

Aus dem Institut für Neuroanatomie und C. und O. Vogt Institut für Hirnforschung
der Universität zu Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. K. Zilles

Der HCN3-Kanal im Nagergehirn: immunhistochemische Untersuchung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Julia Liersch

2005

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf

gez: Univ.- Prof. Dr. Raab

Dekan

Referent: Univ.- Prof. Dr. Zilles

Korreferent: Univ.- Prof. Dr. Gottmann

Der HCN3-Kanal im Nagergehirn: immunhistochemische Untersuchung

Zusammenfassung

Julia Liersch

C. und O. Vogt Institut für Hirnforschung und Institut für Neuroanatomie der Universität zu
Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. K. Zilles

Der HCN3-Kanal ist eines von vier Mitgliedern der HCN-Genfamilie. Die HCN-Kanäle sind sowohl spannungsabhängige als auch an zyklische Nukleotide gekoppelte Kationenkanäle und werden daher HCN (hyperpolarisation-activated cyclic nukleotid-gated cation channel) genannt. Diesen Kanälen liegt der Ionenstrom I_h zugrunde. I_h ist für Kalium und Natrium nichtselektiv, wird durch Hyperpolarisation aktiviert und ist selbst depolarisierend. Seit über 20 Jahren wird I_h elektrophysiologisch untersucht und wurde in zahlreichen Geweben gefunden. I_h spielt eine Schlüsselrolle in der Initiierung, Modulation und Feinabstimmung von Schrittmacherdepolarisationen sämtlicher physiologischer Prozesse, wie beispielsweise dem Schlagen des Herzens, der Steuerung des Schlaf-Wach-Rhythmus, dem pulsatilen Freisetzen von Releasinghormonen, der rhythmischen Kontraktion glatter Muskulatur des graviden Uterus und der Flagellabewegung des Spermiums. Aber auch in pathologischen Prozessen wie Herzrhythmusstörungen, Epilepsien und Vasospasmen kann die immunhistochemische Lokalisation der HCN-Subtypen das Verständnis der Pathophysiologie dieser Prozesse bereichern. Die genaue Distribution des HCN3-Kanals im Zentralnervensystem war bislang weitgehend unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit werden HCN3like-immunpositive Neurone im Nagerhirn nachgewiesen. Zur immunhistochemischen Darstellung wurde hierzu zunächst eine als Antigen geeignete Aminosäuresequenz des HCN3-Kanalproteins gesucht, die keine Homologien zu den anderen HCN-Kanälen aufweist. Gegen die gefundene Aminosäuresequenz des HCN3-Kanals wurden monoklonale Antikörper der Ratte gewonnen und im Rahmen dieser Arbeit in mehreren Verfahren auf ihre Spezifität für den HCN3-Kanal getestet. Der eingesetzte Antikörper detektierte HCN3l-Immunpositivität in vielen Hirnarealen, besonders im Hirnstamm, in motorischen Hirnnervenkernen, in somatosensorischen Regionen und im Hippocampus. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Lokalisation des HCN3-Kanals im Nagerhirn werden mit den Ergebnissen der Elektrophysiologie, In-Situ-Hybridisierung und einer Studie zur immunhistochemischen Lokalisation des HCN3-Kanals im Rattengehirn verglichen und diskutiert. Es besteht eine Übereinstimmung der Ergebnisse dieser Verfahren in zahlreichen Hirnarealen, so dass der HCN3-Kanal wahrscheinlich als hetero- oder homotetramerer Kanal Bestandteil eines regulativen neuronalen Systems ist. Die immunhistochemische Identifikation des HCN3-Kanals kann deshalb das Verständnis physiologischer sowie pathologischer Prozesse bereichern.

Der HCN3-Kanal im Nagergehirn: immunhistochemische Untersuchung

Jan und
meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis:	1
1 Einleitung:	3
1.1 die HCN-Kanäle.....	3
1.2 I _h durch Hyperpolarisation aktivierte Kationenströme.....	4
1.3 Klonierung der HCN-Kanäle.....	4
1.4 Molekulare Struktur der HCN-Kanäle.....	5
1.5 Elektrophysiologische Eigenschaften der HCN-Kanäle.....	7
1.6 Modulatoren der HCN-Kanäle.....	9
1.6.1 Modulation durch zyklische Nukleotide.....	9
1.6.2 Modulation durch Neurotransmitter.....	9
1.6.3 Modulation durch intrazelluläre pH-Wertveränderung.....	10
1.7 Funktionen der HCN-Kanäle.....	11
1.7.1 Funktion der HCN-Kanäle im Herzen.....	11
1.7.2 Funktion der HCN-Kanäle im ZNS.....	12
1.8 Zielsetzung der Promotionsarbeit.....	13
2 Material und Methode	14
2.1 Synthese des Immunisierungspeptids.....	14
2.2 Herstellung und Entwicklung des monoklonalen Antikörpers 6C5.....	15
2.3 Charakterisierung des Antikörpers.....	16
2.3.1 Absorptionskontrolle.....	17
2.3.2 Westernblot.....	18
2.3.3 Epitopmapping.....	19
2.3.4 Indirekte ELISA	20
2.3.5 Protokoll der ELISA	21
2.3.6 Homologiesuche	22
2.3.7 Verschiedene Spezies und Fixierungen	23
2.4 Spezifitätskontrollen der Methode.....	25
2.4.1 Reagenzienkontrolle.....	25
2.4.2 Substitutionskontrolle.....	25
2.4.3 Absorptionskontrolle.....	26
2.5 Gewebegewinnung und Präparation.....	27
2.5.1 Präparation der Nagergehirne.....	27
2.5.2 Herstellung der Schnitte.....	28
2.6 Immunhistochemische ABC-Methode.....	28
2.7 Protokoll der modifizierten immunhistochemischen ABC-Methode.....	29

Inhaltsverzeichnis

2.7.1	Verwendete Chemikalien.....	32
2.7.2	Tiere.....	33
2.8	Geräte.....	33
2.9	Herstellung der Photographien.....	33
3	Ergebnisse.....	34
3.1	Ergebnisse der Nachweisverfahren zur Spezifität des Antikörpers.....	34
3.1.1	Absorptionskontrolle.....	34
3.1.2	Westernblot.....	34
3.1.2.1	Westernblot mit Membranproteinen der Rattenretina.....	35
3.1.2.2	Westernblot mit Membranproteinen des Rattengehirns.....	36
3.1.3	Epitopmapping.....	37
3.1.4	Homologiesuche.....	39
3.1.5	Verschiedenen Spezies und Fixierungen	41
3.2	Fazit der Charakterisierung des Antikörpers	41
3.3	Ergebnisse der Spezifitätskontrollen der Methode.....	42
3.3.1	Reagenzienkontrolle.....	42
3.3.2	Substitutionskontrolle.....	42
3.3.3	Absorptionskontrolle.....	42
3.4	Immunologische Detektion des HCN3-Kanalproteins.....	42
3.5	Lichtmikroskopische Darstellung HCN3I-immunpositiver Neuron.....	50
3.5.1.	Atlasfiguren des Rattengehirns.....	51
3.5.2.	Fototeil.....	60
4	Diskussion	88
4.1	Der HCN3-Kanal im zentralen Nervensystem.....	88
4.1.1	Vergleich von immunhistochemischen und elektrophysiologischen Daten.....	88
4.1.2	Vergleich von immunhistochemischen und molekularbiologischen Daten.....	92
4.1.3.	Vergleich der immunhistochemischen Daten.....	93
4.1.3	Auswertung der Ergebnisse unterschiedlicher Methoden.....	93
4.2	Ausblick.....	97
5	Zusammenfassung.....	99
6	Literaturverzeichnis.....	100
7	Abkürzungsverzeichnis.....	106
8	Anhang.....	108

1 Einleitung

Rhythmen sind alltäglich in unserem Leben. Fast alle Wirbeltiere besitzen vernetzte neuronale und endokrine Organe, die Rhythmen erzeugen und sich periodisch wiederholende Vorgänge wie das Schlagen des Herzens, den Schlaf-Wach-Rhythmus und das pulsatile Freisetzen von Releasinghormonen steuern. Die endogenen Oszillatoren sind Neuronenverbände, die spontan und autonom rhythmisch oszillieren. Durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Ionenkanäle werden aus der rhythmischen Aktivität der einzelnen Zelle oder der mehrzelligen Netzwerke koordinierte Rhythmuskoppelungen. Im Gehirn und im Herzen werden in den rhythmogenen Neuronenverbänden Ionenströme beobachtet, die im Gegensatz zu den meisten Ionenkanälen nicht durch Depolarisation, sondern durch Hyperpolarisation aktiviert werden. Sie spielen eine Schlüsselrolle in der Initiierung, Modulation und Feinabstimmung von Schrittmacherdepolarisationen (Biel et al, 2002). Eine Gruppe von Kanälen, durch die diese sogenannten I_h -Ströme fließen, sind die HCN-Kanäle (Pape, 1996). Erst vor einigen Jahren ist es gelungen die Untereinheiten der HCN-Kanäle durch molekulares Klonen zu identifizieren.

1.1 Die HCN-Kanäle

Die HCN-Kanäle sind durch Hyperpolarisation aktivierte und an zyklische Nukleotide gekoppelte Kationenkanäle. Sie repräsentieren eine Ionenkanalfamilie, die aus den vier bisher geklonten Subtypen HCN1, HCN2, HCN3 und HCN4 besteht (Moosmang et al, 1999). Beide Eigenschaften, sowohl die Aktivierung durch Hyperpolarisation als auch die Koppelung an zyklische Nukleotide, haben eine Schlüsselfunktion. Nachdem den entdeckten Kanälen die Namen HAC für „hyperpolarisation activated cation channels“ (Ludwig et al, 1998) und BCNG für „brain cyclic nucleotide gated channels“ (Santoro et al, 1998) gegeben wurden, vereinheitlichte Clapham den Name zu HCN (**h**yperpolarisation **c**yclic **n**ucleotide gated cation channels) (Clapham, 1998). Dabei korrespondiert HCN1 mit HAC2 (BCNG-1), HCN2 mit HAC1 (BCNG-2), HCN3 korrespondiert mit HAC3 (BCNG-4) und HCN4 mit BCNG-3. Mittlerweile sind die HCN-Kanäle des Menschen molekularbiologisch charakterisiert (Seifert, 1999; Vaccari, 1999; Gill, 2004) und der Aufbau des Kanals untersucht worden. Die durch Hyperpolarisation aktivierten Kationenströme wurden in einer Vielzahl von Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems, sowie in nichtneuronalen Geweben gefunden, wie zum Beispiel im

Sinusknoten und Ventrikel des Herzens (DiFrancesco et al, 1993), in der glatten Muskulatur des lymphatischen Gewebes (McCloskey., et al., 1999), im Stratum circulare des graviden Uterus (Satoh, 1995; Okabe et al, 1999), in Spermien des Seeigels (Gauss, 1998; Roncaglia, 2002) und in bipolaren Zellen der Retina (Muller F et al, 2003)

1.2 I_h durch Hyperpolarisation aktivierte Kationenströme

Die ersten I_h -Ionenströme, die rhythmische Aktivität endogener Oszillatoren kontrollieren, wurden vor über 20 Jahren (Accili et al, 2002) im primären Schrittmacherzentrum des Herzens, dem Sinusknoten gefunden. In einem frühen Modell des Aktionspotentials wurde die Idee, der zeitliche Ablauf der Schrittmacher-Depolarisation im Herzen komme durch einen langsamen Abfall der Kaliumleitfähigkeit während der Diastole zustande, aufgenommen und der während der Depolarisation langsam abfallende Kaliumionenstrom I_{K2} genannt (Noble und Tsien, 1968). Da jedoch geschlossene Kaliumkanäle die Zellmembran nicht über die Schwelle des Aktionspotentials hinaus depolarisieren, bedurfte es zur Erklärung der schrittmachenden spontanen diastolischen Depolarisation noch eines weiteren in die Zelle einwärtsfließenden Hintergrundstroms. Der durch Hyperpolarisation aktivierte Ionenstrom wurde im Sinusknoten eines Kaninchenvorhofs gefunden (Noma und Irisawa, 1976, Brown et al 1976; Yanangihara und Irisawa 1980), war nicht nur für Kalium-, sondern auch für Natriumionen permeabel und vermittelte die durch Adrenalin hervorgerufene Beschleunigung der Schlagfrequenz des Herzens (Brown et al, 1979). Im Herzen I_f (f für funny) genannt, ersetzte er den I_{K2} -Strom (DiFrancesco und Noble, 1979; Baruscotti und DiFrancesco, 2004). Bald wurde in Neuronen des retinalen Photorezeptors ein ähnlicher durch Hyperpolarisation aktivierter, langsamer Einwärtsstrom beobachtet, der durch Caesiumsensitivität charakterisiert und I_h (h für Hyperpolarisation) genannt wurde (Attwell und Wilson 1980; Bader und Bertrand 1984; Barnes und Hille 1989). Seither wurde I_h in verschiedenen Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems, wie beispielsweise in den Pyramidenzellen des Hippocampus, wo dieser Strom I_q (q für queer) genannt wurde (Halliwell und Adams 1982) und in zahlreichen anderen Geweben gefunden.

1.3 Klonierung der HCN-Kanäle

Obwohl der native I_h -Strom bereits seit mehr als zwanzig Jahren bekannt ist und ausgiebig elektrophysiologisch untersucht wurde, ist die Klonierung der verschiedenen cDNAs, die

für die Schrittmacherkanäle kodieren, erst kürzlich gelungen. 1998 wurden erstmals die komplette cDNA der mHCN1-3 (Ludwig et al, 1998) und ein Teil der cDNA der mHCN4 (Santoro et al, 1999) charakterisiert und mittels In-situ-Hybridisierung untersucht. Alle vier HCN-Kanäle werden im Rattengehirn exprimiert, ihre genaue Verteilung ist jedoch noch nicht vollständig bekannt (Gauss et al, 1998).

1.4 Molekulare Struktur der HCN-Kanäle

Die molekulare Struktur der HCN-Kanäle zeigt eine Verwandtschaft zu den spannungsabhängigen Kaliumkanälen (Jan und Jan, 1997; Chen et al, 2001; Decher et al, 2004). Insbesondere weisen die HCN-Kanäle Eigenschaften von Kaliumkanälen aus dieser Superfamilie auf, die an zyklische Nukleotide gekoppelt und nicht selektiv für diese Nukleotide sind. Hierbei handelt es sich um den „plant inwardly rectifying K⁺“, „Kat1“ und den „HERG-Kaliumkanal“ des Säugers (Zagotta et al, 1996; Clapham et al, 1998). Als Mitglieder der Superfamilie spannungsabhängiger Kaliumkanäle und als Verwandte der CNG-Kanäle, mit denen sie eine 27% genetische Übereinstimmung haben, zeigen sie folgenden Aufbau (Kaupp und Seifert, 2001).

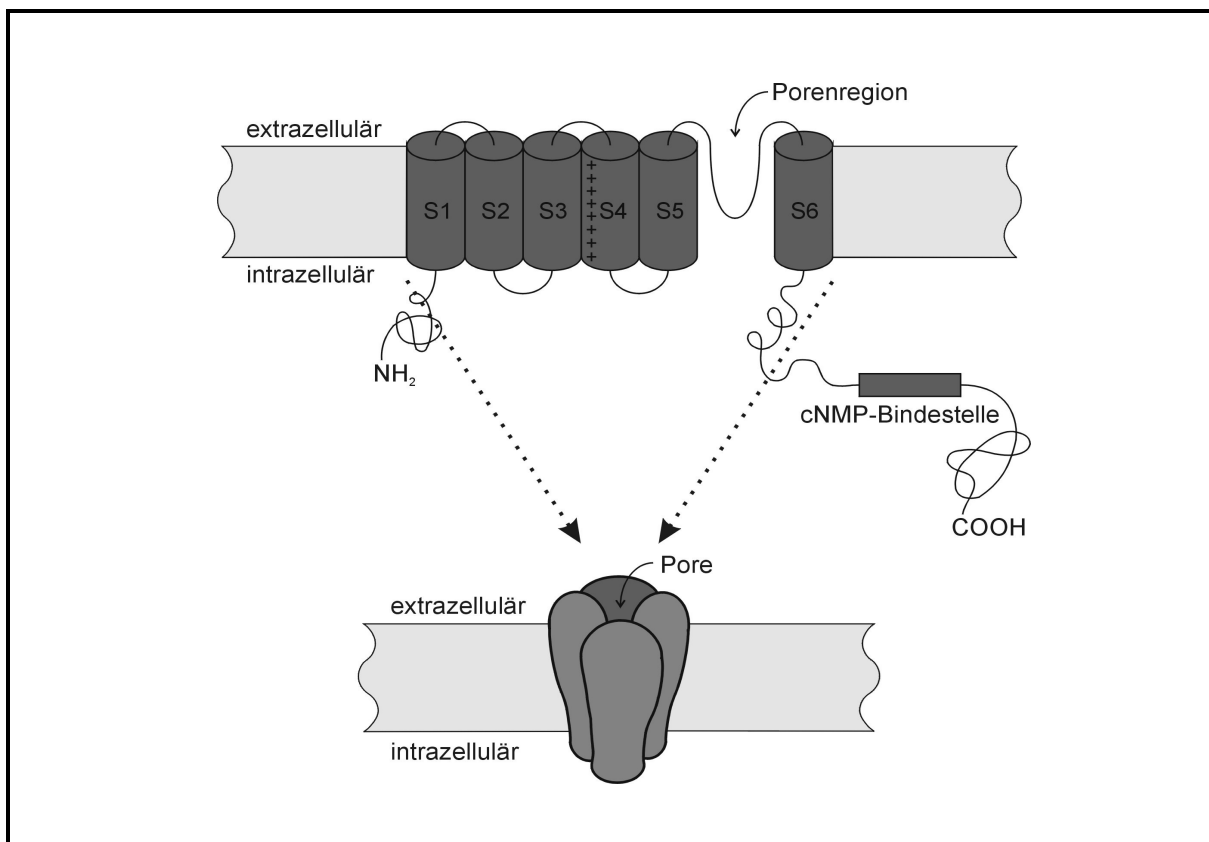


Abbildung 1

Die HCN-Kanäle der Ratte bestehen aus sich zum Teil überlappenden Aminosäuresequenzen (Monteggia et al, 2000) und, wie in Abbildung 1 gezeigt, aus 6 (putativen) transmembranären Helices (S1-S6) mit einem positiv geladenen S4-Segment, das als Spannungssensor dient (Vemana et al, 2004). Das S4 Segment der HCN-Kanäle ist jedoch viel größer, als das der anderen Mitglieder der Superfamilie spannungsabhängiger K-Kanäle (Chen J, 2001). Die ionengesteuerte Porenregion, durch die der Ionenstrom nach Aktivierung fließt, befindet sich zwischen dem 5. und 6. Segment. Obwohl die Porenregion das für K⁺-selektive Kanäle typische GYG (Glycin-Tyrosin-Glycin) Motiv enthält, das sich wie ein Ring um die Porenregion legt (Clapham et al, 1998), ist sie sowohl für die monovalenten Kationen K⁺, als auch für Na⁺ durchlässig (Xue et al, 2002; Roncaglia et al, 2002; Macri et al, 2002). Die Porenregion wird aus vier Untereinheiten (Tetramere) gebildet. Es ist noch nicht vollständig geklärt, inwiefern es sich um Hetero- oder Homotetramere handelt. Da sich die Gewebeexpression der vier HCN-Kanäle in Herz und ZNS zumindest teilweise überlappt (Moosmang et al, 2001), ist es möglich, dass die Kanäle in vivo Heterotetramere bilden. Bekannt ist bereits, dass HCN1 und HCN2 in manchen Regionen heterotetramere Kanäle bilden (Xue et al, 2002). Die Subtypen der HCN-Kanalfamilie weisen in dem Aufbau der Tetramere eine Homogenität auf. Die höchste Homogenität besteht zwischen HCN2 und HCN4 mit 91%. Die niedrigste Homogenität liegt mit 80% zwischen HCN1 und HCN3 vor.

Übereinstimmung der Aminosäuresequenz der vier HCN-Kanäle der Ratte

	HCN1	HCN2	HCN3	HCN4
HCN1	(100%)	86%	80%	87%
HCN2		(100%)	82%	91%
HCN3			(100%)	85%
HCN4				(100%)

Tabelle 1: Die Identität der Aminosäuresequenz zwischen den HCN-Kanälen ist prozentual ausgedrückt. Es wurde die Region zwischen dem S1-Segment und dem Ende der die zyklischen Nukleotide bindenden Domäne verglichen. (Monteggia et al, 2000)

Die Domäne, die die zyklischen Nukleotide bindet, heißt CNBD (cyclonukleotidbindingdomain), liegt am Carboxyl-Terminus, besteht aus 120 AS (Wainger et al, 2001) und ist homolog zu der CNBD anderer CNG-Kanäle, wie beispielsweise der Photorezeptoren (Zagotta und Siegelbaum, 1996, Demontis et al, 2002).

Es ist bereits bekannt, dass die N-Termini der HCN1- und HCN2-Isoforme miteinander interagieren (Proenza et al, 2002). Die Aminosäuresequenzen aller vier HCN-Kanäle haben insgesamt eine Übereinstimmung von rund 60% (Moosmang et al, 1999), wobei es Aminosäuresequenzabschnitte gibt, insbesondere zwischen den transmembranären Helices S1-S6, die eine Übereinstimmung zwischen rund 80 und 90% aufweisen.

1.5 Elektrophysiologische Eigenschaften der HCN-Kanäle

Der durch rekombinante HCN-Kanäle generierte I_h -Strom ist ein gemischter Na^+/K^+ -Einwärtsstrom und wird unter physiologischen Bedingungen vor allem durch Natriumionen getragen (Clapham et al, 1998; Beaumont und Zucker, 2000). Charakterisiert wird I_h durch die Hemmung mittels Caesium und des spezifischen HCN-Kanalblockers ZD7288 (Brad et al, 2002; Satho et al, 1999), sowie durch die Unsensitivität für Barium (Beaumont und Zucker, 2000). Die HCN-Kanäle werden zum einen durch direkte Bindung der intrazellulären zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP an die CNBD und zum anderen spannungsabhängig durch Hyperpolarisation der Zellmembran aktiviert und deaktivieren nicht. Beide Aktivierungsmechanismen beeinflussen sich gegenseitig, sodass eine Feinabstimmung dieser Kanäle auf physiologische Anforderungen möglich ist. Durch den Einsatz des bradykardisch wirkenden Mittels ZD7288 (N-ethyl-N-phenylamino)-1,2-dimethyl-6-(methylamino) pyrimidinium chlorid ist es gelungen den intrazellulären Öffnungsmechanismus der HCN-Kanäle nachzuweisen (Shin et al, 2001; Brad et al, 2002).

Die elektrophysiologischen Eigenschaften des I_h -Stroms wie die Spannungsabhängigkeit, Aktivierungskinetik und Sensitivität für cAMP variieren sowohl stark zwischen den einzelnen HCN-Subtypen, als auch in den verschiedenen Geweben. In Ventrikelmyozyten neugeborener Ratten werden die HCN-Kanäle beispielsweise bei -70mV und in Ventrikelmyozyten adulter Ratten bei -113mV aktiviert (Shi et al, 1999) und depolarisieren die Membran wieder langsam Richtung Ruhemembranpotential. In Neuronen des zentralen Nervensystems ist die Aktivierungsschwelle zudem von der Art des Neurons abhängig. Die Aktivierungskinetik der HCN-Kanäle variiert stark zwischen 200 ms (HCN1), 500 ms (HCN2) und 20 sek. (HCN4) und ist ebenso in den verschiedenen Herzregionen und Neuronen unterschiedlich (Yu et al, 1995). Der HCN3-Kanal ist erst kürzlich in HEK293 Zellen exprimiert worden und wird als langsam depolarisierender Kanal beschrieben,

Einleitung

dessen Aktivierungskinetik zwischen der von HCN2 und HCN4 liegt (Santoro et al, 2000, Moosmang et al, 2001). Die elektrophysiologischen Charakteristika werden in folgender Tabelle zusammengefasst:

	mHCN1	mHCN2	mHCN3	hHCN4
Aminosäuren	910	863	779	1203
Gewebeverteilung	Gehirn	Gehirn, Herz	Gehirn	Gehirn, Herz
Aktivierungskonstante in ms	30 ±3	184±11	265±23	461±40
$V_{1/2}^*$	-94±3mV	-99±1mV	-96±2mV	-100±1mV
P_{Na}/P_K	0.25	0.24	n.d.	0.22
Hill Koeffizient	n.d.	0.5μM/0.8	n.d.	n.d.
Shift durch cAMP, mV	+1.8	+13	n.d.	+15

Tabelle 2 Elektrophysiologische Charakteristika der heterolog exprimierten HCN Kanäle, *Gemessen in „whole-cell voltage clamp mode“; n.d. nicht detektiert, m Maus, h Hamster (Ludwig et al, 1999, Moosmang et al, 2001)

Der zeitliche Einsatz des I_h -Stroms wird im Folgenden am Aktionspotential des Sinusknoten und eines Neuron gezeigt. Die Inaktivierung der HCN-Kanäle erfolgt nicht wie bei anderen spannungsabhängigen Kanälen durch Aktivierung spezieller Verschlussmechanismen, sondern durch Schließung der Porenregion, die bei Aktivierung geöffnet wird (Shin KS, 2004).

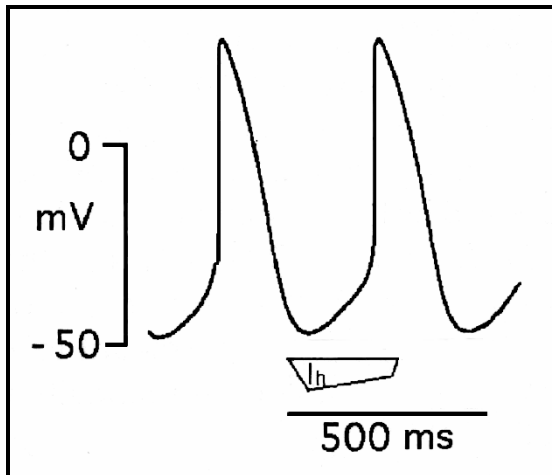


Abb. 2 Aktionspotentiale im Sinusknoten. I_h ist während der diastolischen Depolarisation aktiv und beeinflusst die Herzfrequenz

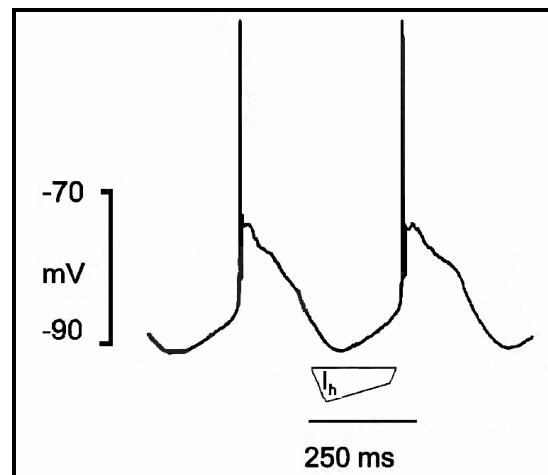


Abb. 3 Aktionspotentiale von Interneuronen eines thalamocortikalen Netzwerks, in dem I_h zusammen mit T-Typ Calciumkanälen rhythmische Oszillationen ermöglicht.

1.6 Modulatoren der HCN-Kanäle

Die elektrophysiologischen Eigenschaften der HCN-Kanäle werden durch zyklische Nukleotide, Neurotransmitter, Hormone und intrazelluläre pH-Veränderung moduliert.

1.6.1 Modulation durch zyklische Nukleotide

Ein Unterschied zwischen den HCN-Kanälen besteht in der Sensitivität für die intrazellulären Botenstoffe cAMP und cGMP (Beaumont und Zucker, 2000). Diese zyklischen Nukleotide beeinflussen konzentrationsabhängig die Wahrscheinlichkeit, dass sich der HCN-Kanal im geöffneten Zustand befindet, kurz die Offenwahrscheinlichkeit der HCN-Kanäle durch direkte Bindung an die intrazelluläre CNBD und durch phosphorylase-unabhängige allosterische Interaktion mit dem Kanal (DiFrancesco, 1999; Lüthi und McCormick, 1999). Zum einen verschiebt besonders cAMP die Aktivierungskurve des Membranpotentials um etwa 2 bis 17 mV zu positiveren Potentialen. Da die HCN-Kanäle durch Hyperpolarisation aktiviert werden, bedeutet diese eine verminderte Offenwahrscheinlichkeit des Kanals, beim Herzen folglich eine langsamere Herzfrequenz. Während eine Verschiebung um 2mV, wie sie durch cAMP beim HCN1-Kanal erfolgt, nur eine schwache Beeinflussung darstellt, sind die Kanäle HCN2 und HCN4 mit einer Verschiebung des Potentials um 15-17mV sensibler für cAMP. Ein Calciumeinwärtsstrom führt nicht zur erhöhten cAMP-Transmission (Zhong N et al, 2004). Es ist noch nicht vollständig geklärt, wie HCN3 auf cAMP reagiert.

1.6.2 Modulation durch Neurotransmitter

Der Neurotransmitter Serotonin induziert über die Aktivierung G_s -gekoppelter 5-HT-Rezeptoren und die folgende Aktivierung presynaptischer Adenylatzyklase die Bildung von cAMP (Heine et al, 2002), das wiederum durch bevorzugte Bindung an die CNBD des Carboxyterminus insbesondere des HCN2-Kanals die Öffnung des HCN-Kanals herbeiführt (Ulens und Tytgat, 2001). Auf diese Weise werden presynaptische HCN-Kanäle moduliert und die synaptische Transmission verstärkt (Beaumont und Zucker, 2000). Der presynaptische I_h , der die gleichen biophysiologicalen Eigenschaften des von rekombinanten HCN-Kanälen erzeugten I_h aufweist, ist über diesen Mechanismus an der Plastizität der Synapsen beteiligt. Die Aktivierung weiterer Rezeptoren, die entweder positiv oder negativ an die Adenylatcyclase gekoppelt sind, kann die Aktivierungskurve

von I_h um bis zu $\pm 20\text{mV}$ verändern. Noradrenalin beispielsweise aktiviert die Adenylatzyklase, die Offenwahrscheinlichkeit des HCN-Kanals ist erhöht, I_h depolarisiert die Membran schneller Richtung Ruhemembranpotential und weitere Aktionspotentiale können generiert werden.

Auch Opiode können hippocampale Interneurone des Stratum oriens der CA1-Region via I_h -Strom inhibieren. Dort wurde ein von Natrium- und Kaliumionen getragener und selbst durch langanhaltende Hyperpolarisation nicht deaktivierter Einwärtsstrom beobachtet, der zudem unempfindlich gegenüber Barium und durch Caesium und ZD7288 blockierbar ist. Opioid-Rezeptoren sind Mitglieder der G_i/G_o -gekoppelten Rezeptoren und hemmen sowohl die Adenylatcyclase, als auch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (VDCCs) im zentralen und peripherem Nervensystem (Childers, 1993; Moises et al, 1994). Opiode können auf diesem Weg die Ionenströme I_h und G_{irk} in derselben Neuronenpopulation im Stratum oriens der CA1-Region des Hippocampus reduzieren und die Aktivität der Interneurone im Hippocampus hemmen (Svoboda und Lupicia, 1998).

Dopamin inhibiert I_h in Photorezeptoren und im Nucleus tegmentalis ventralis über CA^{2+} abhängige Aktivierung G-Protein gekoppelter Kanäle. Im Bulbus olfactorius der Ratte reduziert Dopamin I_h über einen noch unbekanntem Weg (Vargas und Lucero, 2002).

1.6.3 Modulation durch intrazelluläre pH-Wertveränderung

Durch die Applikation von schwachen Säuren und die darauffolgende intrazelluläre Säuerung beispielsweise von Neuronen des Nucleus relays thalami der Ratte konnte ein reversibler negativer Shift der halbmaximalen Geschwindigkeit $V_{1/2}$ von 3 mV erzeugt werden. Umgekehrt führt eine schwache intrazelluläre Alkalisierung zu um 4-5 mV positiveren Membranpotentialen. Extrazelluläre pH-Wertveränderungen führen hingegen zu keiner Beeinträchtigung der elektrophysiologischen Eigenschaften des den HCN-Kanälen zugrundeliegenden I_h -Stroms. In Natura verursacht die rhythmische Stimulierung thalamocortikaler Neurone eine Säuerung des intrazellulären Milieus, wodurch die Amplitude und der Zeitverlauf der Aktivierung des I_h -Stroms herabgesetzt werden. pH-Wertveränderungen haben folglich eine bedeutende Modulierungsfunktion auf den Öffnungsmechanismus der HCN-Kanäle. Durch diesen pH-wertabhängigen Öffnungsmechanismus könnte eine Up- und Downregulation der HCN-Kanäle in rhythmisch oszillierenden Neuronen erfolgen (Munsch und Pape, 1999). Einer der pH-sensitiven Bereiche liegt zwischen der spannungsabhängigen S4-Helix und der

zytoplasmatischen S4-S5-Region. Ein einzelner Histidinrest (His-321), der in allen vier HCN-Kanälen nachgewiesen wurde, reguliert dort die pH-Sensitivität der HCN-Kanäle (Zong, 2001). Ebenso kontrolliert Histidin 518 in der S6-CNBD-Region die pH-Abhängigkeit des HCN-Kanals im Seeigelspermium zur feinregulierten Spermienbewegung (Mistrik et al, 2004)

1.7 Funktion der HCN-Kanäle

Die HCN-Kanäle tragen zu fundamentalen physiologischen Funktionen wie beispielsweise der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus, dem pulsatilem Freisetzen von Hormonen und dem Schlagen des Herzens bei. Dabei wirken die HCN-Kanäle sowohl auf zellulärer, als auch auf interzellulärer systemischer Ebene.

Eine wesentliche Funktion der HCN-Kanäle ist die Kontrolle der rhythmischen Aktivität endogener Oszillatoren im Herzen, sowie im zentralen Nervensystem. Da diese Kanäle die Oszillationsfrequenz beeinflussen, mit anderen Worten die Taktung der Oszillation bestimmen, werden sie häufig Schrittmacherkanäle genannt. Dies ist zum Teil irreführend, da man sich bei einem Schrittmacher die Taktung oft am Anfang einer Aktion vorstellt. Die HCN-Kanäle werden jedoch durch eine Hyperpolarisation der Membran, die am Ende eines Aktionspotentials steht, aktiviert (Clapham, 1998).

1.7.1 Funktion der HCN-Kanäle im Herzen

Im Herzen generieren vor allem die HCN1 und HCN4 den Schrittmacherstrom I_f . I_f ist Teil der spontanen diastolischen Depolarisation und spielt eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der Schlagfrequenz des Herzens und deren Modulation und Feinabstimmung durch Neurotransmitter. I_f wird neben seiner Spannungsabhängigkeit ebenso direkt durch intrazelluläres cAMP aktiviert, das die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals erhöht. Dabei unterliegt dieser Mechanismus sowohl sympathischen β -adrenergen als auch parasymphathischen muskarinergen Einflüssen. Noradrenalin aktiviert und Acetylcholin hemmt die Adenylatzyklase, sodass die Offenwahrscheinlichkeit unter parasymphathischem Einfluß abnimmt (DiFrancesco 1993). Zudem haben die einzelnen Zellen im Sinusknoten des Herzens beispielsweise eine eigene spontane Depolarisationsfrequenz. Durch die Aktivierung des HCN-Kanals durch Hyperpolarisation kann der HCN-Kanal die Refraktärzeit der einzelnen Sinuszelle verkürzen und über eine Rückkopplung mit den

anderen Sinuszellen die einzelnen Depolarisationsfrequenzen der Sinuszellen synchronisieren und zu einem Schrittmacherpotential generieren.

Da der I_f -Ionenstrom nicht nur in dem primären Schrittmacherzentrum des Kaninchenherzens, wo er zu mehr als 81% durch HCN4-Kanaltransskripte und zu rund 18% durch HCN1-Kanaltransskripte repräsentiert wird, sondern auch im sekundären Schrittmacherzentrum, im Reizleitungssystem und in Myozyten des Vorhofs und der Kammer gefunden wird, legt dies die Vermutung nahe, dass der I_f -Ionenstrom auch an der Reizleitung über die unterschiedliche Verteilung der HCN-Kanalsubtypen modulierenden Einfluss ausübt. In den Kaninchen-Purkinjefasern werden gleiche Mengen mRNA des HCN1- und HCN4-Kanals und geringe Menge HCN2mRNA gefunden, wohingegen im Rattenventrikel hauptsächlich der HCN2-Kanal exprimiert wird. Dabei beinhaltet der Sinusknoten 25 mal mehr HCNmRNA als die Purkinjefasern und 140 mal mehr HCNmRNA als die Ventrikelmyozyten (Shi et al, 1999). Auch im Atrioventrikularknoten sowie in Myozyten des Vorhofs wurden HCN-Kanäle gefunden (Moroni et al 2001). Ein HCN3-Kanal im Herzen wurde bisher nicht beschrieben.

1.7.2 Funktion der HCN-Kanäle im ZNS

Im zentralen Nervensystem ist ebenfalls eine wesentliche Funktion die Generierung von Rhythmizität (McCormick und Pape 1990; Pape 1996). Der durch Hyperpolarisation ausgelöste, aber selbst depolarisierende Strom der HCN-Kanäle reguliert zudem das Ruhemembranpotential und damit die Erregbarkeit der Zellmembran, moduliert inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSPs), synchronisiert neuronale Aktivität in komplexen neuronalen Netzwerken und schützt die Zellmembran vor exzessiver Hyperpolarisation. Auf diese Weise sind die HCN-Kanäle an der sensorischen Adaption (Lüthi und McCormick, 1998; Demontis et al, 1999), an der Formung synaptischer Potentiale (Magee, 1999), wie beispielsweise im Ganglion cervicale superior der Ratte (Lamas, 1998), und an der Kontrolle synaptischer Transmitterfreisetzung (Beaumont und Zucker, 2000, Southan et al, 2000) modulierend beteiligt.

Die inhibitorischen postsynaptischen Potentiale (IPSP's) hyperpolarisieren die Membran und erregen dadurch die HCN-Kanäle. Während der Hyperpolarisation befindet sich die Membran in der Refraktärzeit und ist für weitere Aktionspotentiale gar nicht empfänglich oder ein Aktionspotential kann sich nur langsamer aufbauen und ist in seiner Intensität abgeschwächt. Folglich wird das Schwellenpotential zur Auslösung und Weiterleitung

einer Erregung nicht erreicht. Der I_h -Strom eines HCN-Kanals depolarisiert die Membran wieder in Richtung Ruhemembranpotential und kann daher einzelne und aufeinanderfolgende IPSP's beenden. Auf diese Weise können die HCN-Kanäle die Hyperpolarisationsphase verkürzen, was eine Beschleunigung der Oszillationsfrequenz zur Folge hat. Dies geschieht beispielsweise im Nucleus reticularis thalami (McCormick und Pape, 1990) und im Nucleus olivaris inferior in Interaktion mit T-Typ Calciumkanälen und vermutlich noch mit anderen Kanälen (Bal T. und McCormick, 1996).

Neuronale Kerngebiete bestehen aus Kernuntereinheiten, die Informationen aus anderen Arealen erhalten. Über die HCN-Kanäle kann die Antwort auf diese Informationen synchronisiert und den physiologischen Erfordernissen angepasst werden, indem sie wiederum durch die Verkürzung der Refraktärzeit den Zeitpunkt der Depolarisation beeinflussen.

1.8 Zielsetzung der Promotionsarbeit

Der I_h -Strom ist der den HCN-Kanälen zugrundeliegende Ionenstrom und hat eine Schlüsselrolle in der Initiierung, Modulation und Feinabstimmung von Schrittmacherdepolarisationen sämtlicher physiologischer Prozesse, wie dem Schlagen des Herzens, der Steuerung des Schlaf-Wach-Rhythmus und dem pulsatilem Freisetzen von Releasinghormonen. Es gibt nur wenige Ergebnisse molekularbiologischer Verfahren zu der Verteilung der HCN-Kanäle und einige Ergebnisse elektrophysiologischer Verfahren zu der Verteilung des I_h -Stroms im Gehirn. Elektrophysiologisch sind die I_h -Ströme im Perikaryon, an der pre- und postsynaptischen Membran untersucht worden. Durch das molekularbiologische Verfahren der In-situ-Hybridisierung konnten die dem I_h -Strom zugrundeliegenden HCN-Kanäle nur am Perikaryon nachgewiesen werden (Santoro et al, 1999; Monteggia et al, 2000, Moosmang et al, 2001). Beide Methoden liefern auf unterschiedliche Weise Informationen über den HCN-Kanal und weisen nur zum Teil übereinstimmende Ergebnisse auf, wodurch ein Vergleich mit einer weiteren Methode sinnvoll und notwendig wird.

Ziel dieser Arbeit ist es daher einen geeigneten Antikörper zur immunhistochemischen Untersuchung des HCN3-Kanals zu suchen und zu charakterisieren und die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbemethode mit den Ergebnissen molekularbiologischer und elektrophysiologischer Verfahren und den seit Kurzem vorhandenen immunhistochemischen Ergebnissen (Notomi, 2004) zu vergleichen und zu diskutieren.

2 Material und Methoden

2.1 Synthese des Immunisierungspeptids

Nachdem die Gene der HCN-Kanäle von mehreren Arbeitsgruppen (Gauss et al, 1998; Ludwig et al, 1998; Santoro et al, 1999) geklont wurden, wurde die cDNA mittels eines Translationsprogramms in die Aminosäuresequenzen der HCN-Kanalproteine übersetzt (www.expasy.org: Translate programme). Die Aminosäuresequenzen der Proteine aller vier HCN-Kanäle wurden auf Übereinstimmungen verglichen und für jeden HCN-Kanal wurden die Aminosäuresequenzen herausgesucht, die keine Übereinstimmung mit den anderen Kanälen aufweisen (Scholten, IBI, Forschungszentrum Jülich). Zur immunhistochemischen Darstellung der einzelnen HCN-Kanäle wurde jeweils eine dieser Aminosäuren ausgewählt. Hierbei handelt es sich bei jedem Kanal um einen intrazellulären Abschnitt der gesamten Aminosäuresequenz. Zur Charakterisierung der HCN-Kanäle 1, 2 und 3 wurde ein Bereich in der Nähe des Carboxylendes, zur Charakterisierung des HCN4-Kanals wurde ein Bereich in der Nähe des Aminoterminus gewählt.

Diese intrazelluläre Aminosäuresequenz des HCN3-Kanals wurde mit einer Solidphasensynthese erstellt, zu mehr als 95% mit einer „reverse-phase“ HPLC (high pressure liquid chromatography) gereinigt und als Immunisierungspeptid sowohl für die Herstellung eines geeigneten Antikörpers, als auch im Epitopmapping verwendet. Die genaue Lokalisation des Immunisierungspeptids im HCN3-Kanalprotein der Ratte ist im Folgenden gezeigt. Es handelt sich um die Aminosäuresequenz rHCN3₆₃₈₋₆₇₃ des HCN3-Kanalproteins (AS 1-779) der Ratte (Monteggia et al, 2000).

MEEEARPAAG	AGEAATPARE	TPPAAPAQAR	AASGGVPESA	PEPKRRQLGT	LLQPTVNKFS	60
LRVFGSHKAV	EIEQERVKSA	GAWIIHPYSD	FRFYWDLIML	LLMVGNLIVL	PVGITFFKEE	120
NSPPWIVFNV	LSDTFFLLDL	VLNFRGTIVV	EEGAEILLAP	RAIRTRYLRT	WFLVDLISSI	180
PVDYIFLVVE	LEPRLDAEVY	KTARALRIVR	FTKILSLLRL	LRLSRLIRYI	HQWEEIFHMT	240
YDLASAVVRI	FNLIGMMLLL	CHWDGCLQFL	VPMLQDFPDS	CWVSMNRMVN	HSWGRQYSHA	300
LFKAMSHMLC	IGYGQQAPVG	MPDVWLTMLS	MIVGATCYAM	FIGHATALIQ	SLDSSRRQYQ	360
EKYKQVEQYM	SFHKL PADTR	QRIHEYYEHR	YQGKMFDEES	ILGELSEPLR	EEIINFTECRG	420
LVAHMPLFAH	ADPSFVTAVL	TKLRFEVFQP	GDLVVREGSV	GRKMYFIQHG	LLSVLARGAR	480
DTRLTDGSYF	GEICLLTRGR	RTASVRADTY	CRLYSLSVDH	FNAVLEEFPM	MRRAFETVAM	540
DRLRRIGKKN	SILQRKRSEP	SPGSSGGVME	QHLVQHDRDM	ARGVRGLAPG	TGARLSGKPV	600
LWEPLVHAPL	QAAAVTSNVA	IALTHQRGPL	PLSPDSPA TL	LARSARRSAG	SPASPLVPVR	660
AGPELLARGPW	AST SRLPAPP	ARTLHASLSR	TGRSQVSLLG	PPPGGGARRL	GPRGRPLSAS	720
QPSLPQRATG	DGSPRRKGS	SERLPPSGLL	AKPPGTVQPP	RSSVPEPVTP	RGPQISANM	779

638TLLARSARRSAGSPASPLVPVRAGPLLARGPWASTS673

Dieses Peptid wurde an KLH (keyhole limpet haemocyanin) mit Maleimid, einem bifunktionellem Reagenz, welches über Schwefelwasserstoffbrücken bindet, gekoppelt. Keyhole limpet ist ein kleiner Invertebrat aus dem Meer, dessen Haemocyanin, ein hämoglobinähnliches Molekül, als Carrierprotein für die Immunisierung fungiert. Das gekoppelte Peptid wurde mit Chromatographie gereinigt und für die Herstellung eines gegen den HCN3-Kanal spezifischen Antikörpers verwendet. Hierzu wurden Ratten mit dem Peptid immunisiert (Kremmer, GSF, Institut für Molekulare Immunologie, München)

2.2 Herstellung und Entwicklung des monoklonalen Antikörpers 6C5

Die Herstellung des monoklonalen Antikörpers erfolgt mittels der sogenannten Hybridomatechnologie. Dabei wurden mehrere Ratten durch die Injektion des KLH-gekoppelten Peptids immunisiert und eine Immunantwort in Form von Antikörperbildung durch Plasmazellen wurde hervorgerufen. Anschließend wurde die Milz der Ratten entnommen, die unter anderen die Plasmazellen enthielt. Da die Plasmazellen keine Zellteilung aufwiesen, wurden sie mit Myelomen zu Hybridzellen (Hybridomen) verschmolzen. Die Hybridzellen wurden mit dem Immunisierungspeptid nach dem mit diesem Peptid reagierenden Antikörper gescreent. Folgende 16 Antikörper wurden in der Ratte hergestellt und aus dem GSF, Institut für Molekulare Immunologie (Kremmer, München), zum Institut für biologische Informationsverarbeitung des Forschungszentrum Jülich und zum C. und O. Vogt Institut für Hirnforschung (Düsseldorf) zur Charakterisierung geschickt. Nach der Charakterisierung der Antikörper mittels Westernblot und Immunhistochemie wurde die Typisierung der Immunglobulinsubklassen der geeigneten Antikörper in München vorgenommen.

Antikörper gegen das HCN3-Kanalprotein

Name	Ig-Typ	Getestet mit HEK-Zellen	Immunhistochemische Ergebnisse
<i>TLL-4D9</i>	<i>monoclonal, (IgM)</i>	<i>rHCN3</i>	<i>sehr gut</i>
TLL-4F6	monoclonal, (IgG2b)	rHCN3	nur bei 1:5 Verdünnung
<i>TLL-6C5</i>	<i>monoclonal, (IgG1)</i>	<i>rHCN3</i>	<i>sehr gut</i>
TLL-1C2	monoclonal	rHCN3	schwache Reaktion
TLL-1F3	monoclonal, (IgM)	rHCN3	gut, Klone verloren
TLL-2B8	monoclonal	rHCN3	schwache Reaktion
TLL-2B10	monoclonal	rHCN3	schwache Reaktion
TLL-2G2	monoclonal	rHCN3	schwache Reaktion
TLL-2G8	monoclonal	rHCN3	schwache Reaktion
TLL-3C9	monoclonal	rHCN3	schwache Reaktion
TLL-3G7	monoclonal	rHCN3	schwache Reaktion
TLL-3H9	monoclonal	rHCN3	schwache Reaktion
TLL-7H5	monoclonal	rHCN3	keine Reaktion
TLL-8A8	monoclonal	rHCN3	schwache Reaktion
TLL-8D12	monoclonal	rHCN3	nur Gliafärbung
<i>TLL-7H7</i>	<i>monoclonal, (IgG2a)</i>	<i>rHCN3</i>	<i>sehr gut</i>

Tabelle 3: Antikörper zur Darstellung des HCN 3-Kanalproteins. Insgesamt wurden 16 Antikörper zur Darstellung des HCN3-Kanalproteins charakterisiert. Es hat sich herausgestellt, dass die kursiv hervorgehobenen Antikörper in der Immunhistochemie am geeignetesten waren, das HCN3-Kanalprotein darzustellen.

Jeder Antikörper wurde nach immunhistologischer Titration (Titrationskurve 7.3) in mehreren Verdünnungen (1:1, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625) im immunhistochemischen Protokoll mindestens zweimal eingesetzt. Die in der Tabelle 3 kursiv markierten Antikörper haben sich als für die immunhistochemische Darstellung des HCN3-Kanals geeignet erwiesen. Der Antikörper 6C5 hat die besten Ergebnisse im Westernblot erzielt und wurde daher in dieser Arbeit verwendet.

2.3 Charakterisierungen des Antikörpers 6C5

Um in einem Biomaterial mittels eines Antikörpers ein Protein nachzuweisen, gilt es die Existenz des Proteins im untersuchten Gewebe und die Spezifität des Antikörpers für das Protein zu beweisen. Folgende sechs Nachweisverfahren wurden hierzu durchgeführt.

Erstens muss nachgewiesen werden, ob der gegen die Aminosäuresequenz 638TLLARSARRSAGSPASPLVPVRAGPLLARGPWASTS⁶⁷³ synthetisierte Antikörper

auch tatsächlich diese Aminosäuresequenz oder einen Teil dieser Sequenz erkennt und an sie bindet. Dieses Verfahren zum Nachweis der Spezifität des Antikörpers 6C5 ist die **Absorptionskontrolle**. Zweitens muss die Existenz des HCN3-Kanalproteins in dem untersuchten Material (Ratten-, Maus-, Meerschweinchen- und Hamstergehirn) nachgewiesen werden. Hierzu wird der **Westernblot** verwendet. Drittens muss der Bereich des Antigens, an den der Antikörper spezifisch bindet (Epitop), ermittelt und beschrieben werden. Dies geschieht durch das **Epitopmapping** mittels ELISA (Enzyme linked immunabsorbent assay). In einem vierten Schritt wird das Epitop auf Homologien in einer weltweiten Proteindatenbank untersucht. Schließlich wird der Antikörper 6C5 in **verschiedenen Spezies** eingesetzt. Markiert er die gleichen Areale immunhistochemisch in ähnlicher Intensität, so spricht dies für die Spezifität des Antikörpers. Sechstens gilt die Spezifität des Antikörpers als erhöht, wenn **unterschiedliche Fixierungen** zur Behandlung der Tiere eingesetzt werden und zum gleichen Resultat führen.

2.3.1 Absorptionskontrolle

Die Absorptionskontrolle ist ein Verfahren zur Kontrolle sowohl der Reagenzien als auch des Gewebes. Es wird zu einem ml Arbeitslösung (Verdünnung 1:150) des im Versuch eingesetzten Antikörpers 6C5 ein Überschuss von 10µg Immunsierungspeptid (rHCN3₆₃₈₋₆₇₃) gegeben. Diese Lösung wird über Nacht bei 4°C inkubiert und im Weiteren wird das Gewebe mit dieser Lösung inkubiert. Der biotinylierte Sekundärantikörper und ABC (Avidin-Biotin-Complex) wird hinzugegeben und das Gewebe damit gemäß dem immunhistochemischen Protokoll (2.7) inkubiert.

Arbeitsschritt	Inkubationszeit (-temperatur)	Inkubationslösung
Erstellung der Inkubationslösung I	ü.N. (4°C)	Arbeitslösung (1:150), 10µg Immunsierungspeptid
Gewebeinkubation	ü.N. (RT)	Inkubationslösung I
Waschen	Ü.N. (RT)	Waschlösung (1)
1. Antikörperinkubation	1-4 h (RT)	1. Antikörper-Inkubationslsg (2)
Waschen	2 x 10 min (RT)	Waschlösung (1)
2. Antikörperinkubation	30 min (RT)	2. Antikörper-Inkubationslsg (3)
Waschen	2 x 10 min (RT)	Waschlösung I (1)

(1) PBS_{IHC}; 0,05 % Tween20

(2) 1. Antikörper in PBS_{IHC}; 0,05 % Tween20

(3) 2. Antikörper in PBS_{IHC}; 0,05 % Tween20; 0,1 % Milchpulver

Man geht davon aus, dass der Primärantikörper von dem Immunisierungspeptid absorbiert und die Antigenbindungsseite des Primärantikörpers auf diese Weise gesättigt wird. Daher sollte es zur Verifizierung der Spezifität des Primärantikörpers 6C5 zu dem Immunisierungspeptid zu keiner spezifischen Anfärbung des Gewebes kommen. Zudem kann mit dieser Kontrolle eine größere Affinität des Primärantikörpers sowohl zu einer anderen Aminosäuresequenz des HCN3-Kanals als auch zu einem anderen Antigen im Gewebe ausgeschlossen werden.

2.3.2 Westernblot

Der Westernblot dient dem Nachweis eines bestimmten Proteins. Mit Hilfe der Westernblottechnik wurde die Expression der HCN-Kanäle im Rattengehirn untersucht und der Antikörper 6C5 auf von HEK-Zellen heterolog exprimierten Membranproteinen charakterisiert (Scholten, IBI Forschungszentrum Jülich). Die Proteine wurden mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Der Transfer wurde in einem "Milliblot-Graphit Elektroblob"-System im Halbtrockenverfahren nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Transferzeit betrug 30 min bei 250mA/800cm² Gelfläche. Ein erfolgreicher Transfer wurde durch reversible Färbung mit 0,2% Ponceau S in 2% Essigsäure überprüft und gegebenenfalls wurde die Blotmembran in Streifen geschnitten.

Protokoll:

Der immunologische Nachweis von immobilisierten Proteinen erfolgte in drei Schritten. Im ersten Schritt wurden die unspezifischen Bindestellen auf der Membran blockiert. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper inkubiert. Der erstandene Ag-Ak-Komplex wurde mit dem an Meerrettich-Peroxidase (HRPO) gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Inkubationen wurden entweder in 30-60 Minuten bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht durchgeführt. Zwischen den Inkubationsschritten wurde die Membran für je 10 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Alle Inkubations- und Waschschrte erfolgten auf dem Schüttler. Die an den Ag-Ak-Komplex spezifisch gebundene Peroxidase wurden mit dem "ECL Westernblot Detection Kit" (Amersham Pharmacia Biotech) bzw. mit "SuperSignal® West Dura Extended Dutation Substrate" (Pierce) nach Herstellerangaben detektiert.

Material und Methoden

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

Lösungen:

PBS_w (pH 7,4-7,5)

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

Waschlösung I

PBS_w
0,05% Tween-20

2. Antikörper-Inkubationslösung

2. Antikörper in PBS_w
0,05% Tween-20
0,1% Milchpulver

Blockierungslösung

PBS_w
0,05% Tween-20
0,5% Milchpulver

1. Antikörper-Inkubationslösung

1. Antikörper in PBS_w
0,05% Tween-20

Waschlösung II

PBS_w

Westernblot an transfizierten HEK 293-Zellen

Für die Westernblotanalysen wurden des Weiteren HEK 293-Zellen mit dem Klon pcA-rHCN3 transfiziert. Als Negativkontrolle wurden HEK 293-Zellen mit pcDNA I Amp bzw. ohne DNA (Mock-Kontrollen) transfiziert. Die Membranproteine wurden präpariert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen immobilisiert. Der immunologische Nachweis der immobilisierten Membranproteine erfolgte wie im Protokoll beschrieben. Die Ergebnisse des Westernblot sind in Abbildung 7 und 8 (S.38 und 40) des Ergebnisteils dokumentiert.

2.3.3 Epitopmapping

Ein weiteres Verfahren zur Charakterisierung eines Antikörpers ist das Epitopmapping, das mittels ELISA (Enzyme linked immunabsorbent assay) durchgeführt wird. Im Epitopmapping wird der Bereich des HCN3- Kanals beschrieben, an den der Antikörper spezifisch bindet. Die Kenntnis des Epitops gibt gleichzeitig Aufschluss über die Bindungsart des Antikörpers. Es gibt kontinuierliche und diskontinuierliche Epitope. Bei einem kontinuierlichen Epitop liegen die Aminosäuren, welche das Epitop bilden, direkt aneinandergereiht. Ein Antikörper, der ein kontinuierliches Epitop erkennt, ist

sequenzspezifisch. Bei einem diskontinuierlichen Epitop liegen die Aminosäuren in der Primärstruktur des Proteins nicht direkt nebeneinander, werden aber bei der Faltung in räumliche Nähe gebracht, sodass sie ein Epitop bilden. Der Antikörper, der ein diskontinuierliches Epitop erkennt, ist ein konformationsspezifischer Antikörper.

Um das Epitop der Aminosäuresequenz rHCN3₆₃₈₋₆₇₃ zu ermitteln, wurde die Sequenz, wie in der Abbildung 5 zu sehen ist, in sechs sich überlappende Einzelpeptide gegliedert.

Abbildung 5

638TLLARSARRSAGSPASPLVPVRAGPLLARGPWASTS673

1 TLLARSARRSAG

2 SARRSAGSPASP

3 AGSPASPLVPVR

4 SPLVPVRAGPLL

5 VRAGPLLARGPW

6 PLLARGPWASTS

Mittels ELISA wurde der Antikörper sowohl gegen jedes einzelne Peptid, als auch gegen die Aminosäuresequenz eingesetzt. Das Epitopmapping des Antikörper 6C5 ist in der Abbildung 9 des Ergebnisteils zu sehen.

2.3.4 indirekte ELISA

Bei der ELISA handelt es sich hier um einen modifizierten immunologischen Test zur Bestimmung der Reaktion des Antiköpers 6C5 mit den festphasengebundenen einzelnen Peptiden (1-6). Im ersten Schritt findet die Adsorption der Peptide an der Festkörperoberfläche statt. Anschließend wird der primäre, gegen das präsentierte Antigen gerichtete Antikörper 6C5 hinzugefügt und gebunden. Nach Trennung der frei in Lösung verbliebenen Reagenzien des gebildeten Immunkomplex werden die gebundenen Antikörper im folgenden Reaktionsschritt durch enzymmarkierte Anti-Spezies-Antikörper, sog. sekundäre Antikörper, nachgewiesen. Nach Entfernung der ungebundenen Immunreagenzien erfolgt die Enzym/Substrat-Reaktion. Die gemessene Extinktion des dabei gebildeten Farbstoffes ist zur Menge an umgesetztem Substrat proportional.

Bei dem Enzym, mit dem der hier verwendete sekundäre Antikörper konjugiert ist, handelt es sich um Meerrettich-Peroxidase. Das Enzym spaltet H_2O_2 in H_2O und ein

Material und Methoden

Sauerstoffradikal (O^{\cdot}) und ist daher zur Oxidation organischer Chromogene befähigt. Als Chromogen hat sich besonders OPD (ortho-Phenylendiamindihydrochlorid) geeignet. Es bildet ein wasserlösliches, metastabiles, grünes Zwischenprodukt, das Absorptionsmaxima bei 410 nm und 650 nm besitzt und photometrisch gemessen wird. Als Standardmaterial wird z.B. TCPS (tissue culture polystyrene) verwendet. Die Reaktion wird mit H_2SO_4 gestoppt, das ein wasserlösliches, stabiles Endprodukt bildet, dessen Absorptionsmaximum bei 492 nm liegt.

2.3.5 Protokoll der indirekten ELISA

Protokoll:

Arbeitsschritt	Inkubationszeit (-temperatur)	Inkubationslösung
Beschichtung der ELISA-Platten	ü. N. (37°C°)	100µl Beschichtungslösung
Waschen	5 x 30 min. (RT)	Destilliertes Wasser
Blockierung der Platte	30 min (37°C°)	100µl Blockierungslösung
Waschen	5x30 min. (RT)	PBS _E T
Primärantikörperinkubation	30 min. (37°C°)	100µl Primärantikörper-Lösung
Waschen	5x 30min.(RT)	PBS _E T
Sekundärantikörperinkubation	30 min. (37°C°)	100µl Sekundärantikörper-Lösung
Waschen	5x 30 min. (RT)	PBS _E T
Farbreaktion	30 min (RT)	100µl OPD-Lösung
Beenden der Reaktion	einmalig (RT)	50µl Stopp-Lösung

Jede Platte wird mit dem ELISA-Photometer bei 492nm und als Referenzwellenlänge bei 620nm gemessen. (Perlmann und Perlmann, 1994; Crowther, 1995; Harlow und Lane, 1988)

Lösungen:

PBS_E (phosphate-buffered-saline_{ELISA})

0,01 M Phosphat

0,15 M NaCl pH 7,4

Die phosphatgepufferte, isotonische Kochsalzlösung wird aus zwei Stammlösungen hergestellt.

Stammlösung 1

0,15 M Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)

15% NaCl in destilliertem Wasser

Stammlösung 2

0,15 M Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)

15% NaCl in destilliertem Wasser

Der pH-Wert der Stammlösung 1 wird mit der Stammlösung 2 eingestellt. Dazu soll das pH-Meter rekali­briert und die Stammlösungen 1 und 2 solange adjustiert werden, bis ein pH-Wert von 6,6 erreicht ist. Die entstandene Lösung wird durch 15-fache Verdünnung mit destilliertem Wasser auf einen pH-Wert von 7,35-7,45 eingestellt. Hierzu werden ungefähr 15 Teile der Lösungen 1 und rund 2 Teile der Lösungen 2 verwendet.

Beschichtungslösung

10µg Peptid/ml destilliertes Wasser

Blockierungslösung

2 % BSA (Rinderserumalbumin)

PBS_E

Primärantikörper-Lösung

1:200 6C5 in PBS_E mit 0,2% BSA

0,05 % PBS_E Tween 20

Sekundärantikörper-Lösung

1:5000 an Peroxidase gekoppelte Anti-Ratte IgG/IgM (Jackson)

0,2 % BSA

0,05 % PBS_E Tween 20

Waschlösung (PBS_ET)

PBS_E

0,05 % Tween20

Phosphat-Citrat-Puffer pH 5,1

24,3 ml Zitronensäure (19,2g/ 10000ml)

25,7 ml 0,2 M Phosphat (28,4g Na₂ HPO₄/1000ml)

OPD-Lösung

40 mg o-Phenylendiamindihydrochlorid (OPD)

Phosphat-Citrat-Puffer pH-Wert 5,1

40 µl 30% H₂O₂

Stopp-Lösung

2,5M H₂SO₄

2.3.6 Homologiesuche

Bei der Homologiesuche wird die gefundene Aminosäuresequenz in einer weltweiten Datenbank (Swissprot und UWMBL) durch die Verwendung des Fasta3-Programms (Pearson et al, 1997) mit allen bisher gefundenen Aminosäuresequenzen verglichen. Finden sich keine Homologien, die in der untersuchten Spezies zusammen vorkommen, gilt der Antikörper als nach dem heutigen Wissensstand spezifisch für die Aminosäuresequenz, gegen die er gebildet worden ist. In der vorliegenden Arbeit wurde folgendes computergesteuertes Verfahren angewandt, dessen einzelne Schritte im Folgenden zusammengefasst werden.

www.expasy.org

→Proteomics and sequence analysis tools

→Similarity searches

→Fasta3

→Search title: HCN3Aminosäuren 638-673

→Database: Protein

→swal (Swiss and all)

→gap penalties open-12, residue -2

→scores and alignment: 100

→DNA strand: none

→Matrix: BLOSUM62

→expectation upper value: 50, default

→sequence range: start- end

→Database range: start- end

→Molecule type: Protein

→run Fasta3

2.3.7 Verschiedene Spezies und Fixierungen

Ein Antikörper gilt auch dann als spezifisch, wenn er in unterschiedlichen Spezies dieselben Hirnregionen detektiert. Daher wurde der 6C5 Antikörper zur Überprüfung seiner Spezifität in verschiedenen Spezies eingesetzt. In dieser Arbeit wurden die Nagetiere Hamster, Maus, Meerschweinchen und Ratte untersucht.

Das letzte Verfahren zur Verifizierung der Spezifität eines Antikörpers ist die immunhistochemische Darstellung derselben Hirnregionen in unterschiedlichen Spezies, die mit unterschiedlichen Kompositionen von Aldehydfixierungen behandelt wurden. Jede Fixierungslösung fixiert ein Protein an unterschiedlichen Stellen und sollte dabei weder das den Primärantikörper bindende Epitop durch chemische Reaktion verändern, noch ein weiteres Epitop durch chemische Reaktion schaffen. Die Fixierungen reagieren in unterschiedlicher Geschwindigkeit mit verschiedenen Seitengruppen, wie beispielsweise Amino-, α - und ϵ -Sulfhydrylgruppen, und können auf diese Weise die Aminosäuresequenz der Proteine im Gewebe in eine veränderte Konformation bringen. Durch den Vergleich unterschiedlicher Fixierungen kann somit festgestellt werden, ob Epitope durch die Fixierungen blockiert oder ob weitere Epitope und damit unspezifische Immunpositivität erzeugt worden sind. Daher gilt ein Antikörper auch dann als spezifisch, wenn er in unterschiedlich fixierten Spezies dieselben Regionen markiert.

Es wurden Variationen einer gesättigten Monoaldehydfixierung (Paraformaldehyd), einer gesättigten Dialdehydfixierung (Glutardialdehyd) und einer ungesättigten Dialdehydfixierung (Acrolein) im immunhistochemischen Protokoll eingesetzt.

1. Mod. Zamboni Fixierungslösung (Ref: Somogyi Takagi)

40 g Paraformaldehyd
500 ml Aqua dest. (70°C)
3 Tropfen 10M NaOH
150 ml Picrinsäure
250 ml 0.4 M Phosphatpuffer
Aqua dest. ergänzen bis 1000 ml
mit NaOH oder HCl auf pH 7.4 einstellen

2. Mod. Zamboni Fixierungslösung nach Görcs (Ref: Görcs)

40 g Paraformaldehyd
500 ml Aqua dest. (70°C)
3 Tropfen 10M NaOH
150 ml Picrinsäure
6,6 g Cacodylsäure Natriumsalz
7,2 g NaCl
Aqua dest. ergänzen bis 1000 ml
mit NaOH oder HCl auf pH 7.4 einstellen

3. Mod. Zamboni Fixierungslösung nach Somogyi mit 0,05% Glutardialdehyd

40 g Paraformaldehyd
500 ml Aqua dest. (70°C)
3 Tropfen 10M NaOH
150 ml Picrinsäure
250 ml 0.4 M Phosphatpuffer
2,5 ml 25% Glutardialdehyd
Aqua dest. ergänzen bis 1000 ml
mit NaOH oder HCl auf pH 7.4 einstellen

4. Mod. Zamboni Fixierungslösung nach Somogyi mit 0,5% Glutardialdehyd

40 g Paraformaldehyd
500 ml Aqua dest. (70°C)
3 Tropfen 10M NaOH
150 ml Picrinsäure
250 ml 0.4 M Phosphatpuffer
25 ml 25% Glutardialdehyd
Aqua dest. ergänzen bis 1000 ml
mit NaOH oder HCl auf pH 7.4 einstellen

5. Acrolein Fixierungslösung

51 ml Acrolein (95%)
150 ml gesättigte Picrinsäure
7,2 g Natriumchlorid
6,6 g Cacodylsäure Natriumsalz
Aqua dest. ergänzen bis 1000 ml
mit NaOH oder HCl auf pH 7.4 einstellen.

6. Fixierung durch 2 Lösungen mit verschiedenen pH Werten

Fixierungslösung A:

2 g Paraformaldehyd

50 ml 3% Natriumacetat (70°C)
nach Abkühlung pH auf 6.5 einstellen
Fixierungslösung B:
18 g Paraformaldehyd
450 ml isotonische Natriumhydrogencarbonatlösung (70°C)
nach Abkühlung pH auf 9.5 einstellen

2.4 Spezifitätskontrollen der Methode

2.4.1 Reagenzienkontrolle

Um eine nonspezifische Bindung des Sekundärantikörpers zum Gewebe und um eine nonspezifische Bindung des Avidin-Biotin-Komplexes zum Gewebe auszuschließen, werden diese Reagenzien ohne den monoklonalen Primärantikörper 6C5 zu dem Gewebe gegeben. Man erwartet neben einem homogenen Hintergrund, der durch die Bindung des Sekundärantikörpers Anti-Ratte an das Rattengewebe zustande kommt, keine Färbung des Gewebes. Auch der Avidin-Biotin-Komplex wird durch seine Affinität zu glykolysierten Gewebebestandteilen teilweise vom Gewebe gebunden, was ebenfalls lediglich zur Entstehung des homogenen Hintergrunds beitragen sollte.

2.4.2 Substitutionskontrolle

Bei der Substitutionskontrolle wird der monoklonale Primärantikörper 6C5 mit drei Verdünnungen (1:75; 1:150; 1:300) normalen Rattenserums einer nicht immunisierten Ratte im immunhistochemischen Protokoll substituiert: Das Gewebe wird mit diesem Substitutionsantikörper inkubiert, der biotinylierte Sekundärantikörper Anti-Ratte wird hinzugegeben und bindet durch seine Spezifität an die Antikörper des normalen Rattenserums. Des Weiteren wird das Gewebe mit dem an Peroxidase gekoppelten Avidin-Biotin-Komplex inkubiert. Die Substitutionskontrolle dient der Beurteilung des zweiten Antikörpers im Bezug auf die Entstehung nonspezifischen Hintergrunds. Die immunhistochemische Farbreaktion des Hintergrunds als Ausdruck nonspezifischer Immunpositivität kann auf zwei unterschiedliche Arten entstehen. Zum einen gibt es einen vaskulären Hintergrund, der sowohl durch die Fixierung von frei im Blut zirkulierten Immunglobulinen an der Endotheloberfläche, als auch durch die immunhistochemische Anfärbung der Membrana basalis zustande kommt. Zum anderen gibt es die Kreuzreaktion des Sekundärantikörpers mit dem Gewebe. Dabei reagiert die nicht an den

Primärantikörper gebundene Fab-Region mit dem Rattengewebe. Diese Art von Hintergrund soll in der Substitutionskontrolle getestet werden.

Wird ein gleichbleibend gering erhöhter Hintergrund im Gewebe beobachtet, ist der Sekundärantikörper in der angewandten Methode für die immunhistochemische Detektion des HCN3-Kanals geeignet.

2.4.3 Absorptionskontrolle

Die Absorptionskontrolle ist ein Verfahren sowohl zur Kontrolle der Reagenzien als auch des Gewebes. Das Protokoll der Absorptionskontrolle ist obenstehend beschrieben (2.3.1).

Zur Kontrolle des Gewebes wurde dieses Verfahren auch mit dem monoklonalen Antikörper 6C5 durchgeführt. Dabei wird die Konkurrenz zwischen dem Immunisierungspeptid (Aminosäuresequenz rHCN3₆₃₈₋₆₇₃) und der im HCN3-Kanal des Gewebes enthaltenen Aminosäuresequenz rHCN3₆₃₈₋₆₇₃ beurteilt.

Es gibt drei mögliche Ergebnisse. Ist die Affinität des Primärantikörpers zu dem freien Immunisierungspeptid genauso hoch wie zu der Aminosäuresequenz rHCN3₆₃₈₋₆₇₃ im Gewebe, erwartet man keine immunhistochemische Färbung der den HCN3-Kanal enthaltenden Neurone, da die zuerst eingegangene Bindung der beiden biochemisch gleichwertigen Bindungen bestehen bleibt. Ist die Affinität des Primärantikörpers zu dem freien Immunisierungspeptid höher als zu der Aminosäuresequenz rHCN3₆₃₈₋₆₇₃ im Gewebe, erwartet man wiederum keine immunhistochemische Färbung der den HCN3-Kanal enthaltenden Neurone. Zwischen beiden sich lichtmikroskopisch gleich darstellenden Ergebnissen gibt es keine Unterscheidungsmöglichkeit. Beide Fälle werden aber abgegrenzt gegen das dritte mögliche Ergebnis, die Affinität des Primärantikörpers ist höher zu der Aminosäuresequenz rHCN3₆₃₈₋₆₇₃ im Gewebe als zu dem Immunisierungspeptid in Lösung. Dieses Ergebnis zeigt eine leichte immunhistochemische Färbung der den HCN3-Kanal enthaltenden Neurone. Ist dies der Fall, so lässt sich ein Unterschied in der Konformation des sich frei in Lösung befindlichen Immunisierungspeptids und der Aminosäuresequenz rHCN3₆₃₈₋₆₇₃ im Gewebe und zudem eine höhere Affinität des Primärantikörpers zu der Konformation der Aminosäuresequenz rHCN3₆₃₈₋₆₇₃ im Gewebe schlussfolgern.

2.5 Gewebegewinnung und Präparation

2.5.1 Präparation der Nagergehirne

Das Gewebe wird noch intravital fixiert, um postmortale, binnen kürzester Zeit einsetzende biochemische Veränderungen, die zu Verfälschungen der Ergebnisse führen könnten, zu vermeiden. Das Tier wird daher über eine intraperitoneale Injektion mit Pentobarbital in einer Dosierung von 50mg/kg Körpergewicht narkotisiert. In tiefer Narkose wird der Rumpf eröffnet, der linke Ventrikel punktiert und das Kreislaufsystem mit einer der Fixierungslösungen (2.7) gespült. Im direkten Anschluss folgt die Perfusion mit PBS_{IHC}, wobei unterschiedliche Mengen an Fixierungslösung und PBS_{IHC} notwendig sind. Die Tabelle 4 zeigt zusammenfassend die notwendigen Mengen an Lösungen.

Tabelle 4

Spezies	PBS _{IHC} (ml)/ Zeit 5min.	Fixierungslösung (ml)/Zeit 30 min.
Ratte	60	450
Meerschweinchen	120	900
Maus	10	70
Hamster	20	150

Der benötigte hydrostatische Druck beträgt etwa 90mmHg. Zur Kryoprotektion wird das Gehirn in Saccharoselösung (in 0,9% NaCl) in steigender Konzentration (10%, 20%, 30%) für jeweils 24 Stunden belassen. Für die Erstellung von Koronarschnitten mit dem Kryotom werden die beiden Bulbi olfactorii und das Cerebellum vom Telencephalon in Höhe des Tentorium cerebelli abgetrennt. Alle Gehirnteile werden für 5 Minuten in -38° kalte Isopentanolösung gegeben und gefroren, um im Weiteren auf dem Kryotom 70-80 µm dicke Schnitte zu erstellen.

2.5.2 Herstellung der Schnitte

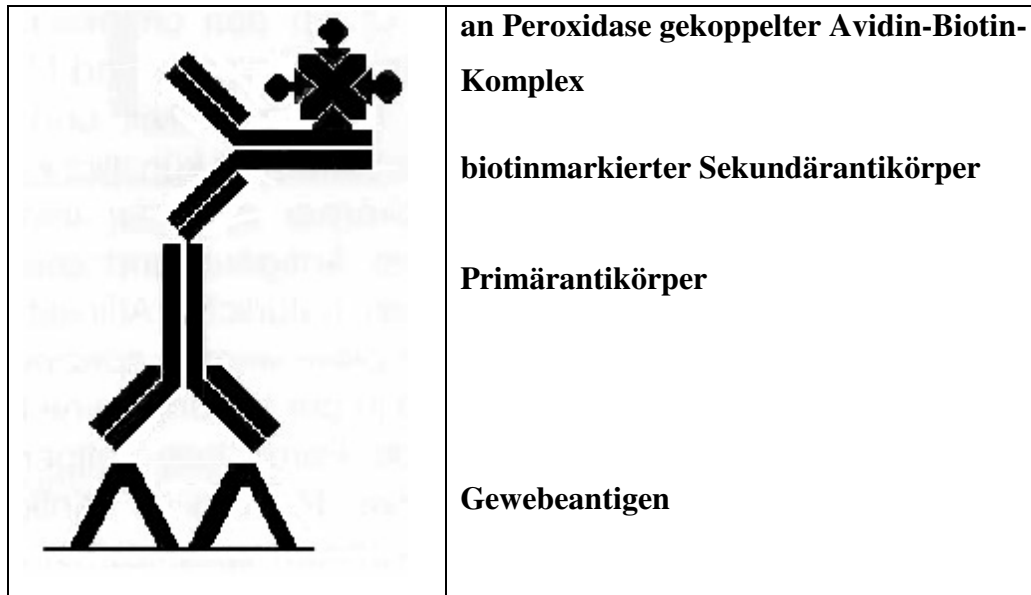
Mittels eines Gefrierklebers (Tissue-TEK) wird der auf -38°C gekühlte Gehirnteil auf den gekühlten Sockel des Gefriermikrometers geklebt. Das Schneidmesser vom gebogenen Typ C wird auf einen Winkel von 9° zur Horizontalen eingestellt und im Folgenden werden 70-80 µm Schnitte erstellt. Die Schnitte werden in PBS_{IHC} gegeben und das in den Schnitten noch verbliebene Fixationsmittel wird auf dem Schüttler bei einer

Schüttelfrequenz von 120/min über Nacht im Kühlraum ausgewaschen. Danach sind die Schnitte für den Durchlauf des Versuchs vorbereitet.

2.6 Die immunhistochemische ABC-Methode

Die Darstellung der Immunreaktivität für den HCN3-Kanal im Nagerhirn erfolgt nach einer modifizierten ABC-Methode, einem indirekten immunhistochemischen Nachweisverfahren. Die ABC-Methode basiert auf der Fähigkeit des aus Hühnereiweiß gewonnenen Glykoproteins Avidin, vier Moleküle des wasserlöslichen Vitamins Biotin physikalisch zu binden (Bourne, 1997), und macht sich die hohe Affinität von Avidin zu Biotin zu Nutze. Bei dieser Bindung handelt es sich um eine der stärksten nonkovalenten Bindungen in der Natur (Dissoziationskonstante $k_D=10^{-15}$). Das Molekulargewicht von Avidin beträgt 68 kDa (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000). Für die ABC-Methode werden drei Reagenzien gebraucht. Das erste Reagenz ist der Primärantikörper (6C5), der spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen, die Aminosäuresequenz rHCN3₆₃₈₋₆₇₃, gerichtet ist und an das Epitop dieses Antigens bindet (Abb. 6). Das zweite Reagenz ist der Sekundärantikörper, der spezifisch gegen die Tierspezies, in der der monoklonale Primärantikörper 6C5 synthetisiert wurde, gerichtet ist und an ihn bindet (Abb. 6). Der Sekundärantikörper ist mit Biotin markiert (biotinyliert). In dieser Arbeit wurde das im Schaf synthetisierte Anti-Ratte-IgG als biotinmarkierter Sekundärantikörper verwendet. Biotin lässt sich gut an Anti-Ratte-IgG koppeln und stellt die Verbindung zum dritten Reagenz, dem an das Enzym Peroxidase gekoppelten Avidin-Biotin-Komplex (ABC) her (Abb. 6). Das Avidinmolekül dieses Komplexes ist nur dreifach mit Biotin gesättigt, sodass eine Bindungsstelle von den oben erwähnten vier Bindungsstellen für Biotin frei ist. Diese Stelle des Avidin-Biotin-Komplexes bindet an das Biotin des biotinmarkierten Sekundärantikörpers (Abb. 6). Daraufhin wird ein geeignetes Chromogen, hier das wasserlösliche Chromogen Diaminobenzidin (DAB), hinzugefügt. Bei der anschließenden Enzym-Substrat-Reaktion oxidiert das an den Marker Biotin gebundene Enzym Peroxidase Wasserstoffperoxyd, woraus Wasser und ein Sauerstoffradikal entstehen. Das entstandene Sauerstoffradikal oxidiert DAB zu einem unlöslichen Phenazinfarbmolekül. Auf diese Weise erhält man ein farbiges Endprodukt und die Neurone, die die Aminosäuresequenz rHCN3₆₃₈₋₆₇₃ des HCN3- Kanalproteins enthalten, werden angefärbt.

Abbildung 6



2.7 Protokoll der immunhistochemischen ABC-Methode:

Jeder der folgenden Schritte erfolgt unter kontinuierlicher Bewegung auf dem Schüttler. Je nach Anzahl der Schnitte, nach Größe der Reaktionsvertiefung und Menge der Lösung wird der Schüttler auf eine Geschwindigkeit von 80-140/ Minute eingestellt.

Vor der immunhistochemischen Färbung werden die Schnitte vorbereitet. Zunächst wird die Gewebedurchlässigkeit mit der Permeabilisationslösung und mit einem Zusatz von 5% DMSO erhöht. Die Inkubationszeit beträgt hier bei Raumtemperatur mindestens 30 Minuten und höchstens 72 Stunden. Es kann auch die modifizierte Permeabilisationslösung über Nacht bei Raumtemperatur verwendet werden. Anschließend werden die Schnitte fünf mal 30 Minuten in PBS_{IHC} gewaschen. Hier kann die Reaktion für einige Tage gestoppt werden, indem man Natriumazid (NaN₃) in einer Konzentration von 0,2% dem letzten PBS_{IHC} Waschgang hinzufügt. Natriumazid ist ein Konservierungsmittel, das das Gewebe gegen Pilze schützt. Es wird ebenfalls für die Beendigung einer Reaktion mit Peroxidase verwendet, da es dieses Enzym irreversibel hemmt. In diesem Fall ist die Arbeitskonzentration von Natriumazid 2%. Gegen Pilzbefall wurde auch alternativ 0,02% Thimerosal eingesetzt. Es wird zu 20% und zu 2% in destilliertem Wasser bei 4°C gelagert. 20%iges Thimerosal wird zur Konservierung von großen Mengen an Schnitten, 2%iges Thimerosal wird als Konservierungsmittel für Antikörperverdünnungen verwendet.

Die Schnitte werden gegebenenfalls unter ständiger Bewegung auf dem Schüttler im Kaltraum aufbewahrt.

Um nonspezifische Antikörperbindungen zu verhindern wird das Gewebe im Weiteren mit 10 % normalem Ziegenserum behandelt. Das Ziegenserum stammt von der Spezies, in der der Sekundärantikörper produziert wurde. Zudem hält das Ziegenserum den verwendeten Primärantikörper in Lösung. Nach diesem Schritt erfolgt kein Waschgang.

Nun wird der monoklonale Primärantikörper 6C5, ein IgG-Antikörper der Ratte, in der optimalen Konzentration von 1:10 bis zu 1:150 aufgetragen. Die Inkubationszeit beträgt bei Raumtemperatur 2 - 3 Tage. Es folgt ein erneutes Waschen von fünf mal 30 Minuten in PBS_{IHC}.

Der Sekundärantikörper ist Antiratte-IgG und wird in einer Verdünnung mit der obengenannten Lösung von 1:400 appliziert. Die Inkubationszeit beträgt hier wiederum bei Raumtemperatur einen Tag.

Nach einem Waschgang von fünf mal 30 Minuten in PBS_{IHC} erfolgt die Bearbeitung der Schnitte mit ABC für 24 Stunden. Die Präparate werden nach der ABC-Inkubation vier mal 30 Minuten mit PBS_{IHC} gewaschen, gefolgt von einem einzigen Waschgang in Tris-Puffer (pH-Wert 7,2). Es folgt die Chromogenreaktion mit dem Chromogen DAB (Diaminobenzidinetetrahydrochlorid) und H₂O₂. Die Entwicklung wird mit dem Lichtmikroskop verfolgt und nach Beurteilung von Stichproben in einem Zeitraum von 30 bis 60 Minuten durchgeführt. Durch einen Waschgang in Tris-Puffer für 30 Minuten und einen Zusatz von 2% Natriumazid wird das Protokoll beendet.

Zur Aufbewahrung werden die Schnitte in PBS_{IHC}-Lösung gebracht. Ein Zusatz von 0,2% NaN₃ vermeidet wiederum die Entstehung von Bakterien- und Pilzbefall. Die Schnitte werden in Gelatinelösung auf Objektträger aufgezogen. Danach werden sie für 12 Stunden bis zwei Tage bei Raumtemperatur luftgetrocknet und können dann mit Deckgläsern versehen werden. Nachdem das für die Deckgläser verwendete Bindemittel DePex aufgetragen wurde, werden die Schnitte, um die optische Dichte des Gewebes zu reduzieren, in Xylolbädern abfallender Konzentration (1:4, 1:3, 1:2, reines Xylol: Terpeneol) für jeweils mindestens 30 Minuten belassen. Nach einigen Wochen Trocknungszeit erfolgt die lichtmikroskopische Auswertung.

Lösungen:

PBS_{IHC}

0,1% Natriumazid

Blockierungslösung

Die Blockierung der Peroxidase erfolgt mit 1,5 -2,0 % H₂O₂ in PBS_{IHC} für 30 Minuten. Danach folgt ein Waschgang von 2 mal 30 Minuten in PBS_{IHC}. Die Peroxidase sollte in 100 ml Mengen unangebrochen und gefroren aufbewahrt werden.

Permeabilisationslösung

0,4% Tween20 in PBS_{IHC}

0,4% TritonX100

Modifizierte Permeabilisationslösung

0,2% Saponin

0,4% Tween 20

PBS_{IHC}

ABC

20µl Lösung A (biotinylierte Peroxidase) werden zu 10 ml PBS gegeben, 30 min. gerührt

20µl Lösung B werden hinzugefügt, 30 min. gerührt

Chromogenlösung

20mg DAB

10ml Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 7,2

500µl 0,3% Wasserstoffperoxyd

Gelatinelösung

5g Gelatine

500ml destilliertem Wasser (50°C), auf Raumtemperatur abgekühlt

250mg Chromalaun zur Stabilisierung der Gelatine gefiltert

2.7.1 verwendete Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind von den Firmen SIGMA (Deisenhofen), Merck (Darmstadt) und Fluka (Buchs) hergestellt. Sie werden im Folgenden alphabetisch aufgelistet. Die im immunhistochemischen Protokoll verwendeten Reagenzien werden gesondert aufgeführt.

Acrolein	(Fluka)
Ammoniumnickelsulfat	(Fluka)
Cacodylsäure Natriumsalz	(SIGMA)
Chrom-(III)-Kaliumsulfat	(Merck)
DePex	(Fluka)
3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)	(SIGMA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Merck)
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	(Merck)
Gelatine	(Merck)
Glutaraldehyd	(Merck)
HCL 40%	(Merck)
Isopentan	(Fluka)
NaOH (10%)	(Merck)
Natrium-Borohydrit 98%	(SIGMA)
Natrium-Cacodylate	(SIGMA)
Natrium-Acetat-Trihydrat	(Merck)
Natriumazid	(Merck)
Natriumcarbonat	(Merck)
o-Phenylendiamin-dihydrochlorid	(SIGMA)
Paraformaldehyd	(Merck)
Pentobarbital	(Merck)
Picrinsäure	(Merck)
Saccharose	(Merck)
Saponin	(SIGMA)
Schwefelsäure	(Merck)
Terpineol	(Fluka)
Thimerosal	(SIGMA)
Triton X100	(SIGMA)
<i>tri</i> -Natriumcitrat Dihydrat	(Merck)
Trizma [®] Pre-Set Crystals pH 7,2	(SIGMA)
Tween20 (Polyoxyethylensorbit)	(SIGMA)
Wasserstoffperoxid	(SIGMA)
Xylol	(SIGMA)

Chemikalien des immunhistochemischen Protokolls:

Folgende im immunhistochemischen Protokoll eingesetzte Chemikalien stammen von den Firmen Vector (Burlingame, USA), SIGMA (Deisenhofen) und Jackson-Dianova (Hamburg).

ABC-Elite-Complex	(Vector)
biotinylierte Anti-Ratte IgG/ IgM (Schaf)	(Jackson Dianova)
Rinderserumalbumin (BSA)	(SIGMA)

2.7.2 Tiere

Für die vorliegende Arbeit wurde das Hirngewebe von den Nagetieren Ratte, Maus, Hamster und Meerschweinchen verwendet. Die Nagetiere wurden von der Tierversuchsanlage (TVA) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und aus dem Institut für Biologische Informationsverarbeitung, Forschungszentrum Jülich GmbH, bezogen. Dabei handelt es sich um folgende Tiere.

10 erwachsene männliche Hamster, Ø Gewicht 40- 50 g	(TVA Uni-Düsseldorf)
10 erwachsene männliche Meerschweinchen, Ø 700 g	(TVA Uni-Düsseldorf)
50 erwachsene männliche Wistar-Ratten, Ø 250-280 g	(TVA Uni-Düsseldorf)
15 erwachsene männliche Mäuse, Ø 32 g	(TVA Uni-Düsseldorf)

2.8 Geräte

Schlittenmikrotom mit Frigomobil (Hn 40) (Reichert-Jung)

Vibratom VT 1000S (Leica)

pH-Meter (Multical)

Mikrowelle (Bosch)

Nunc-Mikrotiterplatten

Mikroskop Axioplan2 (Zeiss)

Cool-Snap-Camera Roper Scientific (Ottobrunn)

Objektträger des Typs Adhäsiv-Objektträger (Engelbrecht und Star Frost)

Deckgläser (Menzel-Glaser, Braunschweig)

2.9 Herstellung der Photographien

Die Photographien wurden mit dem Zeiss-Mikroskop Axioplan2 und der Cool-Snap-Kamera erstellt. Sie wurden anschließend mit dem Programm Adobe Photoshop 6.0 zugeschnitten und bearbeitet. Dabei wurden gegebenenfalls die Helligkeit und die Farbauswahl der Photographie geändert, um der Qualität des lichtmikroskopischen Bildes möglichst nahe zukommen. Der Hintergrund der Bilder wurde so belassen, wie er ursprünglich auf den Präparaten zu sehen war. Es wurden weder Objekte hinzugefügt, noch wurden Objekte entfernt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Nachweisverfahren zur Spezifität des Antikörpers

3.1.1 Absorptionskontrolle

Die Absorptionskontrolle ergab keine Reaktion der mit dem HCN3-Kanalpeptid rHCN3₆₃₈₋₆₇₃ gesättigten Antikörperlösung und dem mit dieser Lösung inkubierten Gewebe. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass der gegen die Aminosäuresequenz rHCN3₆₃₈₋₆₇₃ des HCN3-Kanalproteins synthetisierte Antikörper 6C5 tatsächlich