

Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann)

Gewebsexpression und zelluläre Lokalisation von Schrittmacherkanälen

Sven Moosmang

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann
2. Univ.-Prof. Dr. P. F. Ruth
3. Univ.-Prof. Dr. F.-J. M. Neumann

Die Dissertation wurde am 04.09.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 16.05.2001 angenommen.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	8
1.1 Funktion von I_h- Rhythmische Erregungsbildung.....	8
1.2 Die HCN-Kanäle	11
1.2.1 Klonierung der HCN-Kanäle	11
1.2.2 Struktur der HCN-Kanäle	12
1.2.3 Funktionelle Eigenschaften der HCN-Kanäle	12
1.3 Zielsetzung der Promotionsarbeit	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Kultur von Bakterien	16
2.1.1 Verwendeter Stamm	16
2.1.2 Nährmedium und Antibiotikum	16
2.1.3 Kultivierung	16
2.2 Verwendete Plasmide	17
2.3 Reinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren	18
2.3.1 Präzipitation	18
2.3.2 Phenol-Chloroform-Extraktion	18
2.3.3 Konzentrationsbestimmung	18
2.4 Isolierung von Plasmid-DNA	19
2.4.1 Schnellisolierung	19
2.4.2 Plasmidisolierung mittels Säulenchromatographie	19
2.5 Enzymatische Modifikation von DNA	20
2.5.1 Restriktionsenzyme	20
2.5.2 Alkalische Phosphatase	21
2.5.3 T4-DNA-Ligase	21
2.6 Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten	22
2.6.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	23
2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese	23
2.6.3 Elektroelution	23
2.7 Sequenzierung von Plasmid-DNA	24
2.7.1 Sequenzierreaktion	24

2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
2.8.1 Standardprotokoll	26
2.9 Transformation von Bakterien	27
2.9.1 Kompetente Bakterienzellen	27
2.9.2 Transformation von E.coli	27
2.10 Herstellung ³²P markierter Sonden	28
2.11 Isolierung und Analyse von RNA	28
2.11.1 Isolierung von totaler RNA	28
2.11.2 Isolierung von Poly (A)-RNA	29
2.11.3 Gelelektrophorese von RNA	30
2.11.4 Northern-Analyse	30
2.11.5 Dot-Blot-Analyse	32
2.12 In-situ Hybridisierung	32
2.12.1 Verwendete Lösungen	33
2.12.2 In-vitro Transkription	34
2.12.3 Protokoll für die In-situ Hybridisierung	34
2.12.4 Filmemulsion	36
2.12.5 Histologische Färbungen	37
2.12.6 Mikroskopie und Photographie	37
2.13 Organpräparation für die In-situ Hybridisierung	38
2.14 Kultur eukaryontischer Zellen	39
2.14.1 Verwendete Zelllinie	39
2.14.2 Nährmedium	39
2.14.3 Kultur	40
2.14.4 Transfektion von eukaryontischen Zellen	41
2.15 Isolierung und Charakterisierung von Proteinen	43
2.15.1 Aufreinigung spezifischer Peptidantikörper	43
2.15.2 Membranpräparation	43
2.15.3 BCA-Methode	45
2.15.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	46
2.15.5 Western-Blot	47
3 Ergebnisse	50
3.1 Gewebsexpression von humanem HCN4	50
3.2 Klonierung der carboxyterminalen Region von mHCN4	51

3.2.1 Northern-Analyse	52
3.3 Sonden zur In-situ Hybridisierung	53
3.4 Ergebnisse der In-sit Hybridisierungsexperimente	55
3.4.1 Gehirn	55
3.4.2 Herz	61
3.4.3 Retina	63
3.4.4 Spinalganglion	64
3.5 Immunologische Detektion von HCN Kanalproteinen	65
3.5.1 Konstruktion einer Chimäre aus mHCN4 und hHCN4	65
3.5.2 Expression und Detektion von HCN2 und HCN4	66
4 Diskussion	68
4.1 HCN Kanäle im zentralen und peripheren Nervensystem	68
4.2 HCN Kanäle im Herzen	70
4.3 Ausblick	72
5 Zusammenfassung	73
6 Literaturverzeichnis	75
6.1 Zitierte Veröffentlichungen	75
6.2 Eigene Veröffentlichungen	82
7 Anhang	83
7.1 Verwendete Oligonukleotide	83
7.2 Sequenz des Carboxyterminus von mHCN4	83

Verwendete Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat	HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	I _f	Funny-current
bp	Basenpaar	I _h	Hyperpolarization-activated current
BSA	Rinderserumalbumin	K _a	Aktivierungskonstante
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat	LB	Luria-Bertani
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	μ	Mikro (10 ⁻⁶)
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat	M	Mega (10 ⁶) bzw. molar
Ci	Curie (1 Ci = 3,7 × 10 ¹⁰ Bq)	m	Milli (10 ⁻³) bzw. Meter
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	MEM	minimal essential medium
CNBD	Zyklonukleotid-Bindungstasche	min	Minute(n)
CNG	(cyclic nucleotide-gated) durch zyklische Nukleotide aktiviert	nt	Nukleotid
cpm	counts per minute	OD	Optische Dichte
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure	OT	Objektträger
d	Tag	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Da	Dalton	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
ddNTP	2',3'-Dideoxynukleosid-5'-triphosphat	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
DMSO	Dimethylsulfoxid	PEG	Polyethylenglykol
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNA	Ribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat	rpm	Umdrehungen pro Minute
dpm	desintegrations per minute	RT	Raumtemperatur
DTT	Dithiothreitol	SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	sec	Sekunde(n)
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure	ssDNA	(salmon sperm DNA) = Lachssperm-DNS
FCS	Fötale Kälberserum	TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
h	Stunde	TE	Tris-EDTA-Puffer
HCN	Hyperpolarization activated cyclic nucleotide modulated	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
HEK 293	menschliche embryonale Nierenzellen	Tris	α,α,α,-Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
		tRNA	Transfer-RNS
		U	Unit, Einheit
		UV	Ultraviolett

Ich würde lieber eine einzige Tatsache entdecken, auch wenn sie nicht besonders bedeutend wäre, als ewig über die großen Fragen zu debattieren und überhaupt nichts zu entdecken.

Galileo Galilei

1 Einleitung

Rhythmen gehören zum Leben – sich periodisch wiederholende Vorgänge, wie etwa die spontane Herzaktion, das rhythmische Feuern neuronaler Netzwerke, der Schlaf-Wach-Zyklus oder die Freisetzung von Hormonen spielen in der Biologie und Medizin eine sehr wichtige Rolle. Die molekularen Mechanismen aber, die diesen Rhythmen zugrunde liegen, sind noch weitgehend unverstanden.

Die spontane Erregungsbildung, zum Beispiel in den Schrittmacherzellen des Sinusknotens, hängt von dem komplexen Zusammenspiel und den biophysikalischen Eigenschaften einer Reihe von Ionenkanälen ab. Seit etwa 20 Jahren kennt man einen solchen Kanal, der eine besonders wichtige Rolle bei der Entstehung spontaner Rhythmen in Herz und zentralem Nervensystem spielt (DiFrancesco, 1993; Pape, 1996) und der I_f für „funny current“ oder I_h für „hyperpolarization activated current“ genannt wurde.

1.1 Funktion von I_h – Rhythmische Erregungsbildung

Die spontane Aktivität im primären Schrittmacherzentrum des Herzens, dem Sinusknoten (Abbildung 1.1A), kommt durch eine für dort lokalisierte Schrittmacherzellen typische Phase zwischen ihren einzelnen Aktionspotentialen zustande – durch die spontane diastolische Depolarisation. Während dieser Phase steigt das Membranpotential über mehrere hundert Millisekunden um 20 bis 30 mV an, bis die Schwelle zur Auslösung eines neuen Aktionspotentials erreicht ist (Abbildung 1.1B).

Die langsame diastolische Depolarisation beginnt, sobald die Membran durch „delayed rectifier“ Kaliumkanäle auf etwa -75 mV repolarisiert wurde. Bei diesem Membranpotential wird I_h aktiv und depolarisiert die Zelle langsam bis zu einem Potentialbereich (ca. -50 mV), in dem zunehmend T-Typ Kalzium-Kanäle oder durch ein ähnliches Membranpotential regulierte Ionenkanäle aktivieren. Dadurch vergrößert sich der Einwärtsstrom in die Zelle zunehmend, bis es zum schnellen Aufstrich eines neuen Aktionspotentials kommt.

Durch welche funktionellen Eigenschaften kann der native I_h Strom diese Rolle als molekularer Rhythmusgenerator während der Schrittmacherdepolarisation erfüllen?

Zum ersten wird I_h durch Hyperpolarisation, nicht Depolarisation aktiviert, anders als die meisten anderen spannungsabhängigen Ionenkanäle. Zweitens weist I_h eine gemischte

Einleitung

Leitfähigkeit für Kationen – Natrium und Kalium – auf und kann so bei hyperpolarisierten Membranpotentialen einen depolarisierenden (Natrium-)Einwärtsstrom tragen. Drittens können Transmitter und Hormone über Second-Messenger-Systeme die spannungsabhängige Aktivierung des I_h Stroms modulieren (Abbildung 1.1C).

Beta-adrenerge Stimulation aktiviert über das G_s Protein die Adenylatzyklase. Die so hervorgerufene Erhöhung des intrazellulären cAMP verschiebt die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von I_h um etwa 10 mV zu positiveren Potentialen hin – die Folge ist ein größerer Einwärtsstrom bei gegebenem Membranpotential. Dadurch depolarisiert die Zelle während der Schrittmacherdepolarisation schneller - dieser Mechanismus ist zum größten Teil für den Herzfrequenzanstieg unter Sympathikus-Stimulation verantwortlich (Brown et al, 1979).

Werden andererseits muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren stimuliert, verlangsamt sich die Herzfrequenz zum Teil über G-Protein vermittelte Aktivierung des GIRK Kalium-Kanals ($I_{K_{ACh}}$), zum Teil über Abfall des intrazellulären cAMP und damit einem verminderten I_h Strom (DiFrancesco et al, 1989; Wickman et al, 1998).

Die cAMP-Modulation von I_h wird nicht durch Proteinkinase A vermittelt, cAMP bindet statt dessen direkt an den Kanal (DiFrancesco und Tortora, 1991). Der Kanal, der dem I_h Strom zugrunde liegt, weist also sowohl Eigenschaften von spannungsabhängigen Ionenkanälen (Aktivierung durch Hyperpolarisation) wie auch ligandengesteuerten Ionenkanälen (Modulation durch cAMP) auf.

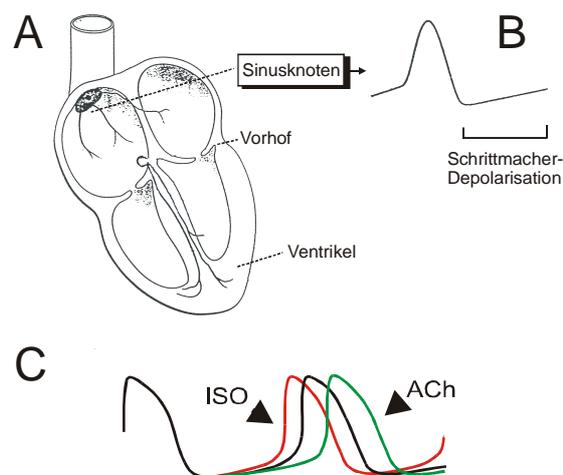


Abbildung 1.1 A) Topographische Anatomie des Sinusknotens B) Aktionspotentiale einer isolierten Sinusknotenzelle – I_h trägt die langsame diastolische Schrittmacherdepolarisation bis zur Auslöseschwelle von T-Typ Kalzium-Kanälen C) Isoprenalin bzw. Acetylcholinwirkung am Sinusknotenaktionspotential – I_h reguliert die Herzfrequenz, indem er die Dauer der diastolischen Depolarisation verkürzt oder verlängert (DiFrancesco, 1993).

I_h findet sich nicht nur im Reizleitungssystem des Herzens, sondern auch in einer Vielzahl von Neuronen (Pape 1996; Lüthi und McCormick, 1998). Welche Rolle spielt I_h bei rhythmischer Aktivität von Neuronen im ZNS? Am besten sind in diesem Zusammenhang die thalamocorticalen neuronalen Netzwerke untersucht.

Vermutlich synchronisieren thalamocorticale, rhythmisch aktive Netzwerke den gesamten Cortex und steuern so unter anderem die Schlaf-Wach-Periodizität und Vigilanz. In Interneuronen in diesen thalamocorticalen Netzen, die spontane rhythmische Aktivität aufweisen und das neuronale Netzwerk regulieren, wurde I_h nachgewiesen – I_h wirkt hier, ähnlich wie im Sinusknoten, als Schrittmacher (Abbildung 1.2).

Isolierte thalamische Neurone weisen verschiedene komplexe Muster der Erregungsbildung auf, zum Beispiel tonisches Feuern, langsame Oszillationen oder kurze Salven von Aktionspotentialen, die von langen Ruhepausen unterbrochen werden. Zwischen diesen einzelnen Mustern wechselt das Neuron, wenn bestimmte Neurotransmitter I_h modulieren (Pape 1996); makroskopisch spiegeln sich diese Vorgänge im EEG während verschiedener Schlafphasen wieder (McCormick und Bal, 1997; Singer und Gray, 1995).

Aufgrund dieser Bedeutung überrascht es nicht, dass I_h -bedingte Störungen der Rhythmuserzeugung bei wichtigen Erkrankungen des ZNS, etwa Absence-Epilepsien, eine Rolle spielen sollen (McCormick und Bal, 1997).

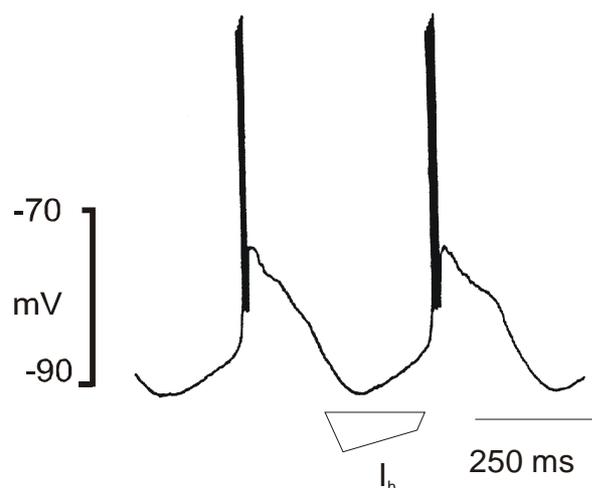


Abbildung 1.2 Aktionspotentiale, abgeleitet von Interneuronen eines thalamocorticalen Netzwerks. I_h ist während der langsamen Depolarisationsphase aktiv und ermöglicht (im Zusammenspiel mit T-Typ Kalzium Kanälen) das rhythmische Feuern (Pape, 1990)

I_h trägt allerdings nicht nur als molekularer Schrittmacher zur Funktion von Nervenzellen bei. So kann I_h zum Beispiel eine Depolarisation als Antwort auf plötzliche, hyperpolarisierende Pulse auslösen; dieser Mechanismus ermöglicht Photorezeptoren der Retina eine schnelle Adaptation auf Lichtblitze (Fain et al, 1978; Wollmuth und Hille, 1992). Auch wurde für I_h gezeigt, dass er im Dendritenbaum die Ausbildung und Weiterleitung von Potentialen, die unter der Auslöseschwelle für Aktionspotentiale liegen, beeinflussen kann und so zur Integration synaptischer Übertragung beiträgt (Magee, 1998). Schließlich spielt I_h auch im peripheren Nervensystem eine Rolle, zum Beispiel bei der Schmerzwahrnehmung und peripheren Neuropathien (Baker et al, 1987; Ingram und Williams, 1994).

1.2 Die HCN-Kanäle

1.2.1 Klonierung der HCN-Kanäle

Obwohl der native I_h Strom elektrophysiologisch bereits ausgiebig charakterisiert worden war, gelang die Klonierung der zugrundeliegenden Schrittmacherkanäle erst vor kurzem. 1998 veröffentlichten drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander die Klonierung verschiedener cDNAs, die für Schrittmacherkanäle kodierten.

Ein Yeast-Two-Hybrid-Screen mit der SH3 Domäne einer neuronalen Isoform von Src und einer Gehirn cDNA-Bibliothek ergab einen Klon (BCNG-1), von dem aufgrund von Sequenzanalysen vermutet wurde, dass er einen zyklonukleotid-modulierten K^+ -Kanal darstellte (Santoro et al, 1997). Im heterologen Expressionssystem zeigte sich, das BCNG-1 ein Mitglied einer Familie von Hyperpolarisations-aktivierten Kationenkanälen bildete (Santoro et al, 1998).

Ein anderer Ansatz war, eine EST (expressed sequence tag) Datenbank auf Sequenzen zu untersuchen, die Ähnlichkeiten mit der CNBD (Zyklonukleotid-Bindungsdomäne) von CNG (cyclic nucleotide-dependent) Kanälen (Biel et al, 1999) oder zyklonukleotid-abhängigen Proteinkinasen (Pfeifer et al, 1999) aufwiesen. Mit diesem Ansatz wurden drei full-length cDNA Klone isoliert, die als Hyperpolarization-activated cation channels (HAC1-3) bezeichnet wurden (Ludwig et al, 1998).

Eine dritte Arbeitsgruppe klonierte einen hyperpolarisationsaktivierten Kationenkanal (SPIH) aus dem Hoden von *Strongylocentrotus purpuratus*, einem Seeigel (Gauss et al, 1998).

Eine vierte full-length cDNA (HCN4) wurde schließlich aus dem Herz verschiedener Spezies isoliert (Ishii et al, 1999; Ludwig et al, 1999; Seifert et al, 1999).

Der Konsensus zur Bezeichnung dieser Schrittmacherkanäle (Clapham, 1998; Biel et al, 1999) ist mittlerweile „*hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated (HCN) cation channel*“

1.2.2. Struktur der HCN-Kanäle

Insgesamt 4 Mitglieder der HCN-Kanalfamilie sind bislang bekannt (HCN1-4). Sie weisen strukturelle Ähnlichkeiten mit den CNG-Kanälen und den Kaliumkanälen der EAG-Familie auf. HCN Kanäle-enthalten sechs (putative) Transmembransegmente (S1-S6) mit einem positiv geladenen S4 Segment, das als Spannungssensor dient, und einer ionenleitenden Pore zwischen dem fünften und sechsten Transmembransegment. Im (intrazellulären) C-Terminus findet sich eine Zyklonukleotidbindungsdomäne (Abbildung 1.3A). Die vier HCN-Kanal Subtypen sind auf Ebene der Aminosäuresequenz sehr ähnlich, die Homologie beträgt insgesamt etwa 60% und in der „Kernregion“, die den Transmembransegmenten und der CNBD entspricht, etwa 80-90% (Abbildung 1.3B). Die Amino- und Carboxytermini dagegen unterscheiden sich zwischen HCN1-4 stark in ihrer Länge und sind wenig homolog.

Wie zum Beispiel Kaliumkanäle oder CNG-Kanäle, formen die HCN-Kanäle wohl auch ein Tetramer aus vier HCN Kanal-Untereinheiten. Alle vier HCN Typen können als Homomere funktionell heterolog exprimiert werden. Da sich die Gewebsexpression der HCN Transkripte in Herz und Gehirn zumindest teilweise überlappt, kann zur Zeit nicht sicher ausgeschlossen werden, dass sich in vivo Heterotetramere aus verschiedenen Subtypen bilden können.

1.2.3. Funktionelle Eigenschaften der HCN-Kanäle

Aktivierung durch Hyperpolarisation

Das S4 Segment in HCN-Kanälen enthält insgesamt 10 positiv geladene Aminosäurereste, im Gegensatz zu 5 bis 8 positiven Resten bei Kaliumkanälen. Dass bei HCN-Kanälen überhaupt ein positiv geladener Spannungssensor vorkommt, ist überraschend, da andere Ionenkanäle mit positiv geladenen S4 Segmenten durch Depolarisation, nicht Hyperpolarisation aktiviert werden.

Ein möglicher Mechanismus für die HCN Kanal-Aktivierung wurde ausgehend von Studien an mutierten Shaker-Kanälen (Miller und Aldrich, 1996) und HERG-Kanälen (Trudeau et al, 1995; Smith et al, 1996) vorgeschlagen (Santoro et al, 1998; Gauss et al, 1998; Biel et al,

Einleitung

1999). Nach diesem Modell sind die drei Zustände eines spannungsabhängigen Ionenkanals – offen, geschlossen und inaktiviert – bei HCN-Kanälen zu negativen Membranpotentialen hin verschoben. Dadurch wären die HCN-Kanäle beim Membranruhepotential inaktiviert, obwohl die S4 Segmente, welche die „activation gates“ bilden, die Konformation für den Offenzustand hätten. Hyperpolarisation würde diese Inaktivierung aufheben. Welche Strukturmerkmale von HCN-Kanälen für dieses Verhalten verantwortlich sind, ist allerdings noch ungeklärt.

Die elektrophysiologischen Charakteristika von HCN-Kanälen wurden nach heterologer Expression in HEK 293-Zellen bestimmt. Die halbmaximalen Aktivierungspotentiale $V_{1/2}$ der Kanäle, gemessen im „whole-cell voltage clamp“ Modus, sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst. Ein Vergleich der Zeitkonstanten τ , berechnet durch Annäherung einer exponentiellen Funktion an die gemessene Aktivierungskurve der HCN Kanäle (Tabelle 1.1) zeigt, dass HCN4 deutlich langsamer als HCN2 und dieser wiederum langsamer als HCN1 aktiviert.

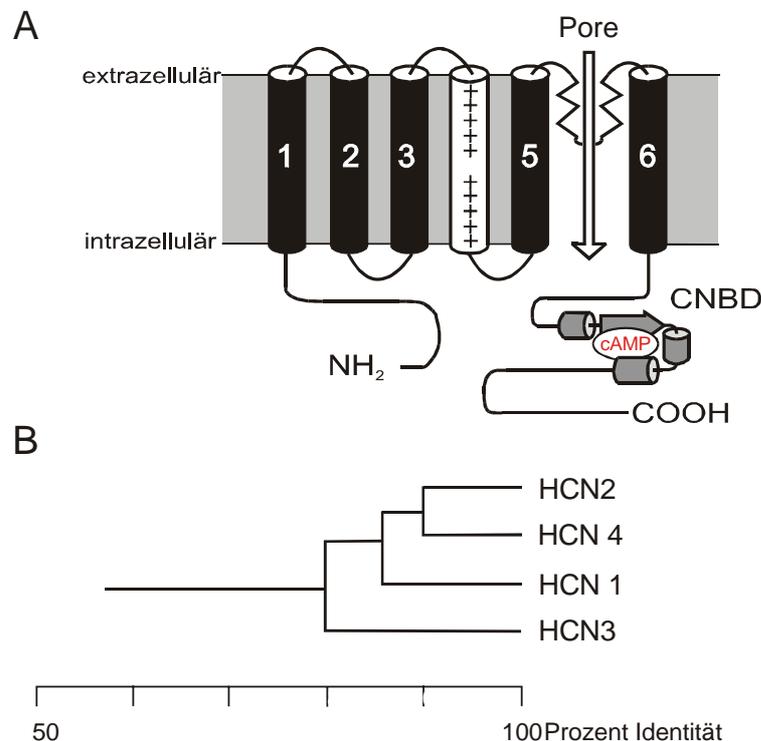


Abbildung 1.3 A) Einfaches Modell der Transmembrantopologie von HCN-Kanälen mit sechs Transmembransegmenten, positiv geladenem S4 Segment, Pore und CNBD (Zyklonucleotidbindungsdomäne). B) Phylogenetischer Stammbaum der HCN-Kanäle, berechnet anhand der Sequenzhomologien im Bereich zwischen S1 bis zum Ende der CNBD.

Modulation durch zyklische Nukleotide

Zyklische Nukleotide, speziell cAMP, wirken zweifach auf Schrittmacherkanäle ein: Zum einen verschieben sie die Aktivierungskurve um etwa 2 bis 15 mV zu positiven Potentialen hin (siehe Tabelle 1.1 für Unterschiede zwischen den Subtypen; HCN1 wird im Gegensatz zu HCN2 und 4 kaum durch cAMP Bindung moduliert), zum anderen beschleunigen sie die Aktivierung der Kanäle.

