihren Einfluss auf das Schaltverhalten des HCN-Kanals zu untersuchen und die Wirkung der verschiedenen Modifikationen des cGMP-Grundgerüsts zu vergleichen. Da dem HCN-Kanal bei der Augenerkrankung *Retinitis pigmentosa* ein protektiver Effekt zugeschrieben wurde, sollten die cGMP-Analoga identifiziert werden, die einen agonistischen Effekt auf den Kanal besitzen.

Der HCN1-Kanal reagierte bereits im Vergleich zwischen der Applikation von cGMP und keiner Ligandenanwesenheit mit der gleichen Stromantwort und besitzt somit eine geringe scheinbare Affinität zu cGMP. Er war demnach für eine Untersuchung des Einflusses von zyklischen Nukleotiden auf das Schaltverhalten des HCN-Kanals ungeeignet. Folgende Ergebnisse konnten daraufhin bei der Untersuchung der Wirkung der cGMP-Analoga auf den HCN2-Kanal gewonnen werden:

- 1 Die getesteten Liganden Rp-8-pCPT-cGMPS, Rp-8-Br-PET-cGMPS, PET-cGMP, Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS und Rp-(2-N)ET-cGMPS können alle als Agonisten des HCN2-Kanals eingestuft werden. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Effektivität.
- 2 Rp-8-pCPT-cGMPS und Rp-8-Br-PET-cGMPS führen im gleichen Maße wie cAMP und mit einer noch höheren Effektivität als cGMP zu einer Steigerung der HCN2-Kanalaktivität.
- 3 Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS und Rp-(2-N)ET-cGMPS lassen sich nur als partielle Agonisten des HCN2-Kanals beschreiben. Sowohl in der Erhöhung der Stromamplitude als auch in der Verschiebung der halbmaximalen Spannung des HCN2-Kanals besitzen sie eine weitaus geringere Effektivität als cAMP oder cGMP.
- 4 Beim Vergleich von Rp-8-Br-PET-cGMPS und PET-cGMP zeigt sich eine identische maximale Stromaktivierung des HCN2-Kanals, jedoch kann durch die Applikation von PET-cGMP nur eine weitaus geringere Verschiebung der halbmaximalen Spannung erreicht werden. Die PET-Substitution allein scheint demnach eine negative Auswirkung auf die Effektivität des Liganden zu besitzen.

- 5 Unter Einbezug der Erkenntnisse anderer Forschungsarbeiten eignet sich Rp-8-Br-PET-cGMPS mit seiner agonistischen Wirkung auf den HCN2-Kanal weiterhin am ehesten für den Einsatz einer *Retinitis pigmentosa*-Therapie.

- 6 Bei der Entwicklung und Untersuchung neuer, noch selektiverer Liganden mit Wirkung auf den CNGA1:B1a-Kanal oder die Proteinkinase G sollte auch eine Testung der Einflussnahme dieser Analoga auf den HCN-Kanal erfolgen. Somit können unerwünschte Wirkungen verhindert werden, die möglicherweise durch die Ligandenapplikation hervorgerufene Inhibition des HCN-Kanals entstehen könnten.

Literaturverzeichnis

- Bareil C, Hamel CP, Delague V, Arnaud B, Demaille J, Claustres M. 2001. Segregation of a mutation in CNGB1 encoding the beta-subunit of the rod cGMP-gated channel in a family with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum Genet*, 108 (4):328-334.
- Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, Hoth M, Kurtz A, Leipziger J, Müller F, Pedain C, Rettig J, Wagner C, Wischmeyer E. 2016. *Duale Reihe Physiologie*. Dritte Aufl. Stuttgart: Thieme-Verlag.
- Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L. 2018. *Stryer Biochemie*. Achte Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Berson EL, Sandberg MA, Rosner B, Birch DG, Hanson AH. 1985. Natural course of retinitis pigmentosa over a three-year interval. *Am J Ophthalmol*, 99 (3):240-251.
- Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Hayes KC, Nicholson BW, Weigel-DiFranco C, Willett W. 1993. A randomized trial of vitamin A and vitamin E supplementation for retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol*, 111 (6):761-772.
- Biel M, Wahl-Schott C, Michalakakis S, Zong X. 2009. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev*, 89 (3):847-885.
- 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. *Nature*, 446 (7134):440-443.
- Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ. 1979. How does adrenaline accelerate the heart? *Nature*, 280 (5719):235-236.
- Butt E, Eigenthaler M, Genieser HG. 1994. (Rp)-8-pCPT-cGMPS, a novel cGMP-dependent protein kinase inhibitor. *Eur J Pharmacol*, 269 (2):265-268.
- Butt E, van Bemmelen M, Fischer L, Walter U, Jastorff B. 1990. Inhibition of cGMP-dependent protein kinase by (Rp)-guanosine 3',5'-monophosphorothioates. *FEBS Lett*, 263 (1):47-50.
- Butt E, Pohler D, Genieser HG, Huggins JP, Bucher B. 1995. Inhibition of cyclic GMP-dependent protein kinase-mediated effects by (Rp)-8-bromo-PET-cyclic GMPS. *Br J Pharmacol*, 116 (8):3110-3116.
- Campochiaro PA, Mir TA. 2018. The mechanism of cone cell death in Retinitis Pigmentosa. *Prog Retin Eye Res*, 62:24-37.
- Cervetto L, Demontis GC, Gargini C. 2007. Cellular mechanisms underlying the pharmacological induction of phosphenes. *Br J Pharmacol*, 150 (4):383-390.
- Chen J, Mitcheson JS, Lin M, Sanguinetti MC. 2000. Functional roles of charged residues in the putative voltage sensor of the HCN2 pacemaker channel. *J Biol Chem*, 275 (46):36465-36471.
- Chen Y, Burnett JC. 2018. Particulate Guanylyl Cyclase A/cGMP Signaling Pathway in the Kidney: Physiologic and Therapeutic Indications. *Int J Mol Sci*, 19 (4).
- Cunha-Vaz J, Bernardes R, Lobo C. 2011. Blood-retinal barrier. *Eur J Ophthalmol*, 21 Suppl 6:S3-9.
- Cunha-Vaz JG, Shakib M, Ashton N. 1966. Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. I. On the existence, development, and site of a blood-retinal barrier. *Br J Ophthalmol*, 50 (8):441-453.
- Daiger SP 2020. 21. Oktober. Summaries of Genes and Loci Causing Retinal Diseases. <https://sph.uth.edu/retnet/sum-dis.htm>.
- Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS. 2007. Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol*, 125 (2):151-158.
- Datunashvili M, Chaudhary R, Zobeiri M, Luttjohann A, Mergia E, Baumann A, Balfanz S, Budde B, van Lijstelaar G, Pape HC, Koesling D, Budde T. 2018. Modulation of

- Hyperpolarization-Activated Inward Current and Thalamic Activity Modes by Different Cyclic Nucleotides. *Front Cell Neurosci*, 12:369.
- Della Santina L, Piano I, Cangiano L, Caputo A, Ludwig A, Cervetto L, Gargini C. 2012. Processing of retinal signals in normal and HCN deficient mice. *PLoS One*, 7 (1):e29812.
- Demontis GC, Longoni B, Barcaro U, Cervetto L. 1999. Properties and functional roles of hyperpolarization-gated currents in guinea-pig retinal rods. *J Physiol*, 515 (Pt 3):813-828.
- Dias MF, Joo K, Kemp JA, Fialho SL, da Silva Cunha A, Jr., Woo SJ, Kwon YJ. 2018. Molecular genetics and emerging therapies for retinitis pigmentosa: Basic research and clinical perspectives. *Prog Retin Eye Res*, 63:107-131.
- DiFrancesco D. 1981. A study of the ionic nature of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J Physiol*, 314:377-393.
- DiFrancesco D, Tortora P. 1991. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature*, 351 (6322):145-147.
- Dryja TP, Rucinski DE, Chen SH, Berson EL. 1999. Frequency of mutations in the gene encoding the alpha subunit of rod cGMP-phosphodiesterase in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40 (8):1859-1865.
- Dryja TP, Finn JT, Peng YW, McGee TL, Berson EL, Yau KW. 1995. Mutations in the gene encoding the alpha subunit of the rod cGMP-gated channel in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (22):10177-10181.
- Edman A, Gestrelus S, Grampp W. 1987. Current activation by membrane hyperpolarization in the slowly adapting lobster stretch receptor neurone. *J Physiol*, 384:671-690.
- El-Kholy W, MacDonald PE, Fox JM, Bhattacharjee A, Xue T, Gao X, Zhang Y, Stieber J, Li RA, Tsushima RG, Wheeler MB. 2007. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in pancreatic beta-cells. *Mol Endocrinol*, 21 (3):753-764.
- Eysel U. 2019. Sehsystem und Augenbewegungen. In: Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S, Hrsg. *Physiologie*. 9., vollständig überarbeitete Auflage Aufl: Georg Thieme Verlag.
- Farber DB, Lolley RN. 1974. Cyclic guanosine monophosphate: elevation in degenerating photoreceptor cells of the C3H mouse retina. *Science*, 186 (4162):449-451.
- Fischer DM, Paquet-Durand F. 2019. [Development of cGMP Analogues for the Pharmacological Treatment of Neurodegenerative Diseases of the Retina]. *Klin Monbl Augenheilkd*, 236 (3):253-260.
- Fox DA, Poblenz AT, He L. 1999. Calcium overload triggers rod photoreceptor apoptotic cell death in chemical-induced and inherited retinal degenerations. *Ann N Y Acad Sci*, 893:282-285.
- Garthwaite G, Goodwin DA, Garthwaite J. 1999. Nitric oxide stimulates cGMP formation in rat optic nerve axons, providing a specific marker of axon viability. *Eur J Neurosci*, 11 (12):4367-4372.
- Graefe K-H. 2016. *Pharmakologie und Toxikologie*. 2., vollständig überarbeitete Auflage Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Greenwood IA, Prestwich SA. 2002. Characteristics of hyperpolarization-activated cation currents in portal vein smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282 (4):C744-753.
- Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. 2006. Retinitis pigmentosa. *Lancet*, 368 (9549):1795-1809.
- He C, Chen F, Li B, Hu Z. 2014. Neurophysiology of HCN channels: from cellular functions to multiple regulations. *Prog Neurobiol*, 112:1-23.
- Ho WK, Brown HF, Noble D. 1994. High selectivity of the i(f) channel to Na⁺ and K⁺ in rabbit isolated sinoatrial node cells. *Pflugers Arch*, 426 (1-2):68-74.
- Ishii TM, Takano M, Ohmori H. 2001. Determinants of activation kinetics in mammalian hyperpolarization-activated cation channels. *J Physiol*, 537 (Pt 1):93-100.

- Ishii TM, Nakashima N, Ohmori H. 2007. Tryptophan-scanning mutagenesis in the S1 domain of mammalian HCN channel reveals residues critical for voltage-gated activation. *J Physiol*, 579 (Pt 2):291-301.
- Kannan R, Kuhlenkamp JF, Jeandidier E, Trinh H, Ookhtens M, Kaplowitz N. 1990. Evidence for carrier-mediated transport of glutathione across the blood-brain barrier in the rat. *J Clin Invest*, 85 (6):2009-2013.
- Kaupp UB, Seifert R. 2002. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev*, 82 (3):769-824.
- Knop GC, Seeliger MW, Thiel F, Mataruga A, Kaupp UB, Friedburg C, Tanimoto N, Muller F. 2008. Light responses in the mouse retina are prolonged upon targeted deletion of the HCN1 channel gene. *Eur J Neurosci*, 28 (11):2221-2230.
- Komeima K, Rogers BS, Campochiaro PA. 2007. Antioxidants slow photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *J Cell Physiol*, 213 (3):809-815.
- 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. *Neuron*, 67 (1):75-85.
- Lee CH, MacKinnon R. 2017. Structures of the Human HCN1 Hyperpolarization-Activated Channel. *Cell*, 168 (1-2):111-120.e111.
- Liman ER, Tytgat J, Hess P. 1992. Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron*, 9 (5):861-871.
- Lincoln TM, Cornwell TL. 1993. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *Faseb j*, 7 (2):328-338.
- Lincoln TM, Pryzwansky KB, Cornwell TL, Wyatt TA, MacMillan LA. 1993. Cyclic-GMP-dependent protein kinase in smooth muscle and neutrophils. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, 28:121-132.
- Lindqvist A, Rip J, Gaillard PJ, Bjorkman S, Hammarlund-Udenaes M. 2013. Enhanced brain delivery of the opioid peptide DAMGO in glutathione pegylated liposomes: a microdialysis study. *Mol Pharm*, 10 (5):1533-1541.
- Lolicato M, Bucchi A, Arrigoni C, Zucca S, Nardini M, Schroeder I, Simmons K, Aquila M, DiFrancesco D, Bolognesi M, Schwede F, Kashin D, Fishwick CW, Johnson AP, Thiel G, Moroni A. 2014. Cyclic dinucleotides bind the C-linker of HCN4 to control channel cAMP responsiveness. *Nat Chem Biol*, 10 (6):457-462.
- Lolley RN, Farber DB, Rayborn ME, Hollyfield JG. 1977. Cyclic GMP accumulation causes degeneration of photoreceptor cells: simulation of an inherited disease. *Science*, 196 (4290):664-666.
- Lonardo G, Cerbai E, Casini S, Giunti G, Bonacchi M, Battaglia F, Fiorani B, Stefano PL, Sani G, Mugelli A. 2004. Atrial natriuretic peptide modulates the hyperpolarization-activated current (I_f) in human atrial myocytes. *Cardiovasc Res*, 63 (3):528-536.
- Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M. 1998. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature*, 393 (6685):587-591.
- Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M. 1999. Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *Embo j*, 18 (9):2323-2329.
- Lüllmann-Rauch R, Asan E. 2019. Taschenlehrbuch Histologie. Sechste Aufl. Stuttgart: Thieme-Verlag.
- Mannikko R, Elinder F, Larsson HP. 2002. Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages. *Nature*, 419 (6909):837-841.
- McLaughlin ME, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP. 1993. Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet*, 4 (2):130-134.

- Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. 2001. Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem*, 268 (6):1646-1652.
- Muller F, Scholten A, Ivanova E, Haverkamp S, Kremmer E, Kaupp UB. 2003. HCN channels are expressed differentially in retinal bipolar cells and concentrated at synaptic terminals. *Eur J Neurosci*, 17 (10):2084-2096.
- Neitz A, Mergia E, Eysel UT, Koesling D, Mittmann T. 2011. Presynaptic nitric oxide/cGMP facilitates glutamate release via hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in the hippocampus. *Eur J Neurosci*, 33 (9):1611-1621.
- Notomi T, Shigemoto R. 2004. Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *J Comp Neurol*, 471 (3):241-276.
- Palczewski K, Polans AS, Baehr W, Ames JB. 2000. Ca(2+)-binding proteins in the retina: structure, function, and the etiology of human visual diseases. *Bioessays*, 22 (4):337-350.
- Paquet-Durand F 2020. 27. Oktober. Mireca Medicines GmbH entwickelt Therapie gegen erbliche Augenkrankheit und erhält den Innovationspreis der BioRegionen in Deutschland. <https://www.bioregio-stern.de/de/presse/start-up-in-der-garage-einstandort-mit-erfolgsaussicht>.
- Paquet-Durand F, Hauck SM, van Veen T, Ueffing M, Ekstrom P. 2009. PKG activity causes photoreceptor cell death in two retinitis pigmentosa models. *J Neurochem*, 108 (3):796-810.
- Platania CBM, Dei Cas M, Cianciolo S, Fidilio A, Lazzara F, Paroni R, Pignatello R, Strettoi E, Ghidoni R, Drago F, Bucolo C. 2019. Novel ophthalmic formulation of myriocin: implications in retinitis pigmentosa. *Drug Deliv*, 26 (1):237-243.
- Postea O, Biel M. 2011. Exploring HCN channels as novel drug targets. *Nat Rev Drug Discov*, 10 (12):903-914.
- Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. 2006. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev*, 27 (1):47-72.
- Power M, Das S, Schutze K, Marigo V, Ekstrom P, Paquet-Durand F. 2019. Cellular mechanisms of hereditary photoreceptor degeneration - Focus on cGMP. *Prog Retin Eye Res*:100772.
- Prole DL, Yellen G. 2006. Reversal of HCN channel voltage dependence via bridging of the S4-S5 linker and Post-S6. *J Gen Physiol*, 128 (3):273-282.
- Rip J, Chen L, Hartman R, van den Heuvel A, Reijerkerk A, van Kregten J, van der Boom B, Appeldoorn C, de Boer M, Maussang D, de Lange EC, Gaillard PJ. 2014. Glutathione PEGylated liposomes: pharmacokinetics and delivery of cargo across the blood-brain barrier in rats. *J Drug Target*, 22 (5):460-467.
- Rohen JW, Lütjen-Drecoll E. 2000. Funktionelle Histologie: kurzgefaßtes Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen nach funktionellen Gesichtspunkten. Vierte Aufl. Stuttgart: Schattauer-Verlag.
- Sandoval A, Duran P, Gandini MA, Andrade A, Almanza A, Kaja S, Felix R. 2017. Regulation of L-type CaV1.3 channel activity and insulin secretion by the cGMP-PKG signaling pathway. *Cell Calcium*, 66:1-9.
- Santoro B, Tibbs GR. 1999. The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann N Y Acad Sci*, 868:741-764.
- Sartiani L, Mannaioni G, Masi A, Novella Romanelli M, Cerbai E. 2017. The Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels: from Biophysics to Pharmacology of a Unique Family of Ion Channels. *Pharmacol Rev*, 69 (4):354-395.
- Sato M, Nakazawa M, Usui T, Tanimoto N, Abe H, Ohguro H. 2005. Mutations in the gene coding for guanylate cyclase-activating protein 2 (GUCA1B gene) in patients with

- autosomal dominant retinal dystrophies. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 243 (3):235-242.
- Schlossmann J, Feil R, Hofmann F. 2005. Insights into cGMP signalling derived from cGMP kinase knockout mice. *Front Biosci*, 10:1279-1289.
- Schon C, Asteriti S, Koch S, Sothilingam V, Garcia Garrido M, Tanimoto N, Herms J, Seeliger MW, Cangiano L, Biel M, Michalakis S. 2016. Loss of HCN1 enhances disease progression in mouse models of CNG channel-linked retinitis pigmentosa and achromatopsia. *Hum Mol Genet*, 25 (6):1165-1175.
- Seifert R, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P, Kaupp UB. 1999. Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (16):9391-9396.
- Seiler MJ, Aramant RB. 2012. Cell replacement and visual restoration by retinal sheet transplants. *Prog Retin Eye Res*, 31 (6):661-687.
- Shintani K, Shechtman DL, Gurwood AS. 2009. Review and update: current treatment trends for patients with retinitis pigmentosa. *Optometry*, 80 (7):384-401.
- Stephen R, Palczewski K, Sousa MC. 2006. The crystal structure of GCAP3 suggests molecular mechanism of GCAP-linked cone dystrophies. *J Mol Biol*, 359 (2):266-275.
- Stieber J, Stockl G, Herrmann S, Hassfurth B, Hofmann F. 2005. Functional expression of the human HCN3 channel. *J Biol Chem*, 280 (41):34635-34643.
- Stingl K, Bartz-Schmidt KU, Besch D, Braun A, Bruckmann A, Gekeler F, Greppmaier U, Hipp S, Hortdorfer G, Kernstock C, Koitschev A, Kusnyerik A, Sachs H, Schatz A, Stingl KT, Peters T, Wilhelm B, Zrenner E. 2013. Artificial vision with wirelessly powered subretinal electronic implant alpha-IMS. *Proc Biol Sci*, 280 (1757):20130077.
- Stingl K, Bartz-Schmidt KU, Besch D, Chee CK, Cottrill CL, Gekeler F, Groppe M, Jackson TL, MacLaren RE, Koitschev A, Kusnyerik A, Neffendorf J, Nemeth J, Naeem MA, Peters T, Ramsden JD, Sachs H, Simpson A, Singh MS, Wilhelm B, Wong D, Zrenner E. 2015. Subretinal Visual Implant Alpha IMS--Clinical trial interim report. *Vision Res*, 111 (Pt B):149-160.
- Strauss O. 2005. The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. 85 (3):845-881.
- Strettoi E, Gargini C, Novelli E, Sala G, Piano I, Gasco P, Ghidoni R. 2010. Inhibition of ceramide biosynthesis preserves photoreceptor structure and function in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (43):18706-18711.
- Tolone A, Belhadj S, Rentsch A, Schwede F, Paquet-Durand F. 2019. The cGMP Pathway and Inherited Photoreceptor Degeneration: Targets, Compounds, and Biomarkers. *Genes (Basel)*, 10 (6).
- Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC. 2016. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res*, 51:1-40.
- Vighi E, Trifunovic D, Veiga-Crespo P, Rentsch A, Hoffmann D, Sahaboglu A, Strasser T, Kulkarni M, Bertolotti E, van den Heuvel A, Peters T, Reijerkerk A, Euler T, Ueffing M, Schwede F, Genieser HG, Gaillard P, Marigo V, Ekstrom P, Paquet-Durand F. 2018. Combination of cGMP analogue and drug delivery system provides functional protection in hereditary retinal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115 (13):E2997-e3006.
- Viscomi C, Altomare C, Bucchi A, Camatini E, Baruscotti M, Moroni A, DiFrancesco D. 2001. C terminus-mediated control of voltage and cAMP gating of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem*, 276 (32):29930-29934.
- Wahl-Schott C, Fenske S, Biel M. 2014. HCN channels: new roles in sinoatrial node function. *Curr Opin Pharmacol*, 15:83-90.

- Wang Q, Mergia E, Koesling D, Mittmann T. 2017a. Nitric oxide/cGMP signaling via guanylyl cyclase isoform 1 modulates glutamate and GABA release in somatosensory cortex of mice. *Neuroscience*, 360:180-189.
- Wang T, Tsang SH, Chen J. 2017b. Two pathways of rod photoreceptor cell death induced by elevated cGMP. *Hum Mol Genet*, 26 (12):2299-2306.
- Wei JY, Cohen ED, Genieser HG, Barnstable CJ. 1998. Substituted cGMP analogs can act as selective agonists of the rod photoreceptor cGMP-gated cation channel. *J Mol Neurosci*, 10 (1):53-64.
- Wei JY, Cohen ED, Yan YY, Genieser HG, Barnstable CJ. 1996. Identification of competitive antagonists of the rod photoreceptor cGMP-gated cation channel: beta-phenyl-1,N2-etheno-substituted cGMP analogues as probes of the cGMP-binding site. *Biochemistry*, 35 (51):16815-16823.
- Wucherpennig S. 2020. Charakterisierung cGMP-Analoga-induzierter Aktivierung von CNG-Kationenkanälen im Rahmen einer potenziellen Therapie für Retinitis pigmentosa-Patienten [Dissertation]. Jena: Friedrich Schiller-Universität.
- Xiao J, Nguyen TV, Ngui K, Strijbos PJ, Selmer IS, Neylon CB, Furness JB. 2004. Molecular and functional analysis of hyperpolarisation-activated nucleotide-gated (HCN) channels in the enteric nervous system. *Neuroscience*, 129 (3):603-614.
- Xu J, Morris L, Thapa A, Ma H, Michalakis S, Biel M, Baehr W, Peshenko IV, Dizhoor AM, Ding XQ. 2013. cGMP accumulation causes photoreceptor degeneration in CNG channel deficiency: evidence of cGMP cytotoxicity independently of enhanced CNG channel function. *J Neurosci*, 33 (37):14939-14948.
- Yu FH, Yarov-Yarovoy V, Gutman GA, Catterall WA. 2005. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev*, 57 (4):387-395.
- Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, Young EC, Olson R, Gouaux E. 2003. Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature*, 425 (6954):200-205.
- Zimmerman AL, Yamanaka G, Eckstein F, Baylor DA, Stryer L. 1985. Interaction of hydrolysis-resistant analogs of cyclic GMP with the phosphodiesterase and light-sensitive channel of retinal rod outer segments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82 (24):8813-8817.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematische Grafik der zellulären Komponenten (a) und histologischer Querschnitt (b) der Retina.	3
Abbildung 2. Schematische Darstellung der Phototransduktion.	7
Abbildung 3. Der cGMP-Signalweg.	8
Abbildung 4. Die Rolle von cGMP bei der Phototransduktion.	10
Abbildung 5. Die Akkumulation von cGMP führt zum Photorezeptorzelluntergang.	12
Abbildung 6. Schematische Struktur der cGMP-Analoga.	16
Abbildung 7. Schematische Darstellung des HCN-Kanals.	21
Abbildung 8. Struktur eines CNBD-C-Linker-Konstrukts mit gebundenem cAMP.	22
Abbildung 9. Schematische Darstellung einer HCN-Untereinheit.	23
Abbildung 10. Modulation des HCN-Kanals durch cAMP.	24
Abbildung 11. HCN1 kann nicht durch cGMP moduliert werden.	38
Abbildung 12. Exemplarische Stromantworten für cAMP und cGMP.	39
Abbildung 13. Aktivierung des HCN2-Kanals durch cAMP und cGMP.	40
Abbildung 14. Strom-Spannungs-Beziehung für cAMP und cGMP.	41
Abbildung 15. Konzentrationsabhängigkeit von $V_{1/2}$ für cGMP.	42
Abbildung 16. Rp-8-pCPT-cGMPS hat einen agonistischen Effekt auf den HCN2-Kanal.	44
Abbildung 17. Strom-Spannungs-Beziehung von Rp-8-pCPT-cGMPS.	45
Abbildung 18. PET-cGMP und Rp-8-Br-PET-cGMPS haben einen agonistischen Effekt auf den HCN2-Kanal.	47
Abbildung 19. Aktivierung des HCN2-Kanals durch cGMP und Rp-8-Br-PET-cGMPS.	48
Abbildung 20. Strom-Spannungs-Beziehung für PET-cGMP und Rp-8-Br-PET-cGMPS.	49
Abbildung 21. Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS und Rp-(2-N)ET-cGMPS haben einen partiell agonistischen Effekt auf HCN2.	51
Abbildung 22. Strom-Spannungs-Beziehung von Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS und Rp-(2-N)ET-cGMPS auf HCN2.	52
Abbildung 23. Die Ligandenmischungen und cGMP allein unterscheiden sich nicht in der maximalen HCN2-Kanalaktivierung.	54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Calciumfreie OR-2-Lösung	30
Tabelle 2. Barth-Medium.	30
Tabelle 3. Bad-Lösung.	32
Tabelle 4. Verwendete Ligandenkonzentrationen (BIOLOG LSI GmbH, Bremen).	33
Tabelle 5. Pipetten-Lösung.....	33
Tabelle 6. Vergleich der Ergebnisse zwischen cAMP und cGMP.....	42
Tabelle 7. Vergleich der Ergebnisse zwischen Rp-8-pCPT-cGMPS, cAMP und cGMP.	45
Tabelle 8. Vergleich der Ergebnisse zwischen Rp-8-Br-PET-cGMPS, PET-cGMP, cAMP und cGMP.	50
Tabelle 9. Vergleich der Ergebnisse zwischen Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS, Rp-(2-N)ET-cGMPS, cAMP und cGMP.	53
Tabelle 10. Vergleich der Ergebnisse zwischen Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS + cGMP, Rp-(2-N)ET-cGMPS + cGMP und cGMP.....	54
Tabelle 11. Vergleich der Spannungswerte zur halbmaximalen Aktivierung des HCN1-Kanals.	56
Tabelle 12. Effektivität und Potenz von cGMP und Rp-8-Br-PET-cGMPS im Vergleich zu cAMP.	62
Tabelle 13. Übersicht der gesamten Ergebnisse.....	71

Schemataverzeichnis

Schema 1. Rp-8-pCPT-cGMPS.....	43
Schema 2. PET-cGMP.	46
Schema 3. Rp-8-Br-PET-cGMPS.....	46
Schema 4. Rp-8-Br-pMe-PET-cGMPS.....	50
Schema 5. Rp-(2-N)ET-cGMPS.....	50

Lebenslauf

Name	Karwehl
Vorname	Laura Helga
Geburtsdatum	26.08.1996
Geburtsort	Rudolstadt
2007-2015	Gymnasium Fridericianum Rudolstadt Abschluss: Abitur
seit 2015	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
2017	1. Staatsexamen Medizin
seit 2018	Doktorandin am Institut für Herz-Kreislauf-Physiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena Anfertigung der Dissertation mit dem Thema: „Der Einfluss von cGMP-Analoga auf das Schaltverhalten von HCN-Kanälen im Rahmen einer potenziellen <i>Retinitis pigmentosa</i> -Therapie“
2020	2. Staatsexamen Medizin

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: 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.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

Danksagung

In diesem Kapitel möchte ich meinen besonderen Dank an all diejenigen richten, die mich auf dem Weg der Entwicklung und Verfassung dieser Arbeit unterstützten:

Prof. Dr. Klaus Benndorf für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses spannenden Themas in seiner Arbeitsgruppe,

Dr. Jana Kusch für die unaufhörliche Hilfsbereitschaft - von der Laboreinweisung bis hin zum letzten Feinschliff der Textformulierungen, für ihre fachliche Expertise und die stets geöffnete Tür, wodurch ich eine so noch nie erlebte intensive Betreuung erhielt,

alle Mitarbeiter des Instituts für Herz-Kreislauf-Physiologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung bei alltäglichen Problemen und Fragestellungen,

Prof. Thomas Zimmer, Karin Schoknecht und Claudia Ranke für die Durchführung der molekularbiologischen Arbeiten,

Andrea Kolchmeier, Sandra Bernhardt und Uta Enke für die Vorbereitung der Zellen und Lösungen,

meine Familie, besonders jedoch meine Eltern, für die verständnisvolle Rücksichtnahme in vielerlei Situationen, ihre Geduld und die moralische Unterstützung sowie die Vermittlung von Ruhe und Sicherheit, um für mich die bestmöglichen Voraussetzungen zur Erstellung dieser Arbeit zu schaffen

und Toni, der meine Zuflucht sowohl bei Höhen als auch bei den ein oder anderen Tiefen war und der es schaffte, mich in jeglicher emotionalen Lage zu ermutigen und mir neue Kraft zu geben.