Sie regulieren die Kanäle direkt, indem sie an eine CNBD im Carboxyterminus der Proteine binden. Die Zyklonukleotidbindungsdomäne der HCN-Kanäle ist homolog zu den CNBDs anderer, zyklonukleotid-aktivierter Proteine wie dem catabolite activator protein (Cap) von *Escherichia coli*, den cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors cAMP-GEFs/Epac (Kawasaki et al, 1998; de Rooij et al, 1998), cAMP und cGMP abhängiger Proteinkinasen (Pfeifer et al, 1999) und CNG Kanälen (Zagotta und Siegelbaum, 1996). Bestimmte Aminosäuren, für die anhand der Struktur von kristallisiertem CAP gezeigt wurde, dass sie dicht am gebundenen cAMP-Molekül liegen (Weber und Steitz, 1987), sind in der CNBD der Schrittmacherkanäle konserviert.

Die cAMP Bindung an nativen I_h (DiFrancesco und Tortora, 1991) wie auch an den heterolog exprimierten HCN2 Kanal, ist nicht kooperativ (Hill-Koeffizient von ungefähr 1; Tabelle 1.1), im Gegensatz zur Bindung von Zyklonukleotiden an CNG Kanäle.

Selektive Leitfähigkeit für Ionen

Der native I_h Strom wird sowohl von Natrium- wie auch Kaliumionen getragen, mit einer etwa 4:1 Selektivität für K^+ gegenüber Na^+ (Wollmuth und Hille, 1992; Ho et al, 1994). Die Ionenselektivität heterolog exprimierter HCN Kanäle stimmt hiermit gut überein (Tabelle 1.1).

Sequenzvergleiche zeigen, dass die ionenleitende Pore von Schrittmacherkanälen eine enge Verwandtschaft zu der von Kaliumkanälen aufweist (Doyle et al, 1998; Choe und Robinson, 1998), obwohl Kaliumkanäle Kalium mehr als hundertfach besser als Natrium leiten. Die Porenregion von Kaliumkanälen liegt zwischen dem fünften und sechsten Transmembransegment und besteht aus der Porenhelix und dem „selectivity filter“ (Doyle et al, 1998). Die für K^+ Kanäle typische Aminosäuresequenz („signature sequence“) Glycin-Tyrosin-Glycin (GYG) ist der Hauptanteil des „selectivity filter“ (Doyle et al, 1998; Heginbotham et al, 1994). Überraschenderweise enthält die Pore von HCN-Kanälen auch das GYG-Motiv, obwohl sie sowohl Kalium als auch Natrium leitet. Anscheinend bestimmen also auch andere Aminosäuren außer dem GYG-Motiv die Selektivität für Kalium.

Einleitung

In K^+ -selektiven Kanälen wird die ringförmige, engste Stelle der Pore von den CO-Gruppen des Sequenzrückgrats der „signature sequence“ so gebildet, dass ein dehydriertes Kaliumatom genau hindurchpasst. Die Tyrosinseitenketten des GYG-Motivs legen in Wechselwirkung mit aromatischen Aminosäuren der Porenhelix den Durchmesser der Pore fest.

Die Pore der HCN-Kanäle unterscheidet sich in einigen Aminosäuren von den Poren von Kaliumkanälen, wodurch das ganze Porengefüge wohl gelockert und daher für Natrium wie auch Kalium permeabel ist.

Ob Natrium durch die HCN-Kanäle geleitet wird, hängt stark von der extrazellulären Kaliumkonzentration ab. Erhöht man das extrazelluläre Kalium, steigen die Stromstärke stark an und die Kanäle leiten Natrium etwas besser (Wollmuth und Hille, 1992; Frace et al, 1992; Brown und Ho, 1996); in kaliumfreier Lösung leiten die Kanäle wenig bis kein Natrium, und dies, obwohl hauptsächlich Natrium den depolarisierenden Einwärtsstrom durch HCN Kanäle trägt. Die Struktureigenschaften der Kanäle, die für dieses Verhalten verantwortlich gemacht werden können, sind ebenfalls noch unbekannt.

	mHCN1	mHCN2	mHCN3	mHCN4
Aminosäuren	910	863	779	1203
Aktivierungskonstante*	$\tau_1=30; \tau_2=171$	241	n.d.	660
$V_{1/2}$	-94 mV	-103 mV	n.d.	-109 mV
P_{NA}/P_K	0,25	0,24	n.d.	0,22
Hill Koeffizient	n.d.	0,8	n.d.	n.d.
Shift durch cAMP, mV	+1,8	+13	n.d.	+15

Tabelle 1.1 Elektrophysiologische Charakteristika der heterolog in HEK293 Zellen exprimierten HCN Kanäle. *, gemessen bei -140 mV, ms (Ludwig et al, 1999). n.d: nicht ermittelt.

1.3 Zielsetzung der Promotionsarbeit

Primäres Ziel dieser Arbeit war es, die Expression der einzelnen Mitglieder der HCN Genfamilie in den Geweben zu untersuchen, in denen eine wichtige Funktion für I_h beschrieben worden ist. Hierzu sollte das Vorkommen der HCN Kanäle in Gehirn, Herz (insbesondere im Sinusknoten), Spinalganglion und Retina mittels molekularbiologischer Methoden (In-situ-Hybridisierung, Blotting-Techniken, PCR) aufgeklärt werden. Der Schwerpunkt der Arbeit sollte dabei in der Untersuchung der zellulären Expression von HCN-Kanälen mittels In-situ-Hybridisierung liegen. Gegen die HCN2 und HCN4 Subtypen sollten außerdem spezifische Antikörper erzeugt werden, um auch auf Proteinebene die Expression untersuchen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Kultur von Bakterien

2.1.1 Verwendeter Stamm

Plasmide wurden im *Escherichia Coli* Stamm XL-1-blue MRF' (Stratagene) amplifiziert. Der Genotyp dieses Stamms lautet Δ (mrcA)183 Δ (mr CBhsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi -1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' pro AB lac^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^R)].

2.1.2 Nährmedium und Antibiotikum

Die Bakterien wurden im Vollmedium Luria-Bertani (LB) mit Glucose gezüchtet. Das Medium wurde vor Verwendung durch zwanzigminütiges Autoklavieren bei 121°C und 2 bar sterilisiert.

Luria – Bertani – Medium (+), pH 7,2 - 7,5:

Trypton (Gibco)	10 g
Hefeextrakt (Gibco)	5 g
NaCl	5 g
Glucose	1 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Um plasmidtragende Bakterien zu selektionieren, wurde dem LB-Medium kurz vor der Anzucht das Antibiotikum Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben. Die Stammlösung mit 50 mg/ml Ampicillin-Na (Sigma) in H₂O wurde sterilfiltriert und in Aliquots bei – 20° C aufbewahrt.

Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar (Gibco-BRL) hinzugefügt. Nach Abkühlen auf 50°C wurde Ampicillin in einer Konzentration von 50 µg/ml zugegeben und das Medium in sterile Petrischalen gegossen.

2.1.3 Kultivierung

Die Bakterien wurden aerob in LB-Medium kultiviert. Flüssigkulturen wurden in Glasröhrchen oder Erlenmayerkolben bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Zur kurzfristigen Aufbewahrung und um Einzelkolonien zu separieren wurden Bakteriensuspensionen auf Ampicillin-LB-Platten ausgestrichen, bei 37°C inkubiert und bis zu acht Wochen bei 4°C

gelagert. Zur längeren Aufbewahrung wurden Aliquots von Flüssigkulturen 1 : 1 mit Glycerol (ICN) gemischt und bei -20°C eingefroren.

2.2 Verwendete Plasmide

pAL 1

Dieser Vektor ist ein Derivat von pUC 19, bei dem an beiden Seiten der multiplen Klonierungsstelle die Sequenz für den T3 und T7 RNA-Polymerase-Promotor und Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Bam HI und Asp 718 eingefügt wurden (Ludwig et al, 1997). Er diente zur Subklonierung und wurde zur In-vitro-Transkription von cRNA-Sonden für die In-situ-Hybridisierung eingesetzt.

pcDNA3 und pcDNA3.1 Myc

Diese Vektoren (Invitrogen) dienen als Expressionsvektoren. Sie können in *E. coli* vermehrt und in eukaryonten Zellen zur heterologen Expression von rekombinanten Proteinen verwendet werden. Die cDNA steht unter der Kontrolle von viralen Promotorsequenzen und wird dadurch stark transkribiert. Die Stabilität der transkribierten RNA wird durch ein Polyadenylierungssignal und Transkriptionsterminationssequenzen verbessert. Das pcDNA3.1 Myc Plasmid wurde verwendet, um die exprimierten Proteine mit einem Myc-Tag zu fusionieren, das zum Nachweis der Proteine durch einen monoklonalen anti-myc Antikörper diente.

p Blueskript II KS +/-

Dieses Plasmid stellt einen Abkömmling des Vektors pBR 322 dar. Es enthält das Ampicillinresistenzgen, den *E. coli* Replikationsursprung und einen Teil des lac Z-Gens (α -Peptid der β -Galactosidase). Es wurde zur Subklonierung verwendet.

P1-Phagemid

Bestimmte Bakteriophagen haben relativ große Genome; sie bieten daher die Möglichkeit, sie zu Vektoren umzubauen, in denen sich große Stücke fremder DNA (130 – 150 kb) unterbringen lassen. Der Bakteriophage P1 ist ein Beispiel. Ein Phagemid aus einer kommerziellen P1-Bibliothek (Genome Systems), das Teile der genomischen DNA von mHCN4 enthielt, wurde zur Klonierung verwendet.

2.3 Reinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.3.1 Präzipitation von Nukleinsäuren

Plasmide und DNA-Fragmente wurden durch Ethanol-Präzipitation konzentriert und von störenden Substanzen getrennt (Sambrook et al, 1989). Dazu wurde die Nukleinsäurelösung mit 1/10 Volumen 5M NaCl und dem 2,5fachen Volumen 100% Ethanol versetzt und 1h bei -20°C inkubiert, die ausgefällte DNA abzentrifugiert (12000 x g, 15 min, 4°C), der Überstand dekantiert und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde nach erneuter Zentrifugation (12000 x g, 5 min, 4°C) in einer Vakuumzentrifuge (Speedvac) getrocknet und in einer geringen Menge sterilen Wassers aufgenommen.

2.3.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Mittels Phenol-Chloroform-Extraktion können Proteine (z.B. Enzyme) aus wässrigen Nukleinsäurelösungen entfernt werden. Die Nukleinsäurelösung wurde mit demselben Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol (25 : 24 : 1, Roth) versetzt, bis zur Emulsionsbildung kräftig geschüttelt und zur Phasentrennung abzentrifugiert (12 000 x g, 5 min). Die wässrige Oberphase, in der die Nukleinsäuren enthalten sind, wurde in ein neues Gefäß überführt und mit Ethanol präzipitiert.

2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren absorbieren elektromagnetische Strahlung im Bereich von 250 – 270 nm, was auf die aromatischen Ringsysteme der DNA-Basen zurückzuführen ist. Somit kann die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration durch Extinktionsmessungen unter Anwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes erfolgen. Bei monochromatischem Licht der Wellenlänge 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine gemessene Extinktion von 1:

- 50 μg / ml doppelsträngiger DNA
- 40 μg / ml einzelsträngiger RNA
- 33 μg / ml einzelsträngigem Oligonukleotid.

Die Reinheit von DNA und RNA kann aus dem Verhältnis $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ abgeschätzt werden. Dieser Quotient sollte über 1,7 liegen.

2.4 Isolierung von Plasmid-DNA

2.4.1 Schnellisolierung von Plasmid-DNA nach Holmes und Quigli (1981)

Zur Schnellisolierung von Plasmid – DNA wurden die Bakterien durch Lysozym, Triton X-100 (nichtionisches Detergens) und Kochen aufgeschlossen. Die chromosomale DNA bleibt dabei an der Zellmembran haften und kann zusammen mit den Zelltrümmern durch Zentrifugation von der Plasmid-DNA abgetrennt werden. Die Plasmid-DNA wird danach mit Isopropanol gefällt und durch Waschen mit 70% Ethanol entsalzt. Die Bakterien aus einer 7 ml LB-Flüssigkultur wurde durch abzentrifugieren geerntet, das Pellet in STET-Puffer (8 % Saccharose, 5 % Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 8,0) resuspendiert und in Anwesenheit von Lysozym (Boehringer) und RNase A 1 min aufgeköcht, mit Isopropanol gefällt, abzentrifugiert (12 000 x g, 15 min, 4° C) und mit 70 % Ethanol gewaschen. Die Ausbeute lag bei etwa 20 µg Plasmid-DNA. Die Qualität und Quantität der gewonnenen Plasmid-DNA reichte aus, um Restriktions- und Sequenzanalysen (2.7) durchführen zu können.

2.4.2 Plasmidisolierung und Reinigung mittels Säulenchromatographie

Zur Gewinnung größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurde der „Qiagen Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen) verwendet. Die Methode beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnbaum und Doly, 1979) in Verbindung mit einer anschließenden chromatographischen Reinigung über eine Anionenaustauschersäule. Bei der alkalischen Lyse werden die Zellen in NaOH/SDS lysiert, wobei Proteine und DNA-Moleküle denaturiert werden. Die Methode basiert darauf, daß durch anschließende Neutralisation mit Kaliumacetat die relativ kleine Plasmid-DNA wieder renaturiert, während das viel größere Bakterienchromosom denaturiert bleibt und mit den übrigen Zelltrümmern abgetrennt werden kann.

Aus einer 7ml Vorkultur ausgehend von einer Einzelkolonie wurde eine 100 ml LB-Kultur (100 µg / ml Ampicillin) 1 : 500 angeimpft und über Nacht bei 37° C und 225 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Kultur durch Zentrifugation geerntet (5 000 x g, 10 min, 4° C) und das Bakterienpellet in 10 ml Puffer P₁ (50 mM Tris) HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, 4°C) resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer P₂ (200 mM NaOH, 1%

SDS; RT) und vorsichtigem Mischen wurde die Präparation 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im folgenden wurde 10 ml Puffer P₃ (3 M KOAc pH 5,5, 4°C) zugegeben, gemischt, für 20 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (20 000 xg, 30 min, 4° C). Währenddessen wurde die Qiagen-Säule mit 10 ml Puffer QBT (50 mM MOPS, pH 7,0, 0,74 M NaCl, 0,15 % Triton X-100, 15 % E+OH; RT) äquilibriert. Der klare Überstand (enthält die Plasmid-DNA) der Zentrifugation wurde auf die äquilibrierte Säule aufgetragen und die Säule mit 60 ml Puffer QC (50 mM MOPS pH 7,0, 1 M NaCl, 15 % EtOH) eluiert, in 10,5 ml Isopropanol gefällt, abzentrifugiert (15 000 x g, 30 min, 4°C), in 10 ml Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert und unter Vakuum getrocknet. Nach Aufnahme der Plasmid-DNA in 500 µl H₂O wurde die Konzentration photometrisch überprüft und mit ca. 500 ng DNA eine Restriktionsanalyse zur Qualitätsüberprüfung durchgeführt. Die hochreine Plasmid-DNA konnte als Ausgangsmaterial für viele Zwecke eingesetzt werden, etwa für PCR (2.8), zur Sequenzierung (2.7), zur Transfektion eukaryontischer Zellen (2.14.3) oder zur Transformation von Bakterien (2.9).

2.5 Enzymatische Modifikation von DNA

2.5.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsendonukleasen, auch kurz Restriktionsenzyme genannt, sind Endo-Desoxyribonukleasen, die spezifische Basensequenzen innerhalb einer DNA-Doppelhelix erkennen und die DNA in beiden Strängen spalten (Sambrook et al, 1989). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Typ II-Restriktionsenzyme spalten ihr DNA-Substrat innerhalb oder unmittelbar neben der (meist palindromischen) Erkennungssequenz, so daß Fragmente mit definierten Enden entstehen. Je nach Enzym erfolgt die Spaltung entweder an gegenüberliegenden Positionen des DNA-Doppelstranges oder versetzt, daher ergeben sich entweder glatte Enden („blunt ends“) oder einander komplementäre, 5'- bzw. 3'-überhängende „sticky ends“. Die freigesetzten DNA-Enden besitzen aber immer eine 5'-Phosphat und eine 3'-OH-Gruppe, was die spätere enzymatische Neuverknüpfung (Ligation) kompatibler Enden ermöglicht. Restriktionsenzyme werden durch einen Buchstabencode nach dem Wirtsorganismus benannt, aus dem sie isoliert wurden. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen, ihre Erkennungssequenzen und zugehörigen Puffer sind in Tabelle 2.1 angegeben.

Material und Methoden

Restriktionsenzym	Firma	Erkennungssequenz	Puffer
Asp 718	Boehringer	5'-G/GTACC-3'	B
Avr II	NEB	5'-C/CTAGG-3'	NEB2
Bam HI	NEB	5'-G/GATCC-3'	B
Dde I	NEB	5'-C/TNAG-3'	NEB3
Eco RI	NEB	5'-G/AATTC-3'	NEB3
Hae II	NEB	5'-PuGCGC/Py-3'	NEB4
Hae III	NEB	5'-GG/CC-3'	NEB2
Hind III	NEB	5'-A/AGCTT-3'	NEB2
Nhe I	NEB	5'-G/CTAGC-3'	NEB2
Pst I	NEB	5'-CTGCA/G-3'	NEB3
Rsa I	NEB	5'-GT/AC-3'	NEB1
Xba I	NEB	5'-T/CTAGA-3'	NEB2
Xho I	NEB	5'-C/TCGAG-3'	NEB2

Tabelle 2.1 Verwendete Restriktionsenzyme. N steht für ein beliebiges Nukleotid, Pu und Py für Purin beziehungsweise Pyrimidin. Die optimale Inkubationstemperatur betrug für alle Enzyme 37°C.

Der Restriktionsansatz wurde bei optimaler Temperatur für 1,5 h (analytischer Ansatz) bzw. 3 – 8 h (präparativer Ansatz) inkubiert und danach durch Gelelektrophorese untersucht. Eine Einheit (1 U) Restriktionsendonukleaseaktivität entspricht der Menge an Enzym, die nötig ist, um 1 µg DNA unter optimalen Bedingungen innerhalb einer Stunde vollständig zu schneiden.

2.5.2 Dephosphorylierung von DNA-Molekülen mittels alkalischer Phosphatase

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP = calf intestine phosphatase) spaltet endständige 5'-Phosphatgruppen von DNA-Molekülen ab. Diese Dephosphorylierung verhindert den durch DNA-Ligase katalysierten Ringschluß linearer, doppelsträngiger DNA-Moleküle, da dieses Enzym einen endständigen 5'-Phosphatrest benötigt. Auf diese Weise wird die Religierung eines Leervektors verhindert und damit die Klonierungseffizienz der gewünschten DNA-Fragmente erhöht. Die linearisierten Plasmide (etwa 5 pmol) wurden in 50 mM Tris pH 8,0 mit 1U CIP (Boehringer) für 1 h bei 37° C inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms (10 min, 75° C) konnte die Vektor-DNA in einen Ligationsansatz (2.5.3) eingesetzt werden.

2.5.3 Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4 DNA-Ligase

Die T4 DNA-Ligase (NEB) katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 3'-Hydroxyl- und einem 5'-Phosphatende doppelsträngiger DNA-Fragmente unter ATP-

Verbrauch (Weiss et al, 1968). Sie wurde eingesetzt, um Fremd- und Vektor-DNA kovalent zu rekombinanter Plasmid-DNA zu verknüpfen. Ligase, linearisierter, dephosphorylierter Vektor und Fremd-DNA wurden in Ligasepuffer gemischt und für etwa 16 h bei 16°C inkubiert. Anschließend konnte das rekombinante Plasmid durch Transformation in E. Coli eingeschleust werden (2.7).

2.6 Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten

Nukleinsäuren werden bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld nach Masse und Konformation (linear, offenzirkulär oder superhelikal) aufgetrennt. Aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats sind Nukleinsäuren negativ geladen. Sie wandern daher bei der Elektrophorese zur Anode, und zwar um so langsamer, je größer sie sind. Durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid können die getrennten Nukleotidfragmente im UV-Licht (302 nm) als diskrete Banden sichtbar gemacht werden. Zum Größenvergleich diente ein DNA-Standard (1kb-Ladder, Gibco). Um den Verlauf der Elektrophorese zu kontrollieren, wurden dem Auftragspuffer farbige Marker zugegeben, nämlich Bromphenolblau, das mit DNA-Fragmenten von 10 – 100 bp Länge wandert und die Elektrophoresefront markiert, und Xylencyanol, das mit DNA-Fragmenten von circa 5 kb Länge wandert.

Verwendete Lösungen:

10 X TBE:

Tris (USB)	0,9 M
Borsäure (Merck)	0,9 M
EDTA pH 8,0 (ICN)	20 mM

Elektrophoresepuffer:

1 x TBE (1 Teil 10 x TBE + 9 Teile H₂O)

6 x Auftragspuffer:

Ficoll Typ 400 (Sigma)	18 %
EDTA pH 8,0	0,12 mM
TBE	6 x
Bromphenolblau	0,15 %
Xylencyanol FF (Sigma)	0,15 %

Ethidiumbromidstammlösung:

10 mg / ml (Sigma), wässrig

2.6.1 Polyacrylamid – Gelelektrophorese

DNA – Fragmente mit einer Länge von 50 – 1000 bp wurden durch vertikale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Hierfür wurden 5%ige Polyacrylamidgele in 1 x TBE als Laufpuffer (Sambrook et al, 1989) verwendet. Die Trennstrecke betrug 15 cm.

Zusammensetzung des analytischen (0,75 mm Dicke) Polyacrylamidgels:

- 3,8 ml Rotiphoresegel (Verhältnis Acrylamid / NN'-Bisacrylamid = 29 : 1, 40%, Roth)
- 3 ml 10 x TBE
- 0,1% N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin (TEMED, Sigma)
- 80 µl 20% Ammoniumpersulfat (Sigma)
- ad 30 ml H₂O

Für präparative Gele (1,5 mm Dicke) wurden die doppelten Mengen eingesetzt. Den DNA-Proben wurde vor Auftragen 1/6 Volumen 6 x Probenpuffer hinzugefügt. Die Elektrophorese erfolgte für 1 h bei konstanter Spannung von 270 V. Als Längenstandard wurden 700 ng der 1kb Ladder (Gibco) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 5 min in Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) gefärbt und durch elektronische Bilderfassung (Cybertec) dokumentiert.

2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten im Längenbereich 15 kb bis 1 kb wurde die horizontale Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Für analytische wie auch präparative Zwecke kamen 0,7 % Gele zum Einsatz (8 x 8 cm). Die Agarose wurde in 1 x TBE im Mikrowellenherd geschmolzen; der Lösung wurde nach Abkühlen (vor dem Ausgießen in eine horizontale Kammer) Ethidiumbromid zugegeben (finale Konzentration im Gel: 800 ng/ml). Die Elektrophorese wurde mit 1 x TBE als Laufpuffer über 1 h bei 100 V durchgeführt.

2.6.3 Elektroelution

Um ein DNA-Fragment nach der elektrophoretischen Auftrennung aus dem Gel zurückzugewinnen, wurde eine Elektroelutionsmethode (modifiziert nach Davis et al, 1986) verwendet. Unter UV-Licht wurde die interessierende Bande aus dem Gel geschnitten, das Gelstück mit 1 x TBE in einen Dialyseschlauch (Sigma) überführt und in einer Elektrophoresewanne bei 4°C mit 100 mA aus dem Gel eluiert. Nach 90 min wurde die DNA mittels Ethanolfällung (2.3.1) isoliert.

2.7 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzanalyse von rekombinanter Plasmid-DNA erfolgte nach der von Sanger et al. (1977) entwickelten Didesoxymethode. Dabei synthetisiert eine DNA-Polymerase *in vitro* an einer einzelsträngigen DNA-Matrize den komplementären Strang. In Anwesenheit von 2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs) kommt es zu Kettenabbrüchen, da eine OH-Gruppe in 3'-Position der Nukleotide für eine Verlängerung der DNA notwendig ist. Bei sorgfältiger Wahl des Verhältnisses zwischen dNTPs und ddNTPs entsteht eine Mischung aus DNA-Fragmenten jeder möglichen Länge. Die unterschiedlich langen DNA-Fragmente werden durch den Einbau der mit Fluoreszenzfarbstoffen versehenen Didesoxynukleotide markiert. So können Guanin, Cytosin, Adenin und Thymin in einem Ansatz sequenziert werden, da jede der vier Basen einen anderen Fluoreszenzfarbstoff trägt.

2.7.1 Sequenzierreaktion

Für die Sequenzierreaktionen zur Synthese der unterschiedliche langen, fluoreszierenden DNA-Fragmente wurde folgender Ansatz verwendet:

Sequenzierreaktion:

Ready Reaction Mix (Perkin Elmer)	8µl
Primer (0,8 pmol/µl)	4µl
DNA (50-500ng)	1µl
H ₂ O	ad 20µl

Die vier verschiedenen ddNTPs, die jeweils bei einer anderen Wellenlänge fluoreszieren (ddGTP: 540nm, ddATP: 570nm, ddTTP: 600nm, ddCTP: 630nm), die dNTPs und die Taq-Polymerase waren in dem Ready-Reaction Mix enthalten. Der Ansatz der Sequenzreaktion wurde kurz gemixt, mit 40 µl Öl überschichtet und in einem Thermozykler (Omni Gene HB-TR 3, Hybaid) amplifiziert. Zunächst wurde die DNA für 2 min. bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden 25 Zyklen des folgenden Protokolls durchgeführt:

95°C für 30 sec. (Denaturierung)

50°C für 40 sec. (Annealing)

60°C für 4 min. (Elongation)

Da nur ein Primer zugegeben wird, findet bei dieser Sequenzierreaktion nur eine lineare Vermehrung der DNA-Matrize und nicht wie bei der PCR eine exponentielle Amplifikation statt.

Das Produkt der Reaktion mußte mittels einer Gelfiltrationssäule (CentiSep Colum, Perkin Elmer) von freien fluoreszierenden Nukleotiden gereinigt werden. Es wurde auf die Säule pipettiert und für 2 min. bei 2500 rpm zentrifugiert. Die gereinigte DNA wurde aufgefangen und anschließend für 15 min. in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl Template Suppression Reagent (Perkin Elmer) resuspendiert, für 3 min. bei 95°C denaturiert und in einen ABI PrismTM-Sequencer (Perkin Elmer) gestellt. Die Lösung wurde von dem Gerät in eine mit Polymer gefüllte Kapillare aufgezogen. Durch die angelegte Spannung von 12,2 kV wandern die DNA-Fragmente in 5'→3'-Richtung durch einen Laserdetektor. Aus der Abfolge der von dem Laserdetektor bestimmten Farbsignale errechnete der Sequencer die Nukleotidabfolge.

2.8 Polymerase – Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) (Saiki et al, 1988) ist ein *In vitro*-Verfahren zur selektiven Amplifikation von definierten Nukleinsäuresequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen. Zwei Oligonukleotid-Primer sind erforderlich, die spezifisch an den kodierenden bzw. an den nicht-kodierenden Strang eines DNA-Stücks binden. Die DNA-Matrize wird durch Hitzedenaturierung (94°C) zunächst in Einzelstränge aufgeschmolzen. Danach können die Primer, die in großem molaren Überschuß vorliegen, an ihre entsprechende Zielsequenz binden (Primer-Annealing, 45-60°C). Ausgehend von diesem

kurzen doppelsträngigen Bereich wird der fehlende, komplementäre Einzelstrang in 5'→3'-Richtung synthetisiert (Elongation, 72°C). Nach erneutem Aufschmelzen der DNA und Primer-Annealing arbeitet die hitzestabile DNA-Polymerase wieder weiter. Mit jedem Zyklus kommt es im Idealfall zu einer Verdoppelung der DNA und damit in einer Kettenreaktion zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung der durch die Oligonukleotide flankierten DNA-Sequenz. Theoretisch entstehen bei n Zyklen 2^{n-1} amplifizierte Moleküle.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR verwendet, um:

- Gensonden zu erstellen
- DNA-Sequenzen der Maus zu gewinnen, die bislang nur beim Menschen bekannt waren
- DNA-Fragmente zur Konstruktion von Expressionsvektoren zu gewinnen.

2.8.1 Standardprotokoll

Die PCR fand in einem Thermo Cycler (Omni Gene HB-TR3, Hybaid) statt. Als thermostabile Polymerase wurde die *Taq* DNA-Polymerase (Boehringer) verwendet. 10 bis 20 ng Plasmid-DNA dienten als Ausgangsmaterial. Der Reaktionsansatz wurde mit Öl überschichtet und bei 94 °C für 5 min. denaturiert. Bis zur Zugabe des Enzymmixes wurde der Ansatz auf 80 °C gehalten (hot start), dann setzten die Zyklen mit Denaturierung, Primeranlagerung und Polymerisation ein, wie in Tabelle 2.2 angegeben.

10 x PCR-Puffer:

Tris/HCl pH 8,3 100 mM
KCl 500 mM

1 x PCR-Puffer:

10x PCR-Puffer 10 µl
50 mM MgCl 3 µl

Enzymmix:

Taq-Polymerase (5 U/µl) 0,5 µl
1 x PCR-Puffer 1,0 µl
dNTPs (je 1,25 mM, Roth) 8,0 µl

Reaktionsansatz:

Primer A (10 pmol/µl) 2,5 µl
Primer B (10 pmol/µl) 2,5 µl
1 x PCR-Puffer 5,5 µl
DNA ca. 2 µl
H₂O ad 40,5 µl

Phase	Initiale Denaturierung	Zyklus Nr.1-40 (bzw.1-30)	Verlängerung (Extension)
Denaturierung	94 °C, 5 min.	94 °C, 1 min.	
Primer-Anlagerung		45-60 °C, 1 min.	
Polymerisation		72 °C, 1-2 min.	72 °C, 5 min.

Tabelle 2.2 Dauer und Temperatur der einzelnen Reaktionsschritte einer Polymerasekettenreaktion

2.9 Transformation von Bakterien

2.9.1 Präparation von kompetenten Bakterienzellen

Als kompetente Zellen bezeichnet man bakterielle Zellen, die in der Lage sind, exogene DNA aufzunehmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden *E. coli* Bakterien durch Behandlung mit Dimethylsulfoxid (DMSO) kompetent gemacht. 100 ml LB(-)-Medium wurden mit 1ml einer Übernachtskultur ausgehend von einer frischen Einzelkolonie von *E.coli* XL1-blue beimpft. Sobald eine OD₆₀₀ von 0,35 bis 0,38 erreicht war, wurde die Kultur abgekühlt und abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 15ml 1 x TSS resuspendiert, in Portionen von je 500µl aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

1x TSS (Transformation and Storage Solution):

PEG (Polyethylenglykol) 3350	12,5 ml
1 M MgCl ₂	2,5 ml
100% DMSO	2,5 ml
LB-Medium	ad 50 ml

2.9.2 Transformation von E. coli

Die Einschleusung von DNA in Bakterienzellen bezeichnet man als Transformation. Bei geeignetem Selektionsdruck, der sich durch Zugabe von Antibiotika erreichen läßt, wird ein in die Zelle geschleustes Plasmid stabil an die Tochterzellen weitergegeben.

Die kompetenten Bakterienzellen wurden aufgetaut, zu einem Ligationsansatz pipettiert und zur Aufnahme der DNA auf Eis gestellt. Nach einer Erholungsphase in LB-Medium bei 37°C wurde die Bakteriensuspension auf Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Die erhaltenen Klone konnten mittels Kochschnelltest (2.4.1) auf Anwesenheit des rekombinanten Plasmids überprüft werden.

2.10 Herstellung ³²P-markierter Sonden

Um ³²P-markierte DNA-Sonden zu erhalten, wurde das „Random primed Labeling“ Verfahren verwendet. Das als Matrize eingesetzte DNA-Fragment stammte aus einer PCR (2.8) oder einem Restriktionsverdau (2.5). Ein Gemisch aus Zufalls-Hexanukleotiden wurde als „random“-Primer genutzt (Feinberg & Vogelstein 1983), die an die Matrizen-DNA banden. An deren 3'-Ende begann die Synthese des komplementären Stranges durch das Klenow-Enzym begann. ³²P-markiertes dCTP wurde in den Strang eingebaut. Nach Abschluß der Reaktion mußten überschüssige, nicht eingebaute Desoxyribonukleosidtriphosphate durch Säulenchromatographie über eine Nick™ Column (Pharmacia) entfernt werden. Die gereinigte Probe wurde mit TE-Puffer von der Säule eluiert und ihre spezifische Aktivität mit Hilfe eines Szintillationszählers bestimmt.

TE-Puffer

1 M Tris pH 8,0	10 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	2 ml
H ₂ O	1000 ml

2.11 Isolierung und Analyse von RNA aus eukaryontischen Zellen

Beim Arbeiten mit RNA ist darauf zu achten, dass eine Kontamination der RNA-haltigen Lösung mit Ribonukleasen ausgeschlossen wird beziehungsweise dass die Aktivität der anwesenden RNasen minimiert wird. RNasen sind sehr stabile Proteine, die selbst Abkochen unbeschadet überstehen. Sie werden aber inaktiviert in Anwesenheit von z.B. Guanidiniumisothiocyanat und reduzierenden Agentien wie β -Mercaptoethanol (Chirgwin et al, 1979). Alle verwendeten Glaswaren, Pinzetten, Magnetührstäbchen, etc. wurden zur RNase-Dekontamination für mindestens fünf Stunden bei 250 °C gebacken.

2.11.1 Isolierung von totaler RNA

Die Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben wurde mit der Guanidiniumisothiocyanat-Methode (modifiziert nach Sambrook et al, 1989) isoliert. Frisch präpariertes Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in einem Warring Blendor zermahlen und mit GTC-Lösung vermischt. Nach Homogenisieren (Ultraturrax) und abzentrifugieren (3500 g, 5 min)

wurde der Überstand im Verhältnis 1:2 vorsichtig auf CsCl-EDTA überschichtet und 20 h bei 100000 x g und 20°C ultrazentrifugiert. Der gesamte Überstand wurde anschließend vorsichtig entfernt, das RNA Pellet in 70% Ethanol gewaschen, Phenol-Chloroform extrahiert (2.3.2), gefällt und in Wasser aufgenommen. Die Ausbeute lag bei etwa 700 µg RNA pro 2 g Gewebe.

Verwendete Lösungen:

GTC-Stocklösung:

4 M Guanidiniumisothiocyanat

23 mM Na-Citrat

0,5% N-Laurolylsarcosin

CsCl-EDTA Lösung:

5,7 M CsCl

0,1 M Na₂-EDTA

pH 7,0 mit NaOH

GTC-Lösung:

50 ml GTC-Stocklösung

333 µl β-Mercaptoethanol

1,67 ml Antifoam A

2.11.2 Isolierung von Poly (A)-RNA

Fast alle eukaryontischen Messenger-RNA-Moleküle werden nach der Transkription am 3-Ende polyadenyliert. Diese Poly (A)-Schwänze können zur Aufreinigung der mRNA aus Gesamt-RNA benutzt werden, da sie mit Polythymidylsäure Basenpaarbindungen eingehen. Bei dem verwendeten Poly (A) Quick mRNA-Isolation Kit (Stratagene) wird dieses Prinzip über eine Säulenchromatographie mit Oligo (dT)-Cellulose verwirklicht.

Nach Bindung der Poly(A)-RNA an die Oligo (dT)-Reste der Säule wurden Verunreinigungen durch mehrere Waschschriffe entfernt. Die Boten-RNA wurde eluiert, gefällt, in RNase-freiem Wasser gelöst und bei -80 °C aufbewahrt. Die Ausbeute betrug circa 5 % der Gesamt-RNA.

2.11.3 Gelelektrophorese von RNA

Es wurden zwei Methoden angewandt, um RNA elektrophoretisch aufzutrennen. In beiden Fällen lag die RNA vollständig denaturiert vor. 1.) Bei Northern-Blot-Analysen wurde die RNA für eine Stunde bei 50 °C in Denaturierungslösung inkubiert und über ein 1 %iges Agarosegel bei 60 V und 4 °C aufgetrennt.

2x Denaturierungslösung:		10x Phosphatpuffer (pH 7,0):	
40 % Glyoxal (deionisiert)	100 µl	1 M NaH ₂ PO ₄	39 ml
100 % Dimethylsulfoxid	400 µl	1 M Na ₂ HPO ₄	61 ml
10x Phosphatpuffer (pH 7,0)	10 µl		

2.) Um die Qualität von aus Gewebe frisch isolierter RNA oder *in vitro* transkribierten RNA-Fragmenten (2.12.2) zu begutachten, wurde die Elektrophorese auf 1 bzw. 3 %igen Agarosegelen in Anwesenheit von Methyl-Quecksilberhydroxid durchgeführt.

2x Auftragspuffer:		10x Laufpuffer:	
Methyl-Quecksilberhydroxid	25 µl	Borsäure	500 mM
10x Laufpuffer	100 µl	Natriumborat	50 mM
100 % Glycerol	200 µl	Natriumsulfat	100 mM
2 % Bromphenolblau (w/v)	100 µl		
H ₂ O	ad 1000 µl		

Die RNA-Moleküle wurden mit Ethidiumbromid unter UV-Durchleuchtung sichtbar gemacht und photographiert. Als Molekulargewichtsstandard diente die RNA-Ladder-Lösung von Gibco-BRL mit folgenden Fragmenten (in kb): 0,24; 1,35; 2,37; 4,40; 7,46 und 9,49.

2.11.4 Northern –Blot-Analyse

Mit der Northern-Blot-Analyse können RNA-Transkripte in einem Gewebe nachgewiesen und ihre Größe bestimmt werden. Poly (A)-RNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend aus dem Gel auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham) übertragen.

Hierzu wurde das Gel auf einen mit 20 x SSC getränkten Schwamm gelegt und mit entsprechend zugeschnittener Nylonmembran bedeckt. Ein Stapel mit Saugpapier sorgt für die Kapillarkräfte, die den SSC-Puffer durch das Gel nach oben ziehen. Dabei wandern die Nukleinsäure-Moleküle mit und bleiben in der Filtermembran hängen. Der Transferprozeß

Material und Methoden

wurde nach 15 - 18 Stunden abgebrochen, der Filter mit UV-Licht bestrahlt und bei 80 °C für 2 Stunden gebacken. Nach dieser Behandlung ist die RNA kovalent an die Aminogruppen des Nylonfilters gebunden.

Hybridisierung:

Die Membran mit der immobilisierten RNA wurde mit Prähybridisierungspuffer in einen Hybridisierungsbeutel (Gibco-BRL) eingeschweißt und im Wasserbad für eine Stunde bei 65 °C und für eine weitere Stunde bei 42 °C inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 42 °C in der Hybridisierungslösung, die die geeignete ³²P-markierte Sonde (2.10) enthielt (5x10⁶ cpm/ml). 15 bis 18 Stunden später wurde in folgenden Waschschrinen unspezifisch gebundene und überschüssige Sonde von der Membran entfernt:

- 2 x 5 min. in 2x SSC, 0,1 % SDS-Lösung bei Raumtemperatur,
- 2 x 10 min. in 1x SSC, 0,1 % SDS-Lösung bei Raumtemperatur,
- 2 x 15 min. in 0,1x SSC, 0,1 % SDS-Lösung bei 42 °C.

Auf den Filter wurde ein Film (Hyperfilm, Amersham) aufgelegt und zwischen zwei signalverstärkenden Folien in einer Kassette für 3 bis 7 Tage bei -80 °C gelagert. Nach der Entwicklung des Films war dort, wo die Sonde mit der gesuchten, komplementären RNA hybridisiert hatte, eine schwarze Bande erkennbar. Die Größe der RNA ließ sich anhand des Molekulargewichtsstandards im Gel und der Laufstrecken errechnen. Der Filter konnte nach zwei viertelstündigen Waschschrinen (zur Entfernung der gebundenen Sonde) mit 0,1x SSC, 0,1% SDS-Lösung bei 95 °C erneut zur Hybridisierung eingesetzt werden („strippen“).

Prähybridisierungslösung

5x PE	2,0 ml
20x SSC	2,5 ml
100 % Formamid (deionisiert)	5,0 ml
ssDNA (10 mg/ml, Gibco-BRL)	150 µl
H ₂ O	ad 10 ml

5x PE-Lösung

Natriumpyrophosphat	1 g
SDS	10 g
Polyvinylpyrrolidon (40.000)	2 g
Ficoll (400.000)	2 g
1 M Tris pH 7,5	50 ml
0,5 M EDTA	10 ml
H ₂ O	<u>ad circa 150 ml</u>

Hybridisierungslösung

5x PE	1,0 ml
20x SSC	1,25 ml
100 % Formamid (deionisiert)	2,5 ml
ssDNA (10 mg/ml)	75 µl
Sonde	[5x10 ⁶ cpm/ml x 5 ml]
H ₂ O	ad 5 ml

→ bei 65 °C in etwa 30 min. lösen,
 → auf 37 °C abkühlen,
 + 5 % BSA (frisch!) 40 ml
 + H₂O ad 200 ml
 sterilfiltrieren und bei -20 °C lagern

Die Hybridisierungslösungen mußten vor ihrer Verwendung 10 min. lang im kochenden Wasserbad erhitzt werden, um die DNA zu denaturieren.

2.11.5 Dot – Blot – Analyse

Für manche Fragestellungen bietet es sich an, RNA-Proben an eine Membran zu binden, ohne zuerst deren Komponenten in einer Elektrophorese aufzutrennen. Man macht dies, indem man mit einer speziellen Apparatur RNA in Form eines kleinen Punktes auf die Membran pipettiert (Katafos et al, 1979). Solche Dot-Blots stellen eine schnelle Methode zur Untersuchung einer großen Zahl von RNA-Proben auf bestimmte RNA-Spezies dar. Bei dem verwendeten kommerziellen Dot-Blot (Clontech) ist die Stärke der Hybridisierung ein recht gutes Maß für die Häufigkeit der mRNA in jedem aufgetragenen Zelltyp, da die RNA Menge der einzelnen Dots anhand einiger ubiquitär exprimierter „Housekeeper“-Gene standardisiert wurde. Die Bereitung der Sonde und Hybridisierung des Dot-Blots verlief exakt wie beim Northern-Blotting (2.11.4)

2.12 In – Situ – Hybridisierung

Wenn die Methoden der Nukleinsäure-Hybridisierung direkt an einem Gewebeschnitt angewandt werden, um Messenger-RNA Moleküle im Gewebe („in situ“) nachzuweisen und zu lokalisieren, spricht man von *In situ*-Hybridisierung.

Eine 200-300 bp lange DNA-Sequenz, die einem Abschnitt der zu untersuchenden mRNA entspricht, wurde in einen Transkriptionsvektor kloniert (pAL 1). Nach Linearisierung des Plasmids (durch *Bam*HI bzw. *Asp*718) wird durch DNA-abhängige RNA-Polymerasen, die ihren jeweiligen Promotor erkennen, cRNA synthetisiert. Je nach Orientierung entsteht der „Antisense“-Gegenstrang, der komplementär zur Boten-RNA ist, oder der „Sense“-cRNA-Einzelstrang. Durch Einbau von ³⁵S-UTP werden die RNA-Gensonden radioaktiv markiert. Nach Zugabe der Gensonden auf vorbehandelte Gewebeschnitte bildet die Antisenseprobe ein stabiles mRNA/cRNA-Hybrid mit der Boten-RNA im Gewebe aus. RNase A baut spezifisch einzelsträngige RNA ab, nicht aber das doppelsträngige Hybrid. Durch Autoradiographie wird die Hybridisierung sichtbar gemacht.

2.12.1 Verwendete Lösungen

10x PBS

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	6,2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,4	

1 M TRIS

Tris-Base	121 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH mit HCl _{conc} auf 8,0 bzw. 7,5 einstellen	

0,5 M EDTA, pH 8,0

Na ₂ EDTA*2 H ₂ O	186,1 g
H ₂ O	ad 1000 ml
mit 5 M NaOH auf pH 8,0 einstellen	

5x Protease-Puffer

1 M Tris pH 8,0	250 ml
0,5 M EDTA pH8,0	25 ml
H ₂ O	ad 500 ml

5x RNase A-Puffer

5 M NaCl	250 ml
1 M Tris pH 8,0	25 ml
0,5 M EDTA pH8,0	5 ml
H ₂ O	ad 500 ml

3 M Natriumacetat, pH 5,2

Natriumacetat*3 H ₂ O	40,8 g
H ₂ O	ad 100 ml
mit Eisessig auf pH 5,2 einstellen	

Alle oben genannten Lösungen wurden RNase-frei hergestellt und durch Autoklavieren sterilisiert.

1 M DTT

Dithiothreitol (ICN)	1,5 g
3 M NaAcetat pH 5,2	33 µl
H ₂ O	ad 10 ml
sterilfiltrieren und aliquotiert bei -20 °C lagern	

Box-Puffer

Formamid	50 ml
20x SSC	20 ml
H ₂ O	ad 100 ml

50 % Dextran

Dextransulfat (MG≈5x10 ⁵)	12,5 g
H ₂ O	ca. 12 ml
3 h bei 68 °C lösen	
H ₂ O	ad 25 ml
bei -20 °C lagern	

4 % PFA

Paraformaldehyd	6 g
10x PBS	15 ml
H ₂ O	ad 150 ml
bei 60 °C lösen, auf 4 °C abkühlen frisch zubereiten	

Formamid (deionisiert)

Ionenaustauscherharz (BioRad)	ca. 5g
Formamid	ca. 45 ml
bei 4 °C lagern	

2.12.2 In – Vitro – Transkription

Für jede cRNA-Sonde wurden jeweils 12 µg der entsprechenden Plasmid-DNA mit *Bam*HI und mit *Asp*718 in zwei getrennten Ansätzen linearisiert und nach Phenol/Chloroform-Reinigung (2.3.2) gefällt, in 11 µl H₂O gelöst und bei -20°C gelagert. Die *In vitro*-Transkription wurde mit jeder Probe einmal „kalt“ getestet, d.h. die Reaktion wurde ohne radioaktiv markierte Substanzen durchgeführt und die RNA-Produkte gelelektrophoretisch untersucht. Die T7-RNA-Polymerase synthetisiert in diesem System einen RNA-Strang, der komplementär zur entsprechenden Messenger-RNA ist, die sogenannte Antisense-Sonde. Die T3-Polymerase synthetisiert den Gegenstrang, der nicht komplementär sondern identisch mit der entsprechenden Boten-RNA ist, die sogenannte Sense-Sonde. Nach der *In vitro*-Transkription wurde die DNA-Matrize von DNase abgebaut und der Ansatz chromatographisch (Nick™ Column, Pharmacia) aufgetrennt. Von den Fraktionen 1 bis 5 wurden jeweils 5 µl in ein Plastikgefäß pipettiert, 5 ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben und die Aktivität im Szintillationszähler gemessen. Die radioaktiv markierte Gensonde befand sich in Fraktion 2. Sie wurde zur besseren Stabilität in Hybridisierungslösung auf eine Konzentration von 1x10⁷ dpm/ml verdünnt. Das notwendige Endvolumen des Hybridisierungspuffers wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{ml (Hybr.-Puffer)} = \frac{390 \mu\text{l (Probenvolumen)} \times \text{cpm}/\mu\text{l (gemessen)} \times 1,4 \text{ dpm/cpm (Effizienzfaktor)}}{1 \times 10^7 \text{ dpm/ml (gewünschte Konzentration)}}$$

RNase-freie Transfer-RNA (Boehringer) wurde hinzugefügt, um unspezifische Bindung und Hintergrundsignal zu vermindern. Dithiothreitol diente als Antioxidans der Stabilität des Schwefel-35.

2.12.3 Protokoll für die In – Situ – Hybridisierung

Das Protokoll für die *In situ*-Hybridisierung wurde in etwas abgeänderter Form von Simmons et al. (1989) übernommen.

- Getrocknete, fixierte Gewebeschnitte (2.13) wurden für 15 min. mit 2 µg/µl Proteinase K in 1x Proteasepuffer vorbehandelt.

- Waschgang: 5 min. in 0,5x SSC
- Um unspezifische Bindung der Sonde an den Schnitten zu vermeiden, wurde das Gewebe acetyliert:
 - 3 min. in 0,1 M TEA (Triethylammoniumacetat) pH 8,0 inkubieren.
 - 10 min. in 0,25 %iger Essigsäureanhydridlösung in 0,1 M TEA
 - 2 Waschschrte: je 2 min. in 2x SSC
- Entwässerung der Schnitte:
 - je 3 min. in 50 %, 70 %, 95 %, 100 % Ethanol
 - 5 min. lufttrocknen
 - 30 min. vakuumtrocknen

- Prähybridisierung:

Die Objektträger (OT) wurden in einer dicht verschließbaren Kammer waagrecht auf ein Gitter gelegt und die Gewebeschnitte mit der dickflüssigen Hybridisierungslösung bedeckt, die aus 8 Teilen 1,25x Hybridisierungspuffer, 1 Teil 1 M DTT und 1 Teil Wasser bestand. Um ein feuchtes Milieu in der Box aufrechtzuerhalten und damit ein Antrocknen der Hybridisierungslösung zu verhindern, wurde Saugpapier auf den Gefäßboden gelegt und mit Boxpuffer getränkt. Die Prähybridisierung erfolgte für zwei Stunden bei 42°C.

Sense- und Antisense-Probe (mit 1×10^7 dpm/ml Hybridisierungspuffer) wurden 10 min. lang im 65 °C-Wasserbad erhitzt und nach Zugabe von 80 µl 1 M DTT auf 1 ml Probenlösung zentrifugiert (2 min. 2000 rpm). 30 bis 100 µl Antisense- bzw. Sense-Probe wurden auf die prähybridisierten Schnitte pipettiert, die man danach bei 55 °C für etwa 16 Stunden im Ofen inkubierte.

- Die Objektträger wurden am nächsten Tag von unspezifisch gebundener Probe befreit. Um den im RNA/RNA-Hybrid gebundenen Schwefel-35 zu stabilisieren, enthielten die Waschlösungen 1 mM DTT und 1 mM EDTA pH 8,0. Die mit Sense- und Antisense-Probe hybridisierten Schnitte wurden völlig gleich behandelt:
 - 2 Waschschrte: je 10 min. in 2x SSC
 - RNase A-Verdau: 30 min. in 20 µg/µl RNase A in 1x RNase-Puffer
RNase A baut spezifisch einzelsträngige RNA ab, RNA/RNA-Hybride werden nicht verdaut
 - 2 Waschschrte: je 10 min. in 2x SSC
 - 2 Waschschrte: je 1 Stunde in 0,1x SSC bei 60 bis 70 °C
 - 3 Waschschrte: je 10 min. in 0,5x SSC

- Entwässern:

* je 3 min. in 50 %, 70 %, 95 %, 100 % Ethanol

* 5 min. lufttrocknen

* 30 min. vakuumtrocknen

Die verdünnten Ethanollösungen enthielten jeweils 2,3 % Ammoniumacetat, um das RNA/RNA-Hybrid zu stabilisieren.

Die trockenen Objektträger wurden auf Karton geklebt und ein Film (Kodak BioMax MR) aufgelegt. Nach 6 bis 20 Tagen Exposition bei 4 °C wurde der Film entwickelt.

2.12.4 Filmemulsion

Ob in einem Gewebe eine *In situ*-Hybridisierung stattgefunden hat, konnte anhand des exponierten Filmes geklärt werden. Um die Lokalisation der hybridisierten mRNA aber auf zellulärer Ebene bestimmen zu können, war eine Mikroautoradiographie notwendig. Die Objektträger mit den markierten Gewebeschnitten mußten mit einer Filmemulsion überzogen werden, die nach Exposition für 7-10 Wochen entwickelt wurde. Unter dem Lichtmikroskop konnten das Gewebe und die darüber liegenden Silberkörner, die dem radioaktiven Signal entsprechen, untersucht werden.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden in einer Dunkelkammer durchgeführt:

- Die Filmemulsion Kodak NTB-2 (Kodak) wurde im 42°C Wasserbad aufgeschmolzen.
- Die von Staubkörnern befreiten Objektträger wurden nacheinander in die Emulsion getaucht, langsam herausgezogen und senkrecht in einen Metallständer gestellt.
- Die Objektträger wurden nach dem Trocknen der Emulsion in einer lichtdichten Box mit viel Trockenmittel (Silicagel) für etwa 8 Wochen bei 4°C gelagert.

Entwicklung der Filmemulsion:

Die Entwicklerlösung (Kodak Developer D1-19) mußte mit Wasser 1:1 verdünnt werden. Anschließend wurden Entwickler und Fixiererlösung (Kodak Fixer) filtriert und auf 15°C temperiert. Der Entwicklungsvorgang wurde folgendermaßen durchgeführt:

- 4 min in den Entwickler
- 10 sec. in Wasser,
- 5 min. in den Fixierer,
- 5 min. in Wasser.

2.12.5 Histologische Färbungen

Um die Morphologie der Gewebeschnitte untersuchen zu können, wurden sie nach der Entwicklung der Filmemulsion gefärbt. Gehirnschnitte wurden leicht mit Toluidinblau eingefärbt, das sowohl Kerne als auch Zytoplasma blau darstellt. Alle anderen Gewebearten wurden mit Hämatoxylin/Eosin (HE) behandelt. Hier färben sich die Kerne blauviolett und das Zytoplasma rosa. Nach der Färbung wurden die Gewebeschnitte mit DePeX-Harz (Serva) und Deckgläschen bedeckt.

HE-Färbung:

- OT für 15 sec. in die Hämatoxylinlösung
- 2x2 min. in H₂O
- 5 sec. in 0,1 % Ammoniaklösung (frisch!)
- 2x2 min. in H₂O
- für 15 sec. in die Eosinlösung
- 8x in 95 % Ethanol tauchen
- 8x in 100 % Ethanol tauchen
- 2 min. in 100 % Ethanol
- 2x2 min. in Xylol

Toluidinblaufärbung:

- OT für 10-30 min. in die Toluidinblaulösung
- 3x in H₂O tauchen
- in 30 % Ethanol nach Bedarf entfärben
- trocknen lassen
- 2x2 min. in Xylol

Hämatoxylin-Lösung nach Harris (Sigma):

Hämatoxylin 7,5 g/l

Toluidinblau-Lösung:

Toluidinblau (Sigma) 10 g/l

Eosin-Lösung:

Eosin Y 6,0 g

Phloxine B 1,5 g

70 % Ethanol ad 250 ml

2.12.6 Mikroskopie und Photographie

Die angefärbten Gewebeschnitte wurden mit einem Zeiss Axioskop im Hell- und Dunkelfeld untersucht. Photographien wurden von 100-, 200- und 400-fachen Vergrößerungen mit einer Contax 167 MT-Kamera aufgenommen. Als Schwarz-Weiß-Negativfilm wurde Kodak 5052 TMX, 100 Asa verwendet.

2.13 Organpräparation für die In – situ – Hybridisierung

Sämtliche für die In-situ-Hybridisierung verwendeten Gewebe stammten von adulten, männlichen Balb/C-Mäusen. Um die Blutgerinnung zu hemmen, wurden den Tieren 300 I.E. Heparin intraperitoneal injiziert; nach 1 Stunde konnten die Mäuse mittels Genickbruch getötet werden.

Mikrodissektion und Einbetten des Sinusknotens:

Das Herz wurde mit den großen Gefäßen entfernt und umgehend in auf 37°C temperierte Tyrode-Lösung gegeben. Ein kleines Gewebstück (~ 1 mm²) vom Übergang der Vena cava superior in den rechten Vorhof, das den Sinusknoten enthielt, wurde unter einem Stereomikroskop (Zeiss) exzidiert. Der isolierte Sinusknoten kontrahierte in Tyrode-Lösung weiterhin spontan. Das Gewebstückchen wurde für 4 Stunden bei 4°C in 4% Paraformaldehydlösung fixiert und in einer Ethanolreihe über 8 Stunden dehydriert. Als Übergangsmedium fand Toluol Verwendung, das Präparat wurde in Paraffin (Paraplast X-Tra, Sigma) eingebettet, mittels eines Rotationsmikrotoms (Microm HM 335 E) mit 10µm Dicke geschnitten und auf Objektträger (Superfrost plus, Menzel Gläser) aufgezogen. Nach dreistündigem Backen (60°C) konnten die Schnitte unbegrenzt bei Raumtemperatur unter trockenen Bedingungen gelagert werden.

Präparation von Spinalganglien:

Lumbale Spinalganglien wurden wie folgt präpariert: Nach sorgfältigem Entfernen der Rückenmuskulatur konnte der Durasack mittels dorsaler Laminektomie unter Sicht (Stereomikroskop, Zeiss) intakt freigelegt und eröffnet werden. Die Cauda equina wurde durchtrennt und die Spinalganglien an den Spinalwurzeln herausgenommen. Das weitere Vorgehen zur Fixierung des Gewebes entsprach dem beim Sinusknoten.

Dissektion und Aufbereitung von Auge und Gehirn:

Die Organe wurden entnommen und in Isopentan, das in einer Trockeneis-Ethanol-Mischung gekühlt war, zügig eingefroren. In einem Cryostaten (Leica, Jung CM 3000) wurden bei -20°C 16 µm dicke Scheiben von den Geweben geschnitten und auf Polylysin-beschichtete Objektträger (Polysine, Menzel Gläser) aufgeschmolzen. Nach zwanzigminütigem Fixieren in 4% Paraformaldehyd und aufsteigender Ethanolreihe konnten die Schnitte in 95% Ethanol bei 4°C gelagert werden.

Tyrode-Lösung

137 mM NaCl

5,4 mM KCl

0,5 mM MgCl₂

1,8 mM CaCl₂

11,8 mM Na-HEPES

10 mM Glucose

pH7,4

2.14 Kultur eukaryontischer Zellen

2.14.1 Verwendete Zelllinie

Für die Expression in eukaryontischen Zellen wurde die permanente Zelllinie HEK 293 (ATCC[®] Nr. CRL 1573, Graham et al. 1977) verwendet. HEK 293 Zellen sind menschliche embryonale Nierenzellen (**human embryonic kidney cells = HEK**), die stabil den humanen Adenovirus Typ 5 in ihrem Genom tragen.

2.14.2 Nährmedium

Um Zellen in vitro zu kultivieren, muß man die Kulturbedingungen den in vivo herrschenden Bedingungen so weit wie möglich angleichen.

Minimum essential medium (MEM-Medium):

Das MEM-Medium ist sehr gut für das Wachstum von Säugerzellen geeignet, da es Aminosäuren, Vitamine, Glucose und Mineralien (Eagle 1959) enthält, und wird bei vielen etablierten Zelllinien und Primärzellen verwendet.

H ₂ O (autoklaviert)	435 ml
7,4 % NaHCO ₃ (sterilfiltriert)	15 ml
200 mM L-Glutamin (sterilfiltriert)	5 ml
10x MEM (Biochrom)	50 ml
Fötale Kälberserum (FCS)	50 ml
Antibiotika (Penicillin/Streptomycin)	5 ml

Das komplette Kulturmedium ist in dieser Form bei 4°C etwa 2 Wochen haltbar.

Dem Medium wurde 10 % Kälberserum (FCS, Biochrom) zugesetzt, um die Versorgung mit bestimmten Wachstumsfaktoren, Hormonen, Anheftungsfaktoren u.ä. zu gewährleisten. Um das Wachstum von Bakterien in den Zellkulturen zu unterdrücken, wurde dem Medium eine Mischung von Penicillin G und Streptomycin (Biochrom, Aufbewahrung: portioniert bei -20 °C) mit der Endkonzentration von 100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt.

2.14.4 Kultur

HEK 293 Zellen wachsen in adhärennten Kulturen, sogenannten Monolayern, angeheftet an Plastik-Kulturgefäße aus Polystyrol (Costar). Die Zellen wurden in Brutschränken bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt der Luft von 6 %, zur Konstanthaltung des pH-Wertes des Mediums, kultiviert.

Lösungen:

PBS:

NaCl	40,0 g
KCl	1,0 g
Na ₂ HPO ₄ *12 H ₂ O	14,5 g
KH ₂ PO ₄	1,2 g
H ₂ O	ad 5000 ml

auf pH 7,4 einstellen, autoklavieren.

Trypsin/EDTA:

Stammlösung: 0,5 % Trypsin / 0,2 % EDTA mit PBS 1:10 verdünnen,

⇒ 0,05 % Trypsin / 0,02 % EDTA

bei -20 °C lagern

Einfrriermedium:

MEM/FCS (ohne Antibiotika) 90 %

DMSO 10 %

Aussäen, Passagieren und Ernten von Zellen:

Etwa alle 4 Wochen wurde ein frischer Gefrierstock mit HEK 293 Zellen aufgetaut und in eine Kulturflasche mit vorgelegtem Medium ausgesät. Wenn die Kulturgefäße konfluent bewachsen waren, war es nötig, die Zellen in ein neues Gefäß umzusetzen und dabei zu verdünnen. Alle notwendigen Lösungen wurden auf 37 °C vorgewärmt. Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch kurze Behandlung mit Trypsin von der Gefäßwand gelöst. Nach Trypsin-Inaktivierung durch Zugabe von Medium wurden die Zellen gut resuspendiert und je nach Verwendungszweck weiterverarbeitet: **1.)** Die Zellen wurden bei 1000xg zentrifugiert und mit Einfriermedium als Gefrierstock eingefroren. **2.)** Zum Passagieren der Zellen wurde etwa 1/10 der Zellsuspension in ein neues Kulturgefäß überführt und mit frischem Medium versetzt. **3.)** Von den in ein Röhrchen überführten Zellen wurde die Zellzahl pro ml Suspension im Hämozytometer nach Neubauer bestimmt. Die Zellen konnten daraufhin für eine Transfektion ausgesät werden.

2.14.3 Transfektion von eukaryontischen Zellen

Beim Einschleusen von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen spricht man von Transfektion. Bei einer transienten Transfektion wird die zirkuläre Fremd-DNA unabhängig vom Genom der Wirtszelle (episomal) transkribiert, allerdings sind die eingeschleusten Gene nur vorübergehend aktiv und gehen im Verlauf weiterer Zellteilungen wieder verloren.

Calciumphosphat-Methode:

Zur Expression von HCN Kanalproteinen in HEK 293 Zellen wurde die Calciumphosphat-Transfektionsmethode nach Graham und van der Eb (1973) angewandt. Der nach Ishiura et al. (1982) modifizierte Puffer führt zur Bildung eines Calciumphosphat-DNA-Präzipitates. Dieser feinkörnige Niederschlag setzt sich auf den Zellen ab und wird von ihnen durch Endocytose aufgenommen.

Verwendete Lösungen:

BBS: (2x BES-buffered solution)

50 mM N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure (BES, Sigma)

280 mM NaCl

1,5 mM Na₂HPO₄ pH 6,95

800 ml H₂O zugeben und pH 6,95 mit NaOH einstellen

ad 1000 ml H₂O

Sterilfiltrieren, aliquotieren und bei -20°C lagern.

CaCl₂-Lösung:

2,5 M wässrige, sterilfiltrierte CaCl₂-(Sigma) Lösung, Aufbewahrung bei -20°C.

Transfektionsmix für 3 x 175 cm² Kulturflaschen:

2,5 M CaCl₂-Lösung 500 µl

Plasmid-DNS 300 µg

H₂O ad 10000 µl

BBS 5000 µl

Durchführung:

- Je etwa 3×10^6 HEK 293 Zellen wurden in drei 175 cm² Kulturflaschen ausgesät und im Brutschrank (37 °C, 6 % CO₂) inkubiert.
- Nach 36 h wurden die Zellen transfiziert. Dazu wurde der Transfektionsmix nach dem Mischen für 20 min. bei RT inkubiert.
- Danach wurde je 1/3 der Lösung tropfenweise auf die Zellen gegeben und diese für 16-18 h bei 3 % CO₂ und 35 °C im Brutschrank inkubiert.
- Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und je 30 ml frisches Medium zugegeben.
- 36-72 h nach der Transfektion konnten die Zellen geerntet werden, da nach dieser Zeit etwa 5-30 % der Zellen das transfizierte Protein exprimieren.

2.15 Isolierung und Charakterisierung von Proteinen

2.15.1 Aufreinigung spezifischer Peptidantikörper

Von der Firma Gramsch wurde Immuns Serum aus Kaninchen gegen die carboxyterminal im Kanal gelegenen Peptide pHCN2 (NH₂-CWAAVQRESVLTDPDAE-COOH) und pHCN4 (NH₂-TAAPQREPGARSEPVRSK-COOH) bezogen. Zur Aufreinigung von spezifischen Antikörpern aus dem Serum wurden die reduzierten Peptide an SulfoLink-Sepharose (Pierce) gekoppelt, daraus eine Säule erstellt und 3 ml des Immuns Serums verdünnt in PB, 0,5 M NaCl bei 4°C 16 h über diese Säule zirkuliert. Der gebundene Antikörper konnte mit 5 M MgCl₂ von der Säule eluiert werden, wurde über Ultrafiltration (Amicon-G 30) aufkonzentriert und in Aliquots bei -80°C gelagert.

Die Peptidantikörper konnten in einer Verdünnung von 1:300 für Westernblots eingesetzt werden. Ein kommerziell gefertigter monoklonaler Maus-Antikörper (Invitrogen) gegen das Myc-Tagpeptid (NH₂-EQKLISEEDL-COOH) wurde ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

PB, 0,5 M NaCl

500 ml PBS

10,2 g NaCl

2.15.2 Membranpräparation

Ionenkanäle werden vorrangig in der Zellmembran und den Membranen intrazellulärer Kompartimente exprimiert. Durch Differentialzentrifugation ist es möglich, diese sogenannte Mikrosomenfraktion von den restlichen Zellbestandteilen zu trennen. Da Kanalproteine sehr schnell von Proteasen angegriffen und gespalten werden, wurden alle Arbeitsschritte bei 4°C durchgeführt und den verwendeten Lösungen verschiedene Proteaseinhibitoren hinzugefügt.

Proteaseinhibitoren:

Die Proteaseinhibitoren wurden bei -20°C gelagert, erst kurz vor Gebrauch den Lösungen zugesetzt und dabei auf 1/1000 verdünnt.

1 mg/ml Leupeptin (Calbiochem) in 50% Ethanol

1 mM Pepstatin A (Calbiochem) in 50% Ethanol

Material und Methoden

- 1 mg/ml Antipain (Calbiochem) in 50% Ethanol
- 100 mM PMSF (Fluka) in 100% Ethanol
- 1 M 1,10-Phenanthrolin (Fluka) in 100% Ethanol
- 1 M Benzamidin (Sigma) in H₂O

Mikrosomenpuffer

- 50 mM Tris, pH 7,5
- 5 mM EDTA
- ad 500 ml H₂O ; autoklavieren

Puffer A

- 20 mM MOPS
- 300 mM Sucrose
- 2mM EDTA
- ad 500 ml H₂O_{bidest}

3,0 M KCl

- 3 M KCl
- ad 30 ml H₂O

Präparation von Membranproteinen aus HEK293 Zellen:

Die bei -80°C gelagerten Zellpellets aus drei 175 mm² Kulturflaschen wurden auf Eis in Mikrosomenpuffer mit Proteaseinhibitoren aufgenommen. In einem Glas-Teflonhomogenisator („Potter“) wurde die Zellsuspension mit 10 Hüben homogenisiert, 15 Minuten bei 1800 x g zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet der gleichen Prozedur nochmals unterzogen. Die beiden Überstände wurden vereinigt, die Mikrosomenfraktion durch Ultrazentrifugation abgetrennt (45 min, 100000 x g, 4°C), in 100 µl Mikrosomenpuffer aufgenommen, mit einem 1 ml Potter homogenisiert und in Aliquots bei -80°C gelagert.

Membranpräparation aus Maus-Gehirn:

2,5 g des Gewebes wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem Waring-Blendor zu feinem Pulver zermahlen. Nach Zugabe von 20 ml Mikrosomenpuffer mit den Proteaseinhibitoren wurde die Präparation durch Scheren im Ultraturrax und 5 Hübe mit

einem Potter homogenisiert und 10 Minuten bei 5000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde aufbewahrt, das Pellet in Puffer A aufgenommen und erneut extrahiert. Die vereinigten Überstände wurden mit final 0,6 M KCl vermengt (um Zytoskelettproteine in Lösung zu halten) und bei 100000 x g 40 Minuten lang zentrifugiert. Das Pellet wurde in 400 µl Puffer A resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.15.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mit der BCA-Methode

Es handelte sich hierbei um eine spektrophotometrische Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen (Smith et al, 1985), die eine Modifikation des von Lowry 1951 beschriebenen Prinzips darstellt. Dabei werden Metallionen in alkalischer Lösung durch Proteine reduziert; aus zweiwertigen entstehen einwertige Kupferionen, die mit einem spezifischen Reagenz, der 2,2'-Bis(chinolin-4-carbonsäure)(BCA) einen violett gefärbten Komplex bilden. Die Extinktion dieses Komplexes kann bei 540 nm gemessen werden. Da die Intensität der Färbung von Reaktionszeit und Temperatur abhängt, muß bei jeder Bestimmung eine Eichkurve mit Lösungen bekannter Konzentration angefertigt werden.

Das (bei Lagerung instabile) BCA Reagenz wurde jeweils kurz vor Gebrauch aus dem Reagenz A und B (Pierce) im Verhältnis 50 zu 1 angesetzt.

Reagenz A:

1% 2,2'-Bis(chinolin-4-carbonsäure)-Na₂
0,4% NaOH
2% Na₂CO₃ x H₂O
0,16% Na₂-tartrat
0,95% NaHCO₃

Reagenz B:

4% CuSO₄ x H₂

Standards:

0,5, 1, 2, 3, 4 µg BSA/50µl H₂O

Die zu erwartenden Proteinkonzentrationen betragen zwischen 5 mg/ml (HEK Zellen) und 20 mg/ml (Gewebe). Nach Mischen der verdünnten Proteinlösungen (1:100 bis 1:300) mit BCA Reagenz wurde für 60 min bei 60°C inkubiert und die Farbreaktion über einen ELISA-Reader

(Titertek) ausgewertet. Anhand der Werte der Standards ließ sich die gesuchte Proteinkonzentration berechnen.

2.15.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine schnelle und sensitive Methode zur Auftrennung von Proteinen. Sie wurde im Rahmen dieser Arbeit nach Lämmli (1970) durchgeführt. Das Proteingemisch wurde zunächst unter Zugabe von SDS gelöst, einem Detergens, das die nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört. Durch reduzierende Agenzien (β -Mercaptoethanol oder DTT) wurden Disulfidbrücken getrennt. Es entsteht ein Komplex aus SDS und denaturiertem Protein, dessen stark negative Ladung zur Molmasse des Proteins ungefähr proportional ist. Ein Größenstandard (Gibco Benchmark Protein Ladder, 10 – 220 kDa) diente als Vergleichsmaßstab. Da der Logarithmus der Laufstrecken zur Molmasse der Proteine direkt proportional ist, lässt sich anhand der Standardproteine die Größe der unbekannt Proteine bestimmen.

Es wurde eine Mini-Gel Apperatur der Firma Biorad (Mini Protean II Cell). Nach der Elektrophorese wurden die getrennten Proteine spezifisch durch Immunoblot nachgewiesen.

10 x Laufpuffer:

0,25 M Tris

1,92 M Glycin

0,1% SDS

pH 8,4

4 x Probenpuffer:

0,2 M Tris/HCl, pH 6,8

10% β -Mercaptoethanol

5% SDS

40% Glycerol

0,004% Bromphenolblau (Sigma)

aliquotiert bei -80° gelagert

4 x Sammelgelpuffer :

0,5 M Tris

0,4% SDS

pH 6,8

30% Acrylamid (Roth) :

29% Acrylamid

1% N,N' Methylen-bisacrylamid

4 x Trenngelpuffer :

1,5 M Tris
0,4% SDS
pH 6,8

7,5% Trenngel :

3,75 ml 30% Acrylamid
3,75 ml 4 x Trenngelpuffer
7,5 ml H₂O
0,025 ml 20% APS
0,1 ml TEMED
Menge reicht für zwei Gele

4% Sammelgel:

0,65 ml 30% Acrylamid
1,25 ml 4 x Sammelgelpuffer
3,05 ml H₂O
0,0125 ml 20% APS
0,005 ml TEMED
Menge reicht für 2 Gele

Zur Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele wurden Glasplatten mit 0,75 mm Spacer in die Gießvorrichtung eingesetzt, das Trenngel bis 2 cm unter den oberen Rand gegossen und mit Ethanol überschichtet. Nach einer Stunde wurde der Ethanol entfernt und Sammelgel eingefüllt. 10 – 100 µg Mikrosomen wurden mit 4 x Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x Laufpuffer bei 150 V.

2.15.5 Immunologische Detektion durch Western-Blot

Die Anwesenheit von HCN2 und HCN4 in den Membranpräparationen sollte spezifisch durch Westernblot nachgewiesen werden. Dazu wurden die Mikrosomenfraktionen zunächst durch SDS-PAGE aufgetrennt und vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Mit Hilfe der spezifischen Antikörper und einer sensitiven Chemolumineszenzmethode (ECL, Amersham) konnten native wie auch heterolog exprimierte HCN Kanalproteine auf der Membran detektiert werden. Zur Sichtbarmachung der gesuchten Proteinbande lässt man zunächst den spezifischen Antikörper daran binden. Dieser wurde mit Hilfe eines zweiten Anti-Immunglobulin – Antikörpers detektiert, der an ein Enzym (Meerrettich-Peroxidase) gekoppelt war. Oxidiert diese Peroxidase Luminol, so entsteht ein lichtemittierender,

angeregter Übergangszustand. Die Chemolumineszenz lässt sich mit speziellem Film (Hyperfilm ECL, Amersham) dokumentieren.

Proteintransfer durch Semidry-blotting mit diskontinuierlichem Puffersystem:

Die Proteine wurden zunächst durch ein 7% SDS-PAGE aufgetrennt und währenddessen einige Filterpapiere (Blotting Papier 001, Schleicher und Schüll) sowie die Nitrocellulosemembran (Hybond ECL, Amersham) auf Trenngelgröße zugeschnitten und mit den entsprechenden Puffern getränkt. Anschließend wurde der Blot in folgender Reihenfolge luftblasenfrei von unten nach oben aufgebaut:

- 6 Lagen Filterpapier mit Anodenpuffer 1
- 3 Lagen Filterpapier mit Anodenpuffer 2
- Membran
- SDS-Gel
- 6 Lagen Filterpapier mit Kathodenpuffer

Der Stapel wurde zwischen Anodenplatte (unten) und Kathodenplatte (oben) plaziert. In der Transferapparatur (Novablot Elektrophoretik Transfer Kit, LKB) wurde über 1 Stunde mit konstanter Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Membran geblottet.

Immunfärbung:

Die Membran wurde über Nacht bei 4°C in der Blockierungslösung geschwenkt, um freie Protein-Bindungsstellen zu blockieren. Nach Waschen mit 1 x TBST musste die Membran über 90 Minuten mit dem entsprechend verdünnten primären Antikörper (in 1 x TBST + 0,1% BSA) bei Raumtemperatur inkubiert werden, weiteres dreimaliges Waschen in 1 x TBST folgte. Der Blot wurde mit sekundärem Antikörper (1:7500 in TBST verdünnt) über 1 Stunde auf einer Wippe geschüttelt und drei mal mit TBST gewaschen. Zur Sichtbarmachung der Banden behandelte man die Membran genau 1 Minute lang mit ECL Reagenz (Amersham) und konnte anschließend die Banden durch den Chemolumineszenzeffekt in der Dunkelkammer mit einem Film detektieren.

Anodenpuffer 1:

300 mM Tris, pH 10,4
20% Methanol

10 x TBST:

100 mM Tris, pH 8,0
1,5 M NaCl
0,5% Tween 20

Material und Methoden

Anodenpuffer 2:

25 mM Tris, pH 10,4

20% Methanol

Blockierungslösung:

5% BSA in 1x TBST

Kathodenpuffer:

20 mM Tris, pH 7,6

40 mM 6-Aminohexansäure (Roth)

20% Methanol

3 Ergebnisse

3.1 Gewebsexpression von humanem HCN4 (hHCN4)

Da das Expressionsmuster von HCN 4 bis dato nur unvollständig durch Northern Blot Untersuchungen bestimmt worden war (Ludwig et al, 1999), wurde ein RNA-Dot-Blot (2.11.5) mit dem kommerziellen „Human multiple tissue expression array“ (Clontech) durchgeführt, der RNA aus einer Vielzahl von humanen Geweben trägt. In Abbildung 3.1 ist links das Autoradiogramm des Blots, in der rechten Hälfte ein Schema der getesteten Gewebe zu sehen. Zur Hybridisierung wurde eine Gensonde, die den Nukleotiden 4513-4910 der hHCN4 cRNA entsprach, mittels PCR (Primer MOO1F und MOO2R, siehe Anhang) amplifiziert (2.8) und über random-primed labeling (2.10) mit ³²P markiert.

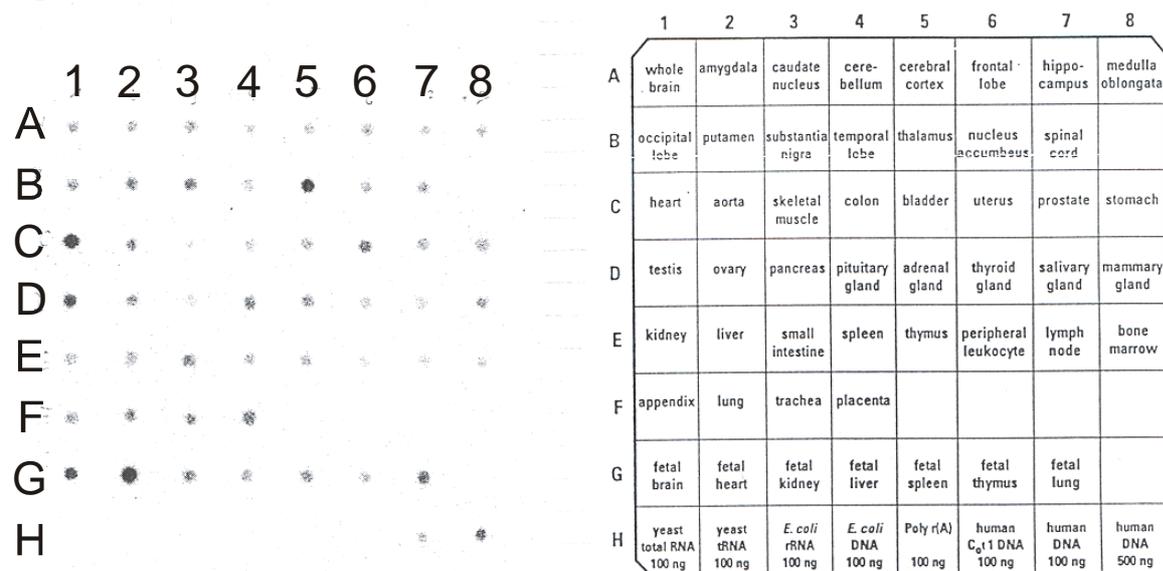


Abbildung 3.1 Dot-blot Untersuchung der Expression von humanem HCN4. Links ist ein Autoradiogramm des Blots dargestellt, die Exposition des Films betrug 3 Tage bei -80°C. Rechts sind die zu den RNA-Dots korrespondierenden Gewebe abgebildet.

Die HCN4 Sonde zeigte, wie in Abbildung 3.1 zu erkennen, Hybridisierungssignale in Herz (C1), Thalamus (B5), Testis (D1) und fetalem Herz und Gehirn (G2, G1). Die Signale, die zum Beispiel Leber (E2) oder Milz (E4) detektiert wurden, stellen unspezifische Hintergrund-Hybridisierung dar. Im folgenden sollte die Expression der HCN Kanäle an der Maus weiter untersucht werden.

3.2 Klonierung der carboxyterminalen Region von mHCN4

Während die kompletten cDNAs der HCN Kanal-Subtypen 1 bis 3 bei der Maus (mHCN1-3) bereits charakterisiert waren (Ludwig et al, 1998), kannte man von mHCN4 bislang nur eine partielle cDNA-Sequenz. Diese kodierte für den unter den einzelnen Subtypen hoch-homologen Kernbereich aus Transmembransegmenten und Cyclonucleotidbindungsdomäne (Santoro et al, 1998).

Um auch die Sequenz des Carboxyterminus von mHCN4 zu bestimmen, wurde ein P1-Phagemid, das Teile der genomischen DNA von mHCN4 als Insert enthielt, mit Hilfe der PCR-Technik (2.8) gescreent (Primer MOO3F, MOO4R, Sequenzen im Anhang). Das Phagemid war aus einer P1-Phagenbibliothek (Genome Systems) von genomischer Maus-DNA mit einer 163 Basen langen Sonde aus dem Exon 3 von mHCN4 isoliert worden. Durch die PCR konnte ein Fragment amplifiziert und subkloniert werden, das Teile des murinen HCN4 Gens einschließlich des für das carboxyterminale Ende kodierenden Exons mit Stopcodon enthielt; dieser Klon wurde anschließend auf beiden Strängen sequenziert (2.7). Abbildung 3.2 vergleicht die carboxyterminale Region von hHCN4 (Ludwig et al, 1999) und den korrespondierenden Teil der neu isolierten mHCN4-Sequenz auf Aminosäureebene, die Homologie betrug etwa 90% . Die Homologie zu mHCN1-3 war dagegen sehr niedrig; im Anhang findet sich die komplette Nukleotidsequenz des klonierten Carboxyterminus.

hHCN4	GRPYGAIPGQHVTLPKRTSSGSLPPPLSLFGARATSSGPP	1178
mHCN4	GRPYGAIPGQHVTLPKRTSSGSLPPPLSLFGARAASSGGP	
hHCN4	PL . TAGPQREPGARPEPVRSKLPSNL-Stop	1203
mHCN4	PLTTAAPQREPGARSEPVRSKLPSNL-Stop	

Abbildung 3.2 Alignment der Aminosäuresequenzen der Carboxytermini von humanem und murinen HCN4. Fehlende Übereinstimmung ist rot markiert.

3.2.1 Northern-Analyse

Mit einer Northern-blot-Analyse (2.11.4) sollten die Transkripte von HCN4 in Herz und Gehirn auch bei der Maus nachgewiesen und ihre Größe bestimmt werden. Abbildung 3.3 zeigt die Ergebnisse.

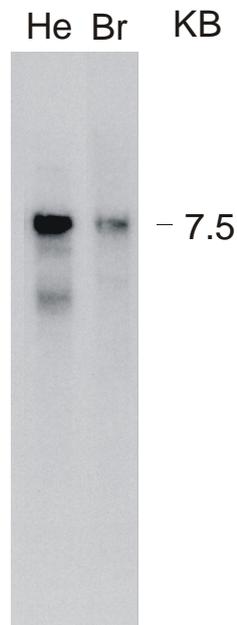


Abbildung 3.3 Northern blot mit 10µg Gehirn Poly(a)-RNA (Br) und 10µg mRNA aus Mäuseherzen (He), hybridisiert mit Sonde A gegen den Carboxyterminus von mHCN4. KB: Kilobasen

Die bei der Northern-Analyse verwendete Sonde A entsprach dem kompletten, in 3.2 charakterisierten carboxyterminalen Ende von mHCN4 und wurde mittels PCR (2.8) mit den Primern MOO3F und MOO4R erzeugt. Die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde A zeigte deutlich ein 7,5 kb Transkript in 10 µg Herz-mRNA und in geringerem Maße auch in 10 µg mRNA aus murinem Gehirn. Dieses Expressionsmuster deckt sich mit den Ergebnissen des Dot-blots für humanen HCN4 in 3.1, auch hier war eine deutliche Expression von HCN4 in Herz und Gehirn zu verzeichnen.

Um das Resultat zu bestätigen, wurde ein zweiter Blot angefertigt und eine Hybridisierung mit einer „common“ Sonde B durchgeführt, die sowohl HCN2 wie auch HCN4 Transkripte erkennen sollte. Dazu wurde eine Sonde amplifiziert, die dem kompletten vierten Exon des mHCN4 Gens entspricht (Primer MOO5F und MOO6R, Sequenzen siehe Anhang). Da die Homologie auf Nukleinsäureebene zwischen mHCN2 und mHCN4 in diesem Bereich (der in der Porenregion des Kanals gelegen ist) über 93% beträgt, konnte die Sonde Transkripte beider Gene erkennen (Abbildung 3.4).

Ergebnisse

Es zeigte sich wiederum ein 7,5 kb mHCN4 Transkript in Herz und Gehirn, sowie ein besonders im Gehirn (Abbildung 3.4A,B) sehr starkes Signal bei 3,4 kb. Dieses entspricht mHCN2 (Ludwig et al, 1998).

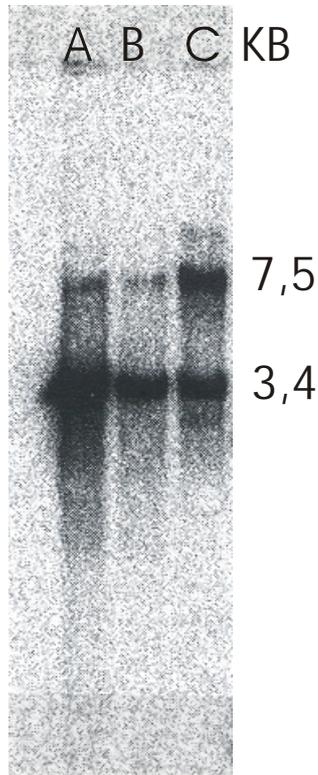


Abbildung 3.4 Zweiter Northern-blot, hybridisiert mit Sonde B. (A,B), 10 bzw. 2,5µg Gehirn-mRNA. (C), 10µg Herz poly(A)-RNA. KB: Kilobasen

3.3 Sonden zur In-situ Hybridisierung

Im nächsten Schritt sollten subtyp-spezifische Gensonden erstellt werden, um HCN Transkripte auch direkt im Gewebe von Mäusen mit Hilfe der In-situ Hybridisierungstechnik (2.12) nachweisen zu können. Jeweils ein Fragment der HCN Kanal-Subtypen 1 – 4 wurde zur Synthese von cRNA Sonden für die In-situ Hybridisierungsexperimente mit Hilfe der PCR-Technik amplifiziert (2.8) und in den Expressionsvektor pAL1 (2.2) kloniert. Dieses Plasmid stammt von pUC19 ab und enthält einen T3 und T7 RNA-Polymerase-Promotor sowie Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI und Asp718 (Ludwig et al, 1997). Die Lokalisation der Sonden ist in Abbildung 3.5 gezeigt (die Sonden lagen alle im zwischen den Kanälen wenig homologen Carboxy- bzw. Aminoterminus und waren daher subtyp-spezifisch), die verwendeten Primer in Tabelle 3.1.

Ergebnisse

Gen	Primer	Gensonde (aa)	Referenz
HCN1	MOO7F MOO8R	636 bis 722	Ludwig et al, 1998
HCN2	MOO9F MOO10R	653 bis 741	Ludwig et al, 1998
HCN3	MOO11F MOO12R	131 bis 197	Ludwig et al, 1998
HCN4	MOO3F MOO4R	1178 bis 1301(+ 3' untranslated)	Moosmang et al, 1998

Tabelle 3.1 Primerpaare, die zur Gewinnung der Gensonden verwendet wurden (Sequenzen siehe Anhang)

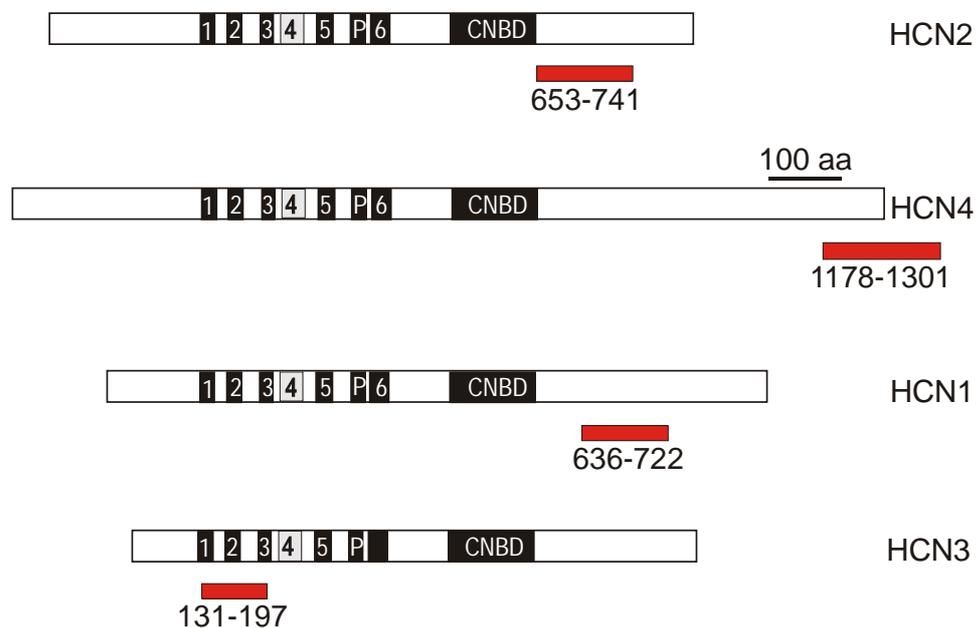


Abbildung 3.5 Schema zur Lokalisation der Gensonden für die In-situ-Hybridisierung innerhalb der HCN Kanaluntereinheiten (rote Balken). Die kodierenden Sequenzen der Kanäle sind als weiße Balken dargestellt, schwarz markiert sind die putativen Transmembransegmente, die Pore und die Zyclonukleotidbindungsdomäne. Die Sonden liegen in den wenig homologen Amino- bzw. Carboxytermini und sind daher spezifisch für die einzelnen Subtypen.

An den 5'-Enden der zur Erstellung der Proben verwendeten Vorwärts-(F) beziehungsweise Rückwärts-(R) Primer waren die Erkennungssequenzen für BamHI bzw. Asp718 angefügt. Über diese Schnittstellen wurden die Fragmente in den geöffneten, dephosphorylierten pAL 1 Vektor ligiert (2.5). Alle Insertionen wurden durch Sequenzierung (2.7) auf beiden Strängen überprüft. Nach einer „kalten“ Transkription ohne Radionukleotid wurden ³⁵S markierte Riboproben durch In-vitro –Transkription synthetisiert (2.12.2).

3.4 Ergebnisse der In-situ Hybridisierungsexperimente

Zur Validierung der In-situ Hybridisierungsexperimente wurden die Präparate immer parallel mit Sense- wie auch Antisenseproben behandelt. Wenn die Senseprobe keine Hybridisierung zeigte, konnte davon ausgegangen werden, dass das mit der Antisenseprobe erhaltene Signal spezifisch war (bzw. dass eine gleich lange Sonde von gleichem GC-Gehalt wie die Antisenseprobe keine unspezifische Bindung an das Zielgewebe zeigte). Außerdem wurden korrespondierende Geweberegionen stets an mehreren Mäusen präpariert, die Resultate waren immer reproduzierbar.

3.4.1 Verteilung von HCN-Kanälen im Gehirn

Expression von HCN1

Die HCN1 Sonde zeigte auf dem Autoradiogramm deutliche Signale im Bulbus olfactorius, Cortex (der Großhirnrinde), Hippocampus, Colliculus superior und Cerebellum (Abbildungen 3.6A und 3.7A). Nach Beschichten der Objektträger mit Autoradiographieemulsion konnte das Signal in der Großhirnrinde auf die corticalen Schichten II und V eingegrenzt werden (nicht abgebildet). Im Hippocampus (einem für Lernen und Gedächtnis wichtigen Teil des Archicortex) waren die Pyramidenneurone im CA1 Feld massiv mit Silberkörnern markiert, während sie in den CA2 und CA3 Feldern nur schwache Hybridisierungssignale aufwiesen (Abbildung 3.8A). Vereinzelt Neurone im Stratum oriens und Stratum radiatum des Hippocampus markierten sich stark. Im Gyrus dentatus enthielten die Neuronen der polymorphen Schicht sehr viel HCN1 Transkript; in der granulären Schicht zeichnete sich dagegen nichts ab.

In den Stellatum- und Korbzellen des Stratum moleculare des Kleinhirns (Abbildung 3.9A) fand sich viel HCN1 mRNA, mäßig viel in den Purkinjezellen, fast nichts in den Neuronen des Stratum granulare.

Sehr viel HCN1 war im Colliculus superior (einem Teil der Sehbahn) zu erkennen, am stärksten in dessen mittleren und unteren Anteilen.

Expression von HCN2

Im Gegensatz zu HCN1 fanden sich HCN2 Transkripte nahezu ubiquitär im ZNS, die stärksten Signale im Bulbus olfactorius, Cortex, Hippocampus und Kleinhirn (Abbildungen 3.6B, 3.7B; Tabelle 3.2).

Ein Bereich mit sehr starker Expression von HCN2 war der Thalamus (Abbildung 3.9C). Starke Anreicherung von Silberkörnern war in vielen thalamocorticalen Umschaltkernen zu erkennen, einschließlich der ventroposterioren (VP) und posterioren Kerngebiete und, etwas schwächer, im Nucleus geniculatus lateralis (LG). Diese Umschaltkerne zählen zu den sogenannten spezifischen Thalamuskernen, die jeweils fest mit einem bestimmten Bezirk der Hirnrinde verknüpft sind.

Weniger starke Signale ließen sich in den intralaminären Kernen des Thalamus beobachten (es handelt sich dabei um mit dem gesamten Cortex verknüpfte Kerngebiete, die ein Teil des für die Vigilanz wichtigen aufsteigenden retikulären Aktivierungssystems sind).

Im Hippocampus verteilte sich die Expression von HCN2 gleichmäßig auf die Pyramidenneurone der Regionen CA1 bis CA3 (Abbildung 3.8B). Einige Neuronen im Stratum radiatum, oriens und lacunosum-moleculare zeichneten sich ebenfalls ab. Im Gyrus dentatus des Hippocampus ließ sich HCN2 mRNA in kleinen Mengen im Stratum granulare nachweisen; im Kleinhirn fand sich ein starkes Signal in den Purkinjezellen (Abbildung 3.9B).

Expression von HCN3

Auf den Autoradiogrammen fand sich im gesamten Gehirn wenig Signal für HCN3, mit Ausnahme einer mittelstarken Expression im bei der Maus sehr großen Bulbus olfactorius, der die erste Schaltzentrale für Geruchsreize darstellt (Abbildung 3.6; Tabelle 1). Auch die in Emulsion getauchten Schnitte wiesen nur in Neuronen des Bulbus olfactorius stärkere Markierung mit Silberkörnern auf.

In den übrigen Gehirnregionen wurde nur wenig HCN3 Transkript exprimiert, das Signal in der Autoradiographie lag nur gering über dem allgemeinen Hintergrund.

Expression von HCN4

Eine bemerkenswerte Gewebsverteilung ergab sich für die HCN4 Transkripte, da praktisch nur im Bulbus olfactorius, Thalamus und den Habenulae (einem Kerngebiet, das olfaktorische Impulse zu salivatorischen und motorischen Kernen des Hirnstamms übermittelt) ein deutliches Signal zu sehen war; wenig bis nichts aber in anderen Hirnregionen (Abbildung 3.6D und 3.7C; Tabelle 3.2).

Ergebnisse

Auf zellulärer Ebene fand sich HCN4 in mittlerer Ausprägung in vielen Umschaltkernen und intralaminären Kernen des Thalamus (Abbildung 3.9).

Im Hippocampus waren geringe Mengen von HCN4 mRNA in den Pyramidenzellen der CA1 bis CA3 Region und im Gyrus dentatus nachzuweisen (Abbildung 3.8C).

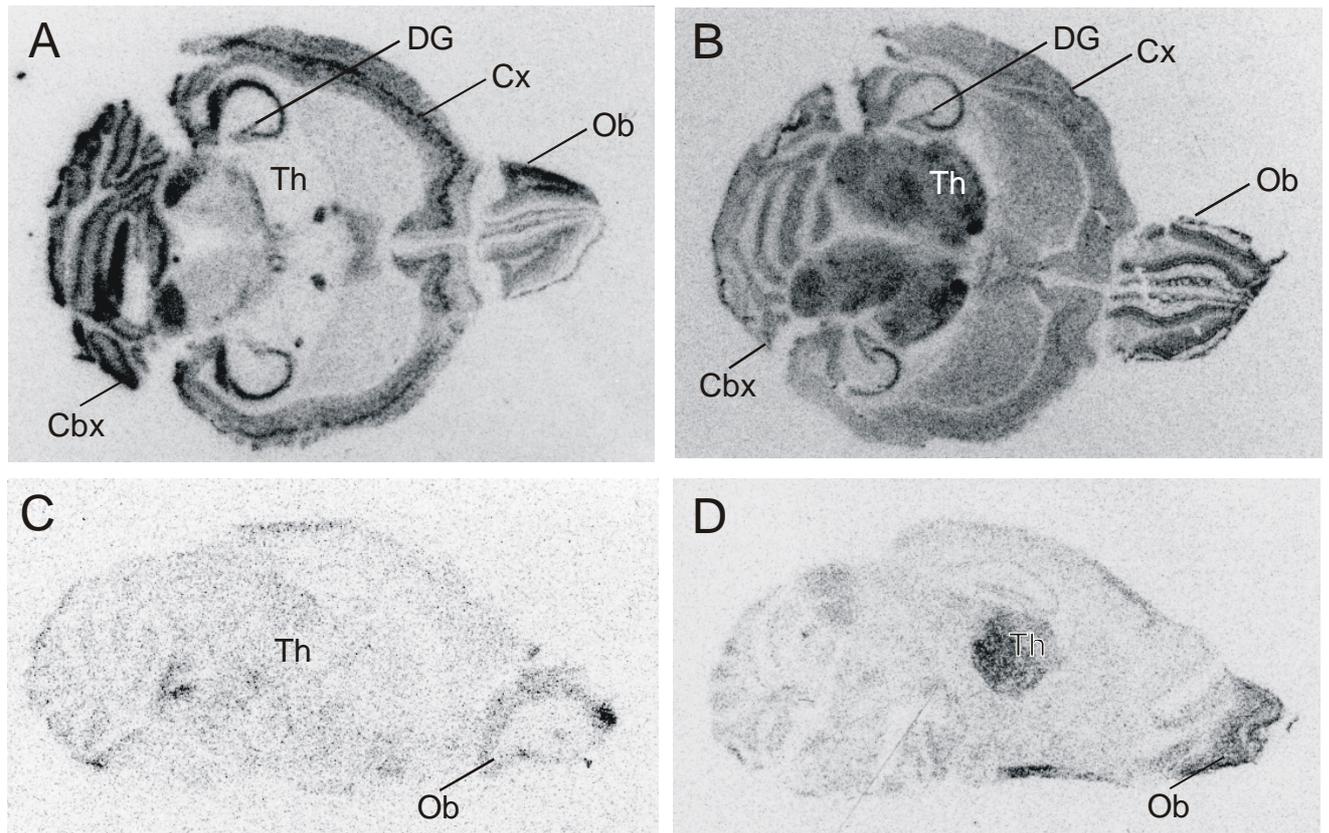


Abbildung 3.6 Verteilung der mRNA von HCN Kanälen im ZNS. Autoradiographische Filmbilder von horizontalen (A und B) und sagittalen (C und D) Gehirnschnitten, hybridisiert mit Antisense Riboproben spezifisch für mHCN1 (A), mHCN2 (B), mHCN3 (C) und mHCN4 (D). DG, Gyrus dentatus; Cx, Cortex cerebri; Ob, Bulbus olfactorius; Th, Thalamus; Cbx, Cortex cerebelli.

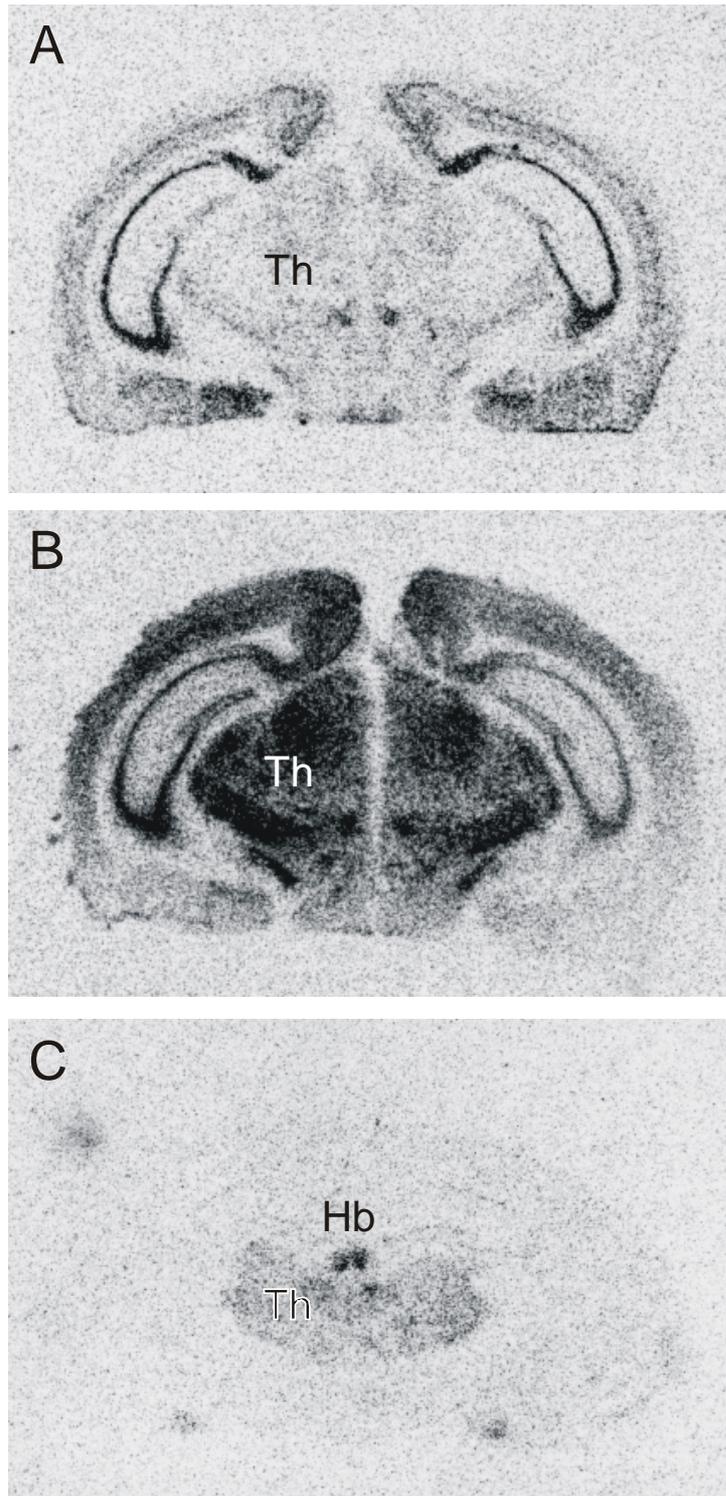


Abbildung 3.7 Verteilung von HCN1-3 Kanal-Transkripten im Gehirn der Maus. Frontale Schnitte markiert mit cRNA Sonden spezifisch für mHCN1 (A), mHCN2 (B), mHCN4 (C). Th, Thalamus; Hb, Habenulae.

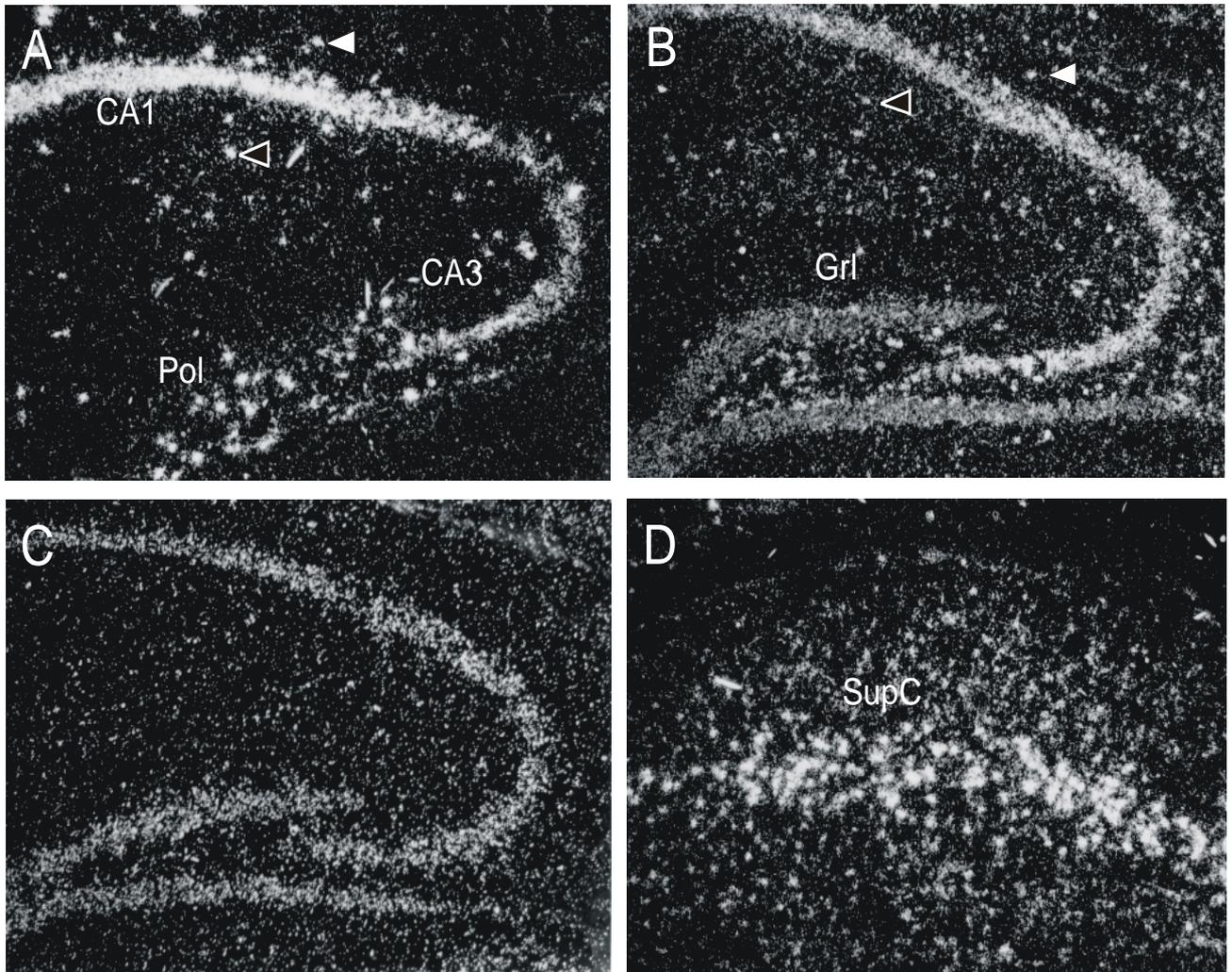


Abbildung 3.8 Mikroskopische Aufnahmen im Dunkelfeld, welche die Lokalisation von HCN Transkripten auf zellulärer Ebene im Hippocampus und Colliculus superior zeigen. (A-C), Sagittale Schnitte durch den Hippocampus, hybridisiert mit cRNA Sonden gegen mHCN1 (A), mHCN2 (B) und mHCN4 (C). Die Regionen CA1 und 3 sind markiert. Pol, polymorphe Schicht im Gyrus dentatus; Lmo, Stratum lacunosum-moleculare. Die markierten Neuronen im Stratum oriens (geschlossene Pfeile) und Stratum radiatum (offene Pfeile) reichern deutlich Silberkörner an. (D), Sagittaler Schnitt durch den Colliculus superior, markiert mit einer Sonde gegen mHCN2. Vergrößerung 1:100.

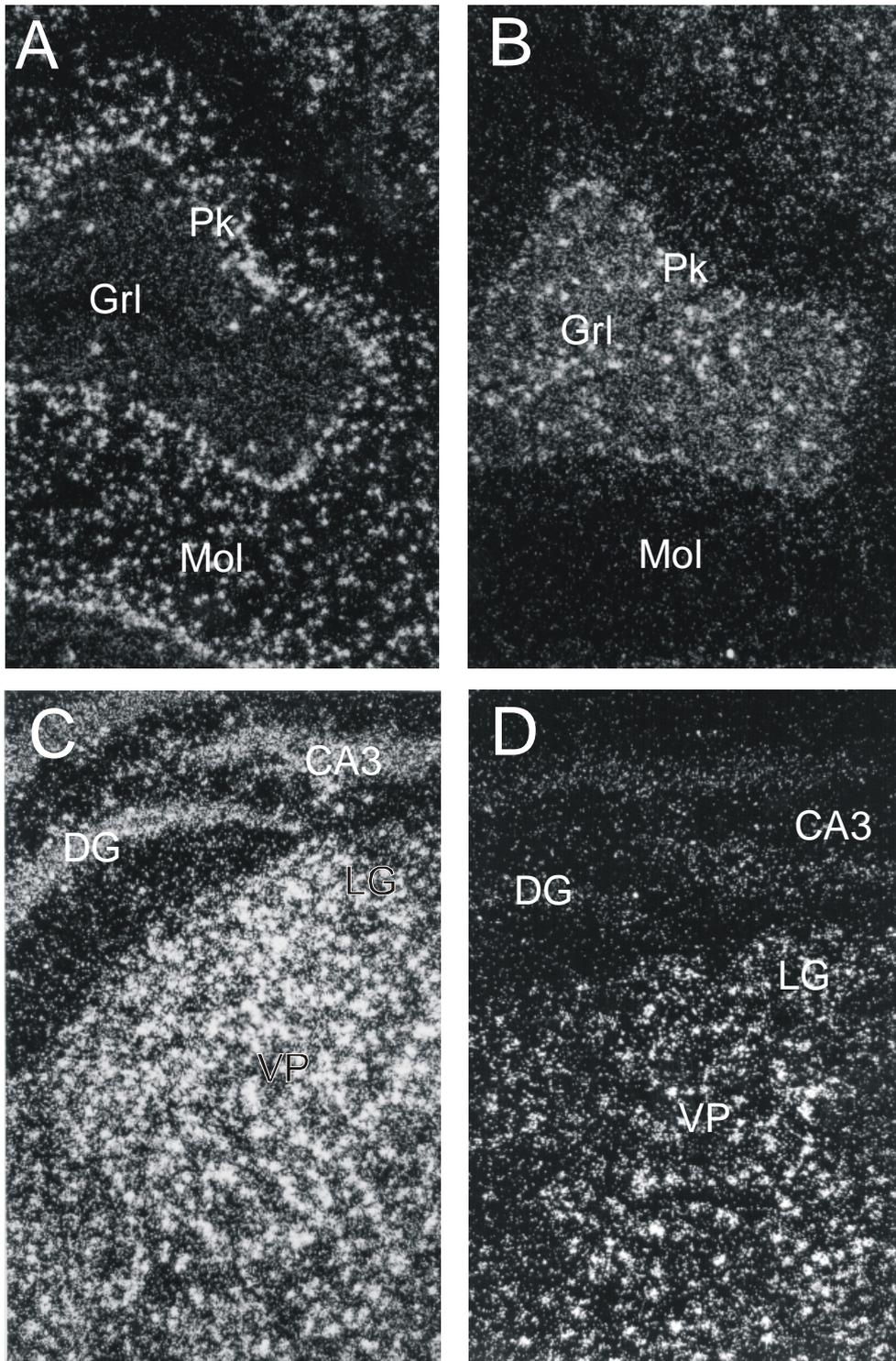


Abbildung 3.9 Expression von HCN Kanal mRNA im Kleinhirn und Thalamus. (A,B), Sagittale Schnitte durch das Kleinhirn, hybridisiert mit Sonden gegen mHCN1 (A) und mHCN2 (B). Mol, Stratum moleculare; Grl, Stratum granulare; Pk, Purkinje-Zellen. (C,D), Sagittale Schnitte, die Silberkörnchen auf Neuronen des Thalamus zeigen; Sonden gegen HCN2 (C) und 4(D) wurden verwendet. DG, Gyrus dentatus; CA3, CA3 Feld des Ammonshorns; VP, Nucleus ventroposterior; LG, Nucleus geniculatus lateralis.

Ergebnisse

Gehirnregion	mHCN1	mHCN2	mHCN3	mHCN4
Bulbus olfactorius	++	++	+	++
Cortex cerebri				
Neocortex	+++	++	+/-	+/-
Cortex piriformis	++	++	+/-	+
Hippocampus				
Pyramidenneurone in Region:				
CA1	+++	++	+/-	+
CA2	+	++	+/-	+
CA3	++	++	+/-	+
Granuläre Schicht Gyrus dentatus	-	+	+/-	+
Polymorphe Schicht Gyrus dentatus	++	+	+/-	-
Thalamus				
Umschaltkerne	+/-	+++	+/-	++
Intralaminäre Kerne	+/-	++	+/-	++
Putamen	-	++	+/-	+/-
Amygdala	+/-	++	+/-	+
Hypothalamus	+/-	+	+/-	+/-
Colliculus superior	+++	++	+/-	+/-
Colliculus inferior	+	++	+/-	+
Cerebellum				
Stratum moleculare	+++	-	+/-	+/-
Stratum granulare	++	+	+/-	+/-
Purkinjezellen	+	++	+/-	+/-
Hirnstamm	-	+++	+/-	+/-

Tabelle 3.2 Verteilung der HCN-Kanal mRNAs im Gehirn der Maus. Die Signale von autoradiographischen Filmen und die Silberkörner in Photoemulsion gedippter Schnitte wurden wie folgt quantifiziert:

+++; viel; ++, mittel; +, wenig; -, kein Signal.

3.4.2 Expression von HCN-Kanälen im Herz

Um die Expression von HCN Kanälen im Reizleitungssystem zu ermitteln, sollte das primäre Schrittmacherzentrum, also der Sinusknoten, aus den Herzen von Mäusen isoliert werden. Zunächst musste die in 2.13 vorgestellte Methode zur Mikrodissektion des Materials etabliert werden, da bis dato keine Technik zur Isolation des Sinusknotens bei der Maus bekannt war. Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-gefärbte Serienschnitte aus mehreren Herzen wurden hierzu analysiert; der Sinusknoten stellte sich als etwa 300 µm breite, bohnenförmige Struktur in der Wand der Vena cava superior am Übergang zum rechten Vorhof dar (Abbildung 3.10A). Er wird von der Sinusknotenarterie durchzogen, weist eine höhere Zelldichte, weniger Querstreifung und eine andere Kern/Zytoplasma-Relation als das Myokard auf, wodurch er im Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitt heller als das umgebende Gewebe wirkt.

Ergebnisse

Die Hybridisierung der Sonde für HCN4 war im Sinusknoten sehr stark (Abbildung 3.10C). HCN4 ist hier der dominante Schrittmacherkanal; die Silberkörnchen in der autoradiographischen Emulsion sind bei Hybridisierung mit einer HCN4 Sonde im Sinusknoten gegenüber der Vorhofmuskulatur wenigstens um den Faktor 10 angereichert. HCN2 ist im Sinusknoten ebenfalls deutlich exprimiert, allerdings auf etwa gleichem Niveau wie in der Arbeitsmuskulatur von Vorhöfen und Ventrikel (Abbildung 3.10D).

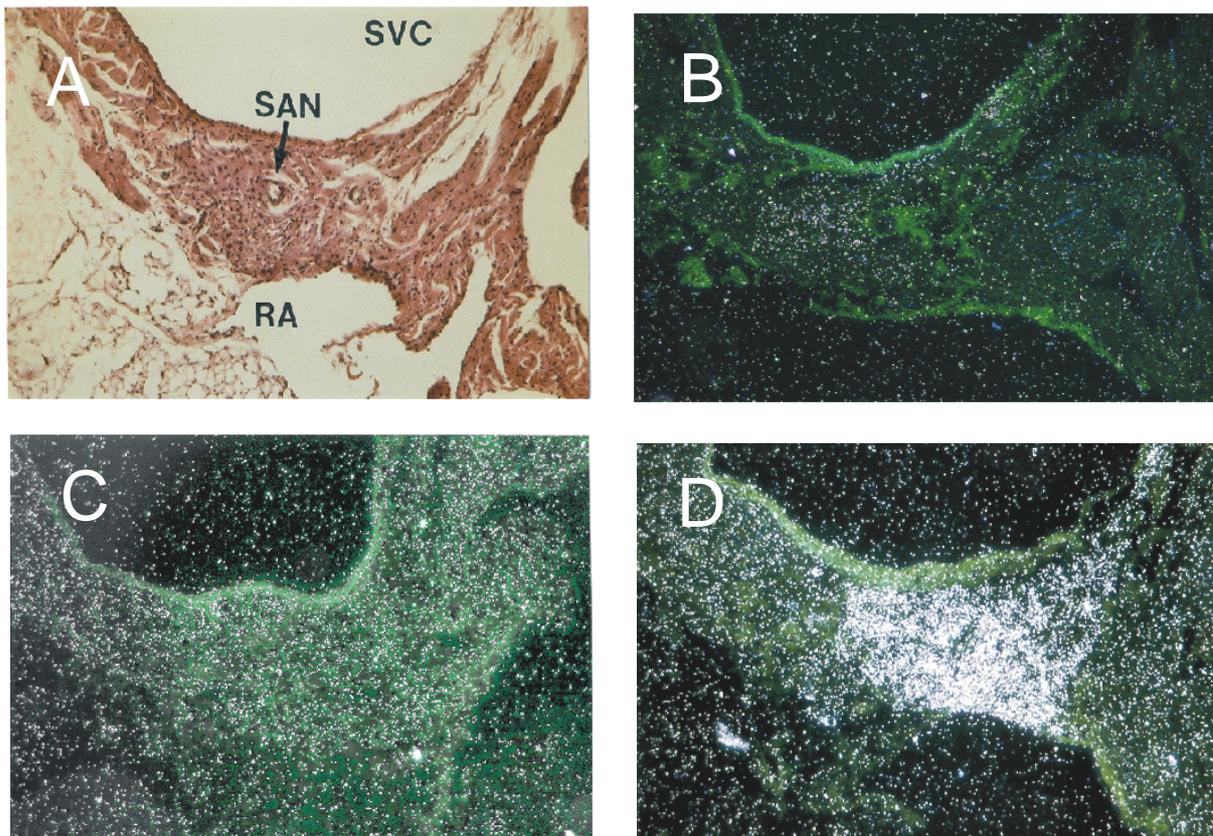


Abbildung 3.10 (A), H.E.gefärbter Schnitt durch den Sinusknoten einer Maus. SAN, Sinusknotenarterie; RA, Rechter Vorhof; SVC, Vena cava superior. Der Sinusknoten entspricht dem Areal um die Sinusknotenarterie herum. (B,C,D), In-situ-Hybridisierungen gegen HCN1,2,4. Die Silberkörnchen in (D) markieren die massive Expression von HCN4. Die Schnitte in (B, C, D) grenzen direkt an (A) an. Vergrößerung 1:400.

Auch HCN4-Transkripte waren im Myokard detektierbar, dort etwas schwächer als HCN2 (nicht abgebildet).

Der im zentralen und peripheren Nervensystem stark exprimierte HCN1-Kanal (Abbildung 3.6A, 3.7A, 3.9A) fand sich in Spuren im murinen Sinusknoten (Abbildung 3.10B). HCN3 zeigte keine Hybridisierungssignale im Sinusknoten oder Arbeitsmuskulatur von Vorhöfen bzw. Ventrikeln (nicht abgebildet).

In der Media der Coronararterien, also im glatten Muskel, waren keine Transkripte der verschiedenen Subspezies nachweisbar.

3.4.3 Verteilung von HCN Kanälen in der Retina

Die Antisenseprobe von HCN1 ergab das deutlichste Signal in der Retina der Maus. In der exponierten Filmemulsion lag nur bei diesem Subtyp ein dichtes Band von Silberkörnern über der äußeren Körnerschicht der Netzhaut, die die Zellkörper der Stäbchen- und Zapfenzellen (Photorezeptoren) enthält. HCN1 war aber auch in der inneren Körnerschicht (bipolare Interneurone) und der Ganglienzellschicht (Ganglienzellen, aus denen der Nervus opticus hervorgeht) vertreten (Abbildung 3.11A).

HCN2 und 3-Transkripte fanden sich in innerer Körnerschicht und Ganglienzellschicht (Abbildung 3.11B,C); HCN4 ist nach den Ergebnissen der Autoradiographie praktisch nicht in der Retina vorhanden (Abbildung 3.11D).

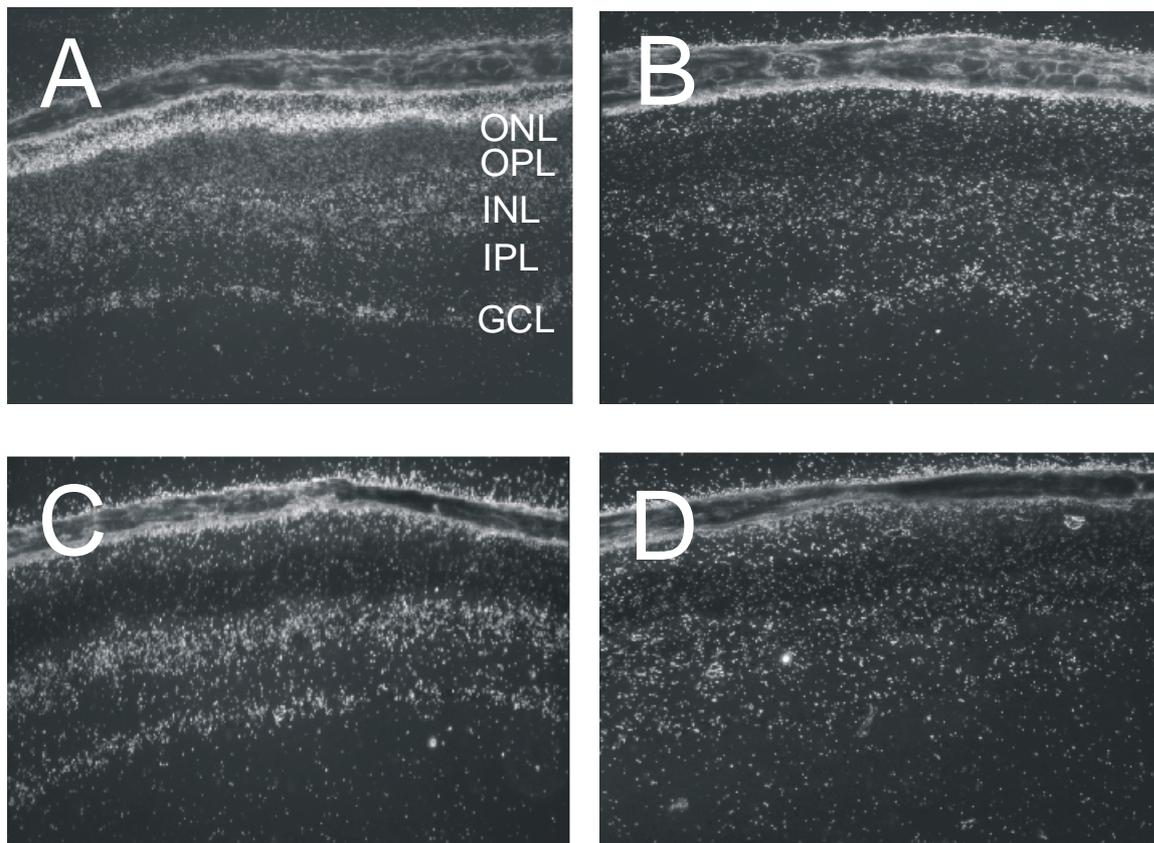


Abbildung 3.11 In-situ-Hybridisierung von Retina der Maus mit den Sonden für HCN1 (A), HCN2 (B), HCN3 (C) und HCN4 (D). Mikroskopische Dunkelfeldaufnahmen, mit H.E. gegengefärbt. ONL, INL: äußere bzw. innere Körnerschicht; OPL, IPL: äußere und innere Netzsicht; GCL, Ganglienzellschicht.

3.4.4 Expression von HCN Kanälen im Spinalganglion

Die Neuronen im Spinalganglion lassen sich in große, somatoafferente A-Zellen (die Impulse der epikritischen Sensibilität leiten) und kleinere D-Zellen (die Schmerzreize und Sensationen aus dem Intestinum übermitteln) unterteilen.

In-situ Hybridisierung mit cRNA-Sonden gegen HCN1 und 2 ergab in den Nervenzellen im Spinalganglion deutliche Signale (Abbildung 3.12B,C). Sowohl über den großen wie auch über den kleineren Neuronen lagen Silberkörner, HCN1 und 2 sind also in beiden Zellpopulationen vertreten. In den Mantelzellen, welche die Neuronen umhüllen und für deren Stoffaustausch mit den Kapillaren sorgen, fand keine Hybridisierung mit den radioaktiv markierten HCN Sonden statt.

HCN 3 und 4-Transkripte (Abbildung 3.12D) waren in den Neuronen des Spinalganglions nicht detektierbar.

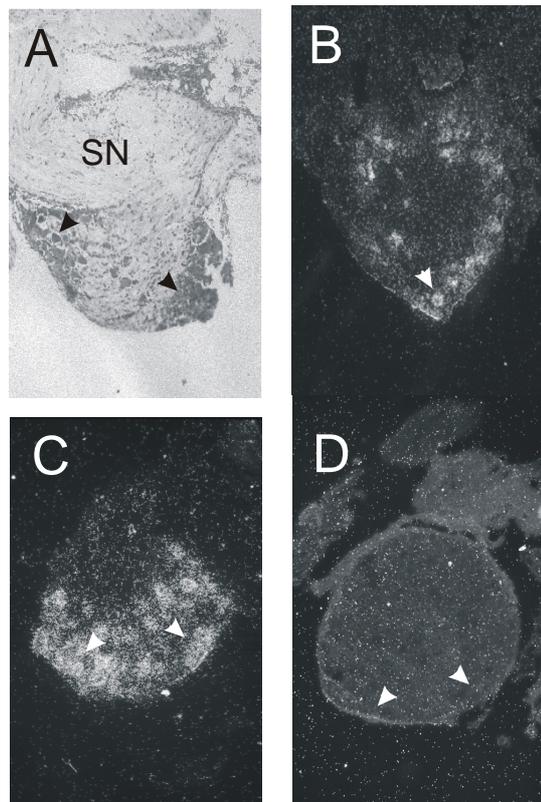


Abbildung 3.12 In-situ Hybridisierung an lumbalen Spinalganglien der Maus.(A), Hämatoxylin-Eosin gefärbtes Präparat eines murinen lumbalen Spinalganglions (Hellfeld). (B,C,D), In-situ-Hybridisierung gegen HCN1 (B), HCN2 (C) und HCN4 (D). Die Schnitte sind mit H.E. gegengefärbt und im Dunkelfeld bei einer Vergrößerung von 400 zu 1 fotografiert. SN, Spinalwurzel; Die Pfeile kennzeichnen einzelne Neurone.

3.5 Immunologische Detektion von HCN Kanalproteinen

Um die HCN-Kanäle HCN2 und 4 auch auf Ebene der Proteine nachweisen zu können, wurden die polyklonalen Antikörper pHCN2 und pHCN4 aus Immunsera von Kaninchen aufgereinigt. Die Antikörper waren gegen Epitope im zwischen den Kanälen wenig homologen C-Terminus der Proteine erzeugt worden (2.15.1). Zunächst sollten HCN2 und 4 in HEK293-Zellen exprimiert (2.14) und die Kanalproteine über Western-Blots (2.15.5) analysiert werden.

3.5.1 Konstruktion einer Chimäre aus mHCN4 und hHCN4 (ChimHCN4)

Die cDNA von mHCN2 lag bereits als „full-length“ Klon im Expressionsvektor pcDNA3 (2.2) vor (Ludwig et al, 1998), von HCN4 existierte dagegen kein solches Konstrukt. Da aber die komplette cDNA von humanem hHCN4 sowie der in 3.2 charakterisierte Carboxyterminus von mHCN4 vorhanden war, konnte eine Chimäre (benannt nach dem mythologischen Wesen, das aus Teilen verschiedener Tiere besteht) aus den HCN4 Kanälen beider Spezies zur Expression konstruiert werden (Abbildung 3.13).

Der HCN4 Kanal von Maus und Mensch besitzt „in frame“ an korrespondierender Stelle eine Avr II Schnittstelle. Daher wurde ein 3,0 kb langes Stück mit Hind III und Avr II aus einem hHCN4/pcDNA3-Konstrukt geschnitten. Mittels PCR (2.8) mit den Primern MOO13F, MOO14R (Sequenzen im Anhang), die Schnittstellen für Avr II und Xho I enthielten und das Stopcodon am C-terminalen Ende entfernten, wurde ein 650 bp langes Fragment aus dem Carboxyterminus von mHCN4 amplifiziert. Beide Fragmente wurden in einen Hind III und Xho I geschnittenen pcDNA 3.1-Myc Expressionsvektor (2.2) ligiert und das Konstrukt auf beiden Strängen sequenziert. Aufgrund des Myc-Tags konnte das rekombinante Protein mit monoklonalem Anti-Myc-Antikörper wie auch dem entsprechenden Peptidantikörper pHCN4 (2.15.1) detektiert werden.

Ergebnisse

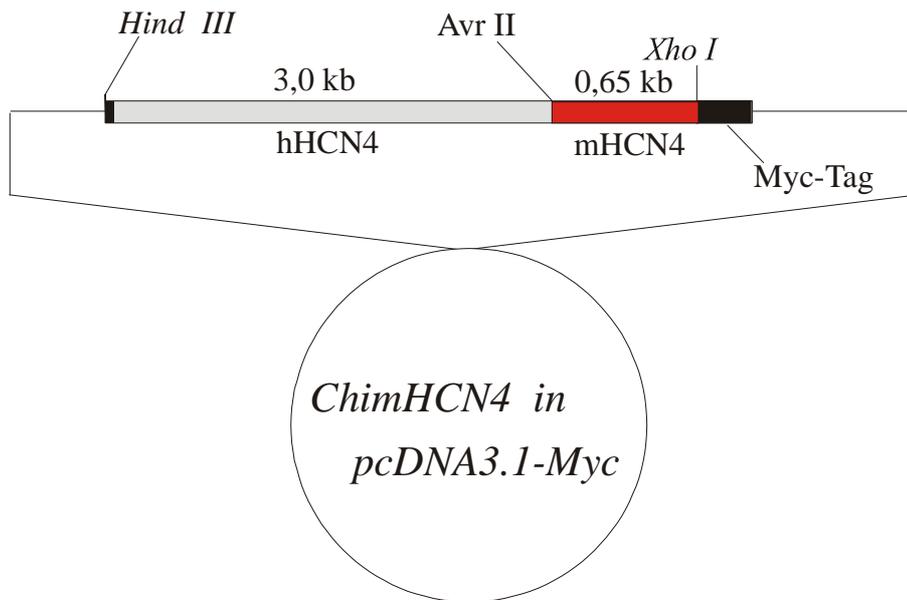


Abbildung 3.13 Schema des chimären Konstrukts aus humanem und murinem HCN4 in pcDNA 3.1-Myc. Hind III, Avr II, Xho I markieren die Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme. Kb:Kilobasen

3.5.2 Expression und Detektion von HCN2 und HCN4

Die beiden Konstrukte wurden in HEK 293 Zellen exprimiert (2.14). Aus den Zellen von jeweils drei 175 cm² Zellkulturflaschen wurde in mehreren Ansätzen durch differentielle Ultrazentrifugation die Mikrosomenfraktion abgetrennt (2.15.2). Die Antikörper pHCN2 und pHCN4, die im Carboxyterminus der Proteine binden, wurden wie unter 2.15.1 beschrieben an einer Peptid-Sepharosesäule aufgereinigt. Die Membranproteine wurden mittels Western-Blots (2.15.5) detektiert, Abbildung 3.14 zeigt die Ergebnisse.

Für heterolog exprimierten mHCN2 ergab sich eine Bande bei 103 kDa (3.14B), in den nicht transfizierten Leerzellen erkannte der Antikörper pHCN2 kein Signal (3.13A). Das gemessene Molekulargewicht liegt etwa 10 kDa über dem aus der cDNA-Sequenz errechneten Wert, vermutlich durch posttranslationale Modifikation, etwa N-Glykosylierung hervorgerufen. Alle HCN-Kanäle besitzen eine konservierte, potentielle N-Glykosylierungsstelle im extrazellulären Loop zwischen Transmembransegment 5 und der Pore. Sowohl der monoklonale Anti-Myc (3.14C) wie auch der pHCN4 Antikörper (3.15C) erkannten im Westernblot die ChimHCN4-Chimäre als Bande von 158 kDa. Dieses Molekulargewicht war wiederum etwas größer als der berechnete Wert.

Ergebnisse

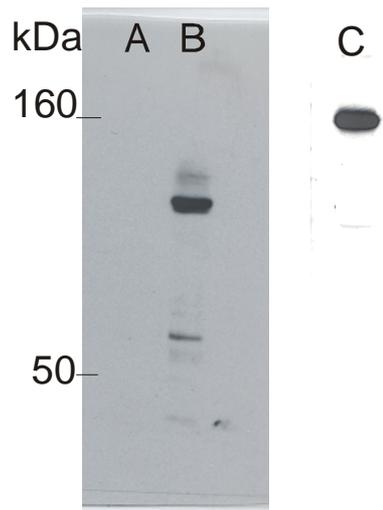


Abbildung 3.14 Westernblots mit HCN Kanalproteinen. (B), 10 μ g Mikrosomenfraktion aus mit hHCN2/pCDNA3 transfizierten HEK293 Zellen. (A), 10 μ g Mikrosomen aus unbehandelten HEK Zellen. (C), Detektion von 10 μ g der ChimHCN4 Chimäre. Primärer Antikörper jeweils 1/300 verdünnt; detektiert mittels ECL-System (Belichtungszeit 30 s). KDa: Kilodalton

Nachdem die Antikörper pHCN2 und 4 etabliert waren, sollten HCN Kanalproteine auch aus Mikrosomenpräparationen von Maus-Gehirn nachgewiesen werden, wie in Abbildung 3.15 gezeigt.

Der Antikörper gegen mHCN2 erkannte im Gehirn eine Doppelbande von 103 und 114 kDa (Abbildung 3.15B), der pHCN4 Antikörper allenfalls eine sehr schwache Bande bei der zu erwartenden Größe (Abbildung 3.15D) von 158 kDa, was an der sehr selektiven Expression des HCN4 Kanals im Gehirn (vorwiegend im Thalamus, Abbildung 3.6D) liegen dürfte.

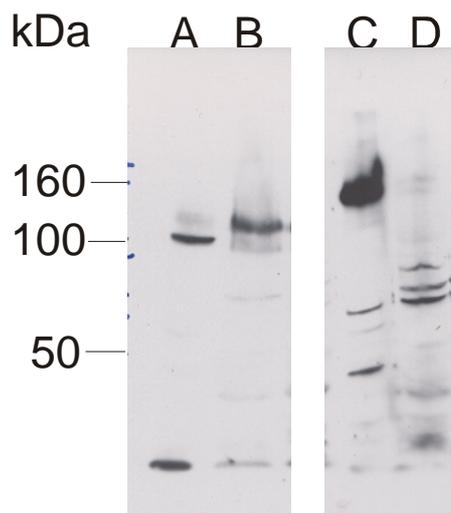


Abbildung 3.15 Immunologische Detektion von HCN2 und 4 im murinen Gehirn. (A), 10 μ g Mikrosomen aus HEK293/HCN2. (B, D), 100 μ g Membranenpräparation aus Mausgehirn, Nachweis von HCN2 (B) und 4 (D). (C), 10 μ g Mikrosomenfraktion von mit ChimHCN4 transfizierten HEK 293-Zellen. Antikörperverdünnung 1/300; ECL-System mit 15 s Belichtungszeit. KDa: Kilodalton.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde erstmals systematisch die Expression von HCN Kanälen im Nervensystem und Herz untersucht. Die Gewebsverteilung der einzelnen HCN-Subtypen lässt Rückschlüsse auf die Beziehung zwischen nativem I_h -Strom und den klonierten HCN-Kanälen zu. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die verschiedenen HCN-Kanaltypen in Gehirn, Herz, Retina und peripherem Nervensystem durch In-situ-Hybridisierung, Northern- und Dot-Blot-Analyse sowie Western-Blot nachgewiesen.

4.1 HCN Kanäle im zentralen und peripheren Nervensystem

Die Ergebnisse der In-situ-Hybridisierungsexperimente zeigen, dass die vier HCN-Kanal Subtypen in zentralem und peripherem Nervensystem exprimiert werden und die Kanäle sehr unterschiedliche Verteilungsmuster in diesen Geweben aufweisen. Transkripte wenigstens eines der Gene finden sich in allen Gehirnregionen, in denen nativer I_h beschrieben worden ist.

Ein besonders gut erforschtes Areal ist der Thalamus; dort wurde die Funktion von I_h als Generator von rhythmischen Oszillationen ausgiebig charakterisiert. Speziell ist I_h im Nucleus geniculatus lateralis (Pape und McCormick, 1989; McCormick und Pape, 1990) und Nucleus ventroposterior (Budde et al, 1997) des Thalamus gemessen worden; diese beiden spezifischen Thalamuskern zeigen eine starke Expression von HCN2 und HCN4 (Abbildung 3.9, Tabelle 3.2). Eine mögliche Rolle für I_h bei Oszillationen von Neuronen im Stratum oriens des Hippocampus ist 1996 von Maccaferri und McBain postuliert worden; diese Neuronen exprimieren hohe Level von HCN1 und HCN2 (Abbildung 3.8).

I_h ist außerdem in einer Vielzahl anderer Gehirnstrukturen beobachtet worden, einschließlich des Cortex cerebri (Solomon und Nerbonne, 1993; Budde et al, 1994), der CA1 Region des Hippocampus (Maccaferri et al, 1993), verschiedenen Kerngebieten im Hirnstamm (Travagli und Gillis, 1994; Bayliss et al, 1994; Rekling et al, 1996; Khakh und Henderson, 1998) und den Purkinje-Zellen des Kleinhirns (Chang et al, 1993). In diesen ganzen Regionen fand sich vorherrschend eine Expression von HCN2 mRNA; einige Regionen, wie der Cortex und Hippocampus, zeigten auch starkes Vorkommen von HCN1 Transkripten (Tabelle 3.2).

In den Photorezeptoren der Retina wurde I_h schon vor längerem identifiziert (Fain et al, 1978), hier ist HCN1 deutlich exprimiert, während HCN2 und HCN3 in der Retina nur in Ganglienzellen und Interneuronen (Abbildung 3.11) vorkommen.

Dass HCN-Kanäle in so weiten Anteilen des ZNS exprimiert werden, stützt die Annahme, dass die Kanäle nicht nur zur Rhythmogenese in neuronalen Netzen beitragen, sondern auch einen Einfluss auf die synaptische Übertragung und das Membranpotential haben (Pape, 1996; Lüthi und McCormick, 1998; Tabelle 3.2).

Es ist bekannt, dass die neuronalen I_h Ströme in ihrer Aktivierungskinetik und Sensitivität auf Cyklonukleotide variieren. Besonders gut untersucht sind die Aktivierungskinetiken, zum Beispiel sind an Neuronen der primären Sehrinde oder im Spinalganglion zwei unterschiedliche kinetische Komponenten mit Aktivierungszeitkonstanten im Bereich von einigen hundert Millisekunden beziehungsweise einigen Sekunden beschrieben worden (Solomon und Nerbonne, 1993; Wang et al, 1997). Es gibt zwei denkbare Interpretationen dieser Beobachtungen: Zum einen könnte nur eine Population von gleichen Kanälen mit einem komplexen Aktivierungsmuster vorliegen, zum anderen könnten eine langsame und eine schnelle Spezies von Kanälen in der selben Zelle den zwei Komponenten von I_h zugrunde liegen. Die heterolog exprimierten HCN Kanal-Subtypen unterscheiden sich erheblich in ihrer Aktivierungskinetik. Bei einem Membranpotential von -110 mV aktiviert HCN1 mit einem τ von etwa 200 ms am schnellsten (Santoro et al, 1998), gefolgt von HCN2 (τ von 500 ms) und HCN4 (τ liegt hier etwa bei 20s; Ludwig et al, 1999). Sowohl die Neuronen in der primären Sehrinde wie auch im Spinalganglion exprimieren stark HCN1 und HCN2 (Tabelle 3.2; Abbildung 3.12). Diese beiden Kanäle könnten also der langsamen und schnellen Komponente von I_h in diesen Nervenzellen entsprechen.

Überraschenderweise finden sich im Nucleus ventroposterior und geniculatus lateralis des Thalamus sowohl Transkripte von HCN2 und HCN4 (Abbildung 3.9), obwohl sich die Aktivierung von nativem I_h , aus diesen Kerngebieten, gut mit nur einer Zeitkonstanten τ beschreiben lässt (McCormick und Pape, 1990). Diese Diskrepanz lässt sich erklären, wenn man berücksichtigt, dass durch die In-situ-Hybridisierung nur mRNA Transkripte im Zytotplasma der Zellen nachgewiesen werden können, wohingegen das translatierte Kanalprotein subzellulär anders lokalisiert sein könnte. Es wurde gezeigt, dass das HCN1 Protein in den Dendriten von Pyramidenzellen und den Axonen von Korbzellen im Kleinhirn lokalisiert ist (Santoro et al, 1997). Wenn eine Nervenzelle also verschiedene HCN Transkripte koexprimiert, könnten sich die entsprechenden Proteine in unterschiedlichen Kompartimenten befinden, z.B im Axon, Soma oder dem proximalen/distalen

Dendritenbaum. Daher ist es nicht auszuschließen, dass aufgrund technischer Probleme („space-clamp errors“) Ganzzell-Ableitungen von intakten Neuronen die Eigenschaften von I_h in distalen Kompartimenten nicht korrekt erfassen. Weiterführende Studien könnten hier Aufschluß geben, zum Beispiel Immunfluoreszenzuntersuchungen in Kombination mit confokaler Lasermikroskopie, um die subzelluläre Lokalisation der Kanalproteine darzustellen.

Die HCN-Kanäle bilden wahrscheinlich Tetramere aus. Da sich zum Beispiel in Pyramidenneuronen des Hippocampus HCN1, HCN2 und HCN4 (Abbildung 3.8) oder in Purkinjezellen HCN1 und HCN2 (Abbildung 3.9) findet, wäre es denkbar, dass sich heteromere Kanäle aus verschiedenen Subtypen bilden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen nicht für diese Hypothese. Die Expressionsmuster der verschiedenen Transkripte unterscheiden sich erheblich (Tabelle 3.2; Abbildung 3.6 und 3.7). In den Photorezeptoren der Retina war beispielsweise nur HCN1 exprimiert, HCN2 und HCN3 dagegen in der inneren Körnerschicht und Ganglienzellschicht. Sogar in Gehirnregionen mit überlappender Expression ließen sich Neuronen identifizieren, die nur ein einziges HCN Transkript aufwiesen; zum Beispiel fand sich in den Korbzellen im Stratum moleculare des Kleinhirns nur HCN1, aber nicht HCN2. Zur Klärung der Frage, ob HCN-Kanäle homo- oder heteromere Proteinkomplexe bilden, sind weitere Untersuchungen an heterolog exprimierten Kanälen erforderlich – sowohl genaue elektrophysiologische Charakterisierung von coexprimierten Kanälen wie auch Coimmunopräzipitation; Immunfluoreszenzexperimente in Verbindung mit confokaler Lasermikroskopie könnten die Co-Lokalisation der Subtypen in der nativen Zelle untersuchen.

4.2 HCN Kanäle im Herzen

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die molekulare Identität der Kanäle aufzuklären, die I_h im Herzen zugrundeliegen, insbesondere im Sinusknoten, in dem der Schrittmacherstrom entscheidend zur rhythmischen Erregungsbildung und damit zur spontanen Herzaktion beiträgt. Mit Northern- und Dot-Blot-Studien konnten HCN2 und HCN4 im Herzen nachgewiesen werden (Abbildungen 3.1, 3.3, 3.4).

In-situ-Hybridisierung am Sinusknoten der Maus ergab eine prädominante Expression von HCN4. Deutlich schwächer ließen sich HCN2 Transkripte und Spuren von HCN1 mRNA

detektieren (Abbildung 3.10). Diese Expressionsdaten weisen darauf hin, dass I_h im Sinusknoten möglicherweise hauptsächlich durch HCN4 vermittelt wird.

In der Arbeitsmuskulatur von Vorhöfen und Ventrikeln war ebenfalls HCN2 und HCN4 exprimiert. Diese Ergebnisse decken sich mit früheren Studien, die I_h in Cardiomyocyten aus Ventrikel (Yu et al, 1995; Baker et al, 1997; Hoppe et al, 1998) und Vorhöfen (Thuringer et al, 1992; Porciatti et al, 1997) und in verschiedenen Abschnitten des Reizleitungssystems (DiFrancesco, 1993) nachgewiesen haben.

I_h hat in der Ventrikelmuskulatur einen $V_{1/2}$ -Wert von -95 bis -135 mV, der den Werten für heterolog exprimierten HCN2 (-103 mV) und HCN4 (-109 mV) weitgehend entspricht (Tabelle 1.2). Im Gegensatz dazu weist I_h im Sinusknoten deutlich positivere Werte für $V_{1/2}$ zwischen -65 und -90 mV auf. Wenn HCN4, eventuell im Zusammenspiel mit HCN2 beziehungsweise HCN1, tatsächlich den nativen I_h Strom im Sinusknoten trägt, wie lässt sich dann diese Diskrepanz erklären?

Es fällt auf, dass nach Patch-Exzision aus Sinusknotenzellen $V_{1/2}$ für die I_h Aktivierung von -75 mV auf -125 mV ansteigt (DiFrancesco und Tortora, 1991; DiFrancesco und Mangoni, 1994). Die Ursache für dieses Phänomen ist nicht klar. Möglicherweise spielen zytoplasmatische Faktoren, wie cAMP oder Kalzium (Hagiwara und Irisawa, 1989), eine Rolle. Weiterhin muß an Phosphorylierung (Accili et al, 1997) oder Interaktion der Kanalproteine mit dem Cytoskelett gedacht werden. Diese Faktoren sind möglicherweise im heterologen Expressionssystem nicht gegeben und könnten so die Diskrepanz zu den elektrophysiologischen Messungen an nativen Zellen erklären. Auch messtechnische Unterschiede wie die Temperatur der Präparation könnten hier eine Rolle spielen; während native Zellen meist bei 37°C gemessen werden, untersucht man zum Beispiel HEK-Zellen bei Raumtemperatur.

Wie im ZNS wurde auch in Cardiomyocyten beschrieben, dass der native I_h zwei kinetisch deutlich unterschiedliche Komponenten aufweist, mit Zeitkonstanten τ im Bereich von einigen hundert Millisekunden beziehungsweise einigen Sekunden.

Für die Zebrafischmutante *smo* wurde gezeigt, dass sie aufgrund eines reduzierten I_h Stroms eine niedrigere Herzfrequenz aufweist (Baker et al, 1997).

In *Smo* Herzzellen ist die kinetisch schnelle Komponente von I_h (Zeitkonstante ~ 300 ms) deutlich reduziert, während die langsame Komponente ($\tau \sim 2$ s) unverändert bleibt. Es lässt sich schlussfolgern, dass I_h hier durch die Aktivität zweier Kanalspezies zustande kommt, von denen nur eine durch die *smo* Mutation geschädigt ist.

Die aus der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten zur Expression der HCN Subtypen im Herzen, die elektrophysiologischen Daten und die Eigenschaften der *smo* Mutante legen die Schlussfolgerung nahe, dass HCN4 und HCN2 der langsamen beziehungsweise schnellen Komponente von I_h im Herzen zugrunde liegen.

Um diese Frage weiter zu untersuchen würde es sich, anbieten, HCN-Kanal Knock-out Maus-Modelle für die einzelnen Subtypen zu etablieren. Auch die Bedeutung, die den HCN Kanälen bei der Rhythmogenese im Herzen zukommt, ließe sich so verifizieren.

Mit den im Rahmen dieser Arbeit etablierten Techniken ließe sich auch klären, welche anderen Ionenkanäle im Sinusknoten exprimiert sind und somit einen Beitrag zur spontanen Erregungsbildung im Sinusknoten leisten könnten, so wurde dort mittels In-situ-Hybridisierung als dominanter T-Typ Kalzium-Kanal $\alpha 1G$ identifiziert (Bohn und Moosmang, unveröffentlichte Beobachtungen).

4.3 Ausblick

Das stark unterschiedliche Expressionsmuster der HCN Subtypen ist sicher wichtig für die Entwicklung von Pharmaka, die spezifisch auf die einzelnen Kanäle wirken sollen. Zukünftig könnten solche Medikamente als bradykarde Agentien eine Rolle bei der Behandlung der koronaren Herzerkrankung oder von Herzrhythmusstörungen spielen, aber auch vielleicht zur Therapie von Epilepsien, Schlafstörungen und chronischen Schmerzen beitragen. Die häufigste Nebenwirkung von I_h -Kanal blockierenden Substanzen wie Zatebradin oder Ivabradin ist die Auslösung von Sehstörungen (Lichtblitze). Subtyp-spezifische Blocker sollten solche Nebenwirkungen vermeiden helfen, zum Beispiel würde ein vorrangig gegen HCN4 als dominanten Kanal im Sinusknoten gerichtetes Präparat (Abbildung 3.10) wohl keine Wirkung auf I_h in retinalen Photorezeptoren haben (hier herrscht HCN1 vor, Abbildung 3.11), und daher keine Sehstörungen hervorrufen. Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden, zusammen mit weiterführenden Experimenten wie etwa Gene-Targeting Studien, die Basis für die Entwicklung solcher Pharmaka wie auch für ein besseres Verständnis der physiologischen Funktionen der Schrittmacherkanäle.

5 Zusammenfassung

Der I_h -Strom ist wesentlich an vielen physiologischen Vorgängen beteiligt. Er ist als molekularer Schrittmacher für die langsame diastolische Depolarisation im Herzen und damit für die spontane Herzaktion verantwortlich. Auch trägt er entscheidend zur Regulation der Herzfrequenz über sympathische oder parasympathische Stimulation bei. I_h ist Schrittmacher in neuronalen Netzen, die zum Beispiel den Schlaf-Wach-Zyklus oder die Vigilanz regeln; er spielt bei der synaptischen Übertragung eine Rolle, steuert in der Retina die regulatorische Antwort auf intensive Lichtblitze und ist im peripheren Nervensystem an der Schmerzwahrnehmung beteiligt.

Die molekulare Basis des I_h -Stroms sind die HCN-Kanäle, eine erst seit kurzem bekannte Genfamilie von Ionenkanälen mit 4 Mitgliedern. Sie werden durch Hyperpolarisation aktiviert, leiten sowohl Natrium wie auch Kalium und werden von zyklischen Nukleotiden moduliert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression der HCN-Kanäle in den Geweben untersucht, in denen I_h eine wichtige Rolle zukommt. Hierbei wurden molekularbiologische, biochemische und histologisch-anatomische Techniken verwendet, der Schwerpunkt lag auf In-situ-Hybridisierungsstudien an Geweben der Maus. Das Wissen um die Gewebsverteilung der einzelnen Kanal-Subtypen lässt Rückschlüsse auf ihre biologische Funktion zu und wird sich als wertvoll für die Entwicklung von Pharmaka erweisen, die auf die HCN-Kanäle wirken.

Der C-terminus von HCN4 der Maus wurde erstmals kloniert und charakterisiert, er weist mit dem des Menschen eine 90% Sequenzhomologie auf Aminosäureebene auf.

Dot-blot und Northern-blot Untersuchungen zeigten eine Expression von HCN2 und HCN4 in Herz und Gehirn auf.

Eine Technik zur Mikrodissektion des Sinusknotens der Maus wurde entwickelt. In-situ Hybridisierungsexperimente am Sinusknoten zeigten, dass dort eindeutig HCN4 der dominante HCN-Kanal-Subtyp ist. Auch HCN2 und Spuren von HCN1 sind im Sinusknoten exprimiert. Ob HCN4 der eigentliche „Schrittmacherkanal“ im Herzen ist, werden weiterführende Untersuchungen klären.

Zusammenfassung

Im murinen Gehirn ergab sich für jeden HCN-Subtyp ein charakteristisches Verteilungsmuster, auch auf zellulärer Ebene. Zum Beispiel dominierten in den elektrophysiologisch gut charakterisierten spezifischen Thalamuskernen HCN2 und HCN4.

In den Photorezeptoren der Retina ist HCN1 der dominante Kanaltyp, die Expression von HCN2 und HCN3 beschränkt sich auf andere Schichten der Retina.

In Neuronen im Spinalganglion der Maus finden sich nur Transkripte von HCN1 und HCN2.

Es wurden spezifische Antikörper gegen HCN2 und HCN4 hergestellt, an heterolog exprimiertem HCN-Kanälen etabliert und damit HCN Kanal-Protein im Gehirn nachgewiesen.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Zitierte Veröffentlichungen

Accili EA, Redaelli G, DiFrancesco D (1997) "Differential control of the hyperpolarization-activated current $i(f)$ by cAMP gating and phosphatase inhibition in rabbit sino-atrial myocytes" *J Physiol (London)* 500: 643-651

Baker K, Warren KS, Yellen G, and Fishman MC (1997) "Defektive `pacemaker` current (I_h) in an zebrafish mutant with a slow heart rate" *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4554-4559

Bayliss DA, Viana F, Bellingham MC and Berger AJ (1994) "Characteristics and postnatal development of a Hyperpolarization-activated inward current in rat hypoglossal motoneurons in vitro" *J Neurophysiol* 71: 119-128

Biel M, Zong X, Ludwig A, Sautter A, Hofmann F (1999) "Structure and function of cyclic nucleotide gated channels" *Annu Rev Neurosci* 19: 235-263

Biel M, Ludwig A, Zong X, Hofmann F (1999) "Hyperpolarization-activated cation channels: A multi-gene family" *Rev Physiol Biochem Pharmacol* : 165-182

Birnboim HC, Doly J (1979) "A rapid alkaline extraction method for screening recombinant plasmid" *Nucl Acids Res* 7: 1513-1518

Brown HF, Ho WK (1966) "The hyperpolarization-activated inward channel and cardiac pacemaker activity" in Morad M, Ebashi S, Trautwein W, Kurachi Y (eds) „Molecular Physiology and Pharmacology of Cardiac Ion Channels and Transporters“, Dordrecht, *Kluwer Academic Oublishers* : 17-30

Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ (1979) "How does adrenalin accelerate the heart?" *Nature* 280: 235-236

Literaturverzeichnis

Budde T, Biella G, Munsch T and Pape HC (1997) "Lack of regulation by intracellular Ca^{2+} of the hyperpolarization-activated cation current in rat thalamic neurones" *J Physiol* 503: 79-85

Budde T, White JA, and Kay AR (1994) "Hyperpolarization-activated Na^+ - K^+ current (I_h) in neocortical neurons is blocked by external proteolysis and internal TEA" *J Neurophysiol* 72: 2737-2742

Chang W, Strahlendorf JC and Strahlendorf HK (1993) "Ionic contributions to the oscillatory firing activity of rat Purkinje cells in vitro" *Brain Res* 614: 335-341

Chirgwin JM, Przybyla AE, Macdonald RJ, Rutter WJ (1979) "Isolation of biologically active RNA from sources enriched in ribonuclease" *Biochemistry* 18: 5294-5299

Choe S, Robinson R (1998) "An ingenious filter: The structural basis for ion channel selectivity" *Neuron* 20: 821-823

Clapham DE (1998) "Not so funny anymore: Pacing channels are cloned" *Neuron* 21: 5-7

Daus G, Dibner MD, Battey JF (1986) "Basic methods in molecular biology" *Elsevier*, New York

de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL (1998) "Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP" *Nature* 396: 474-477

DiFrancesco D (1989) "Muscarinic modulation of cardiac rate at low acetylcholine concentrations" *Science* 243: 669-671

DiFrancesco D, Tortora P (1991) "Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP" *Nature* 351: 145-147

DiFrancesco D (1993) "Pacemaker mechanisms in cardiac tissue" *Annu Rev Physiol* 55: 455-472

DiFrancesco D, Mangoni M (1994) "Modulation of single hyperpolarization-activated channels (I_p) by cAMP in the rabbit sinoatrial node" *J Physiol* 474: 473-482

Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) "The structure of the potassium channel: Molecular basis of K^+ conduction and selectivity" *Science* 280: 69-77

Eagle H (1959) "Amino acid metabolism cell cultures " *Science* 130: 432-437

Fain GL, Quandt BL, Gerschfeld HM (1978) " Contribution of a caesium sensitive conductance increase to the rod photoresponse" *Nature* 272: 466-469

Feinberg AP, Vogelstein B (1983) "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity" *Anal Biochem* 132: 6 – 13

Frace AM, Maruoka F, Noma A (1992) "External K^+ increases Na^+ conductances of the hyperpolarization-activated current in rabbit cardiac pacemaker cells" *Pflügers Arch* 421: 94-96

Gauss R, Seifert R, Kaupp VB (1998) "Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm" *Nature* 393: 583-587

Graham FL, van der Eb AJ (1973) "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus5 DNA" *Virology* 52:456

Graham FL, Smiley J, Russel WC, Nair R (1977) "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus Types" *J Gen Virol* 36 : 59-74

Hagiwara N, Irisawa H (1989) "Modulation by intracellular Calcium of the hyperpolarization activated inward current in rabbit single sino-atrial node cells" *J Physiol* (London) 409: 121-141

Literaturverzeichnis

Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R (1994) "Mutations in the K⁺ channel signature sequence" *Biophys J* 66: 1061-1067

Ho WK, Brown HF, Noble D (1994) "High selectivity of the I_f channels to Na⁺ and K⁺ in rabbit isolated sinoatrial node cells" *Pflügers Arch* 426: 68-74

Holmes DS, Quigley M (1981) "A rapid boiling method for preparation of bacterial plasmids" *Anal Biochem* 114: 193-197

Hoppe UC, Jansen E, Südkamp M, Beuckelmann DJ (1998) "Hyperpolarization-activated inward current in ventricular myocytes from normal and failing human hearts" *Circulation* 97: 55-65

Ingram SL, Williams JT (1996) "Modulation of the hyperpolarization-activated current (I_h) by cyclic nucleotides in guinea-pig primary afferent neurons" *J Physiol (London)* 492: 97-106

Ishii TM, Takano M, Xie LH, Noma A, Ohmori H (1999) "Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit sinoatrial node" *J Biol Chem* 274: 12835-12839

Ishiura M, Hirose S, Uchida T, Haurada Y, Suzuki Y, Okada Y (1982) "Phage particle mediated gene transfer to cultured mammalian cells" *Mol Cell Biol* 2 : 607-616

Kafatos FC, Jones CW, Efstratiadis A (1979) "Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot blot hybridization procedure" *Nucl Acid Research* 7: 1541-1552

Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM (1998) "A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1" *Science* 282 : 2275-2279

Khakh BS, Henderson G (1998) "Hyperpolarization-activated cationic currents (I_h) in neurones of the trigeminal mesencephalic nucleus of the rat" *J Physiol* 510: 695-704

Ludwig A, Flockerzi V, Hofmann F (1997) "Regional expression and cellular localisation of the alpha 1 and beta subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain" *J Neurosci* 17(4): 1339-1349

Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M (1998) "A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels" *Nature* 393: 587-591

Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M (1999) "Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics " *EMBO J* 18: 2323-2329

Ludwig A, Zong X, Hofmann F, Biel M (1999) " Structure and function of cardiac pacemaker channels" *Cell Physiol Biochem* 9: 179-186

Lüthi A, McCormick DA (1998) "H-current Properties of a neuronal and network pacemaker" *Neuron* 21: 9-12

Maccaferri G, Mangoni M, Lazzari A and DiFrancesco D (1993) "Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells" *Neurophysiol* 69: 2129-2136

Maccaferri G and McBain CJ (1996) "The hyperpolarization_activated current (I_h) and its contribution to pacemaker activity in rat CA1 hippocampal stratum oriens-alveus interneurons" *J Physiol* 497: 119-130

McCormick DA and Pape HC (1990) "Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurons" *J Physiol* 432: 291-318

McCormick DA, Bal T (1997) "Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms" *Annu Rev Neurosci* 20: 185-215

Magee JC (1998) "Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons" *J Neurosci* 18: 7613-7624

Literaturverzeichnis

Miller AG, Aldrich RW (1996) "Conversion of a delayed rectifier K⁺ channel to a voltage-gated inward rectifier K⁺ channel by three amino substitutions" *Neuron* 16:853-858

Pape HC, McCormick DA (1989) "Noradrenaline and serotonin selectively modulate thalamic burst firing by enhancing a hyperpolarization-activated cation current" *Nature* 340: 715-718

Pape HC (1996) "Queer current and pacemaker: The hyperpolarization-activated cation current in neurons" *Annu Rev Physiol* 58: 299-327

Pfeifer A, Dostmann WRG, Sausbier M, Klatt P, Ruth P, Hofmann F (1999) "cGMP-dependent protein kinases: Structure and function" *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135: 105-150

Porciatti F, Pelzmann B, Cerbai E, Schaffer P, Pino R, Bernhart L, Koidl B and Mugelli A (1997) "The pacemaker current I_f in single human atrial myocytes and the effect of β-adrenoceptor and A1-adenosine receptor stimulation" *Br J Pharmacol* 122: 963-969

Rekling JC, Champagnat J and Denavit-Saubie M (1996) "Electroresponsive properties and membrane potential trajectories of three types of inspiratory neurons in the newborn mouse brain stem in vitro" *J Neurophysiol* 75: 795-810

Saiki K, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA (1988) "A primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase" *Science* 239: 487-491

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) "Molecular cloning. A laboratory manual" *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York*

Santoro B, Grant SGN, Bartsch D, Kandel ER (1997) "Interactive cloning with the SH3 Domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to EAG and cyclic nucleotide gated channels" *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14815-14820

Santoro B, Lin DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA, Tibbs GR (1998) "Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain", *Cell* 93: 717-729

Simmons DM, Arriza JL, Swanson LW (1989) "A complete protocol for in situ hybridization of messenger RNAs in brain and other tissues with radio-labeled single-stranded RNA probes" *J Histotech* 12(3): 169-181

Singer W, Gray CM (1995) "Visual feature integration and the temporal correlation hypothesis" *Annu Rev Neurosci* 20: 185-215

Smith PL, Baukrowitz TM, Yellen G (1996) "The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel" *Nature* 379: 833-836

Solomon JS, Nerbonne JM "Two kinetically distinct components of hyperpolarization-activated current in rat superior colliculus-projecting neurons" *J Physiol* 469: 291-313

Thuringer D, Lauribe P and Escande D (1992) "A hyperpolarization-activated inward current in human myocardial cells" *J Mol Cell Cardiol* 24: 451-455

Travagli RA, Gillis RA (1994) "Hyperpolarization-activated currents I_H and I_{KIR} , in rat dorsal motor nucleus of the vagus neurons in vitro" *Neurophysiol* 71: 1308-1317

Trudeau MC, Warmke JW, Ganetzky B, Robertson GA (1995) "Herg, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family" *Science* 269: 92-95

Weber IT, Steitz TA (1987) "Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5 Å" *J Mol Biol* 198: 311-326

Widemann K, Nemeč J, Gendler SJ, Clapham DE (1998) "Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knock out mice" *Neuron* 20: 103-114

Wollmuth LP, Hille B (1992) "Ionic selectivity of I_h channels of rod photoreceptors in tiger salamanders" *J Gen Physiol* 100: 749-765

Yu H, Chang F, Cohen IS (1995) "Pacemaker current I_f in adult canine cardiac ventricular myocytes" *J Physiol* 485: 469-483

Zagotta WN, Siegelbaum SA (1996) "Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels" *Annu Rev Neurosci* 19: 235-263

6.2 Eigene Veröffentlichungen

Moosmang S, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (1999) "Differential distribution of four hyperpolarization activated cation channels in mouse brain" *Biol Chem* 380: 975-980

Ludwig A, Moosmang S, Zong X, Hofmann F, Biel M (2000) "Differential distribution of four hyperpolarization activated cation channels in mouse heart, brain and retina" *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Phar* 361(Supplement): 416

7 Anhang

7.1 Verwendete Oligonukleotide

Primer	Sequenz in 5'-3'-Richtung
MOO1F	GAGCAGATGTGTCATTGTG
MOO2R	CTAGACCATGCAGTGCACA
MOO3F*	ACTCTGCCTCGGAAGACAT
MOO4R*	TGGTACCACAGTTAAACCTGAAGGAAG
MOO5F	ATAACTCCTGGGGGAAGCAG
MOO6R	CTTCTCCTGGTACTGGCG
MOO7F*	GCCCTCAACTGCACATCTTC
MOO8R*	AGGCTGCTGCATGAGTGACA
MOO9F*	CTCAGGTGTGTTCAACAACCAG
MOO10R*	TGCAGGAGGCAGAGGCCCTGG
MOO11F*	CCTCTCTGACACTTTCTCCC
MOO12R*	GCATCTAGTCGTGGCTCCA
MOO13F	TAGGGCCTCAAGCACACA
MOO14R	GCGATCCTCGAGTAAATTAGACGGCAGTTTGGAGC

Den mit * gekennzeichneten Primern wurde jeweils am 5'-Ende eine Restriktionsschnittstelle angehängt, den Vorwärtsprimern für Bam HI (5'-cccgagGGATCC-3') und den Rückwärtsprimern für Asp 718 (5'-cgcatcGGTACC-3').

7.2 Nukleotidsequenz des Carboxyterminus von mHCN4

GCAAGAAGAACTCCATCCTCCTCCACAAGGTGCAGCACGACCTCAACTCA
GGCGTCTTCAACTACCAAGAGAACGAGATCATCCAGCAGATCGTGCGGCA
TGACCGTGAGATGGCCCACTGTGCTCACCGCGTCCAGGCTGCCGCCTCAG

CCACCCCAACCCCCACGCCTGTTATATGGACCCCGCTGATCCAGGCGCCA
CTGCAGGCTGCTGCTGCTACTACTTCGGTGGCCATAGCCCTCACACACCA
CCCCCGCCTGCCCGCCGCCATCTTCCGGCCCCCTCCCGGACCTGGGCTGG
GCAACCTTGGGGCTGGACAGACACCGAGGCACCCAAGGAGGCTGCAGTCC
TTGATCCCTTCAGCTCTGGGCTCTGCTTCACCCGCCAGCAGCCCTCACA
GGTGGACACACCGTCTTCATCCTCCTTCCACATCCAACAGCTGGCTGGAT
TCTCTGCACCTCCTGGATTGAGCCCTCTCCTGCCCTCCTCTAGCTCTTCC
CCACCTCCAGGAGCCTGCGGTTCCCCACCAGCCCCACACCCTCCACCTC
CACTGCCGCCGCCGCTCCACCCTGGGTTCCGGCCACTTTCACAAGGCGC
TGGGTGGCTCCCTGTATCCTCTGACTCCCCGCTGCTCACCCCACTGCAA
CCAGGCGCTCGCTCTCCACAGGCTGCCAGCCACCACCCCACTGCCTGG
GGCCCGAGGAGGTCTGGGACTCCTGGAGCACTTCTTGCCGCCCCACCCT
CCTCCAGGTCACCATCATCCAGCCCTGGGCAGCTGGGCCAGCCTCCTGGA
GAGTTGTCCCTAGGTCTGGCAGCTGGTCCATCAAGTACACCAGAGACACC
CCCACGGCCTGAGCGACCATCCTTCATGGCAGGGGCCTCTGGAGGGGCTT
CTCCTGTAGCCTTTACCCCCGAGGAGCCTCAGTCTCCGGGCCACAGC
CCGGGGCCCCAAGAACTTCCCGAGTGCCCCACCCCGGGCCTCTGGCTC
CCATGGTTCCTGCTCCTGCCACCTGCATCCAGCCCTCCACCTCCCCAGG
TCCCACAGCGCAGGGGCACACCACCCCTCACCCCTGGCCGCCTCACACAG
GACCTGAAGCTCATCTCAGCCTCTCAGCCAGCCCTCCCCAGGATGGGGC
ACAGACTCTCCGCAGGGCCTCGCCTCACTCCTCAGGGGAGTCGGTGGCTG
CCTTCTCACTCTACCCAGAGCTGGGGGTGGCAGTGGGAGTAGTGGGGGC
CTTGGGCCTCCTGGAAGGCCATATGGTGCCATCCAGGCCAACATGTCAC
TTTGCCTCGGAAGACATCCTCAGGTTCTTTGCCACCCCACTTTCTTTGT
TTGGGGCAAGAGCCGCCTCTTCTGGAGGGCCCCCTCTGACTACTGCTGCA
CCCCAGAGGGAACCTGGCGCTAGGTCTGAGCCAGTACGCTCCAAACTGCC
GTCTAATTTAT

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Dr. Andreas Ludwig. Er hat sich (unermüdlich!) der Aufgabe gestellt, mir molekularbiologisches Arbeiten beizubringen und stand mir mit seinem Wissen immer hilfreich zur Seite. Vielen Dank für Deine hervorragende Betreuung!

Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann danke ich für die freundliche Aufnahme an seinem Institut, sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und für alle Anregungen und Aufmunterungen. Er bringt seinen Mitarbeitern wissenschaftliches Denken bei, und natürlich kann man erst vernünftig forschen, wenn man das beherrscht.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Biel für die Themenstellung dieser Arbeit. Ohne sein langjähriges Interesse an Zyklonukleotid-abhängigen Ionenkanälen wären die HCN-Kanäle nicht kloniert worden, ergo auch diese Arbeit nicht zustande gekommen. Danke!

Besonders Frau Dr. Andrea Gerstner möchte ich für viele hilfreiche Tips in der alltäglichen Laborarbeit danken.

Herrn Priv. Doz. Dr. Norbert Klugbauer, Frau Dr. Juliane Stieber, Frau Dr. Claudia Seisenberger, Frau Dr. Verena Specht und Else Marais danke ich für fachlichen Rat und hilfreiche Diskussionsbeiträge.

Herr Georg Bohn ließ sich überreden, auch an Sinusknoten zu arbeiten, und war immer für guten Wein oder die Oper zu haben. Salut!

Unseren „TA's“, Susanne Kampf und besonders Anna Klein, danke ich für viele Tips, praktische Hilfe und das reibungslose Funktionieren des „Zweiten Stocks“.

Frau Roller gilt mein Dank für photographische Arbeiten, die sie für mich erledigt hat.

Ein Dankeschön an alle anderen Mitarbeiter des Institutes für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima, und natürlich an alle, die ich vergessen habe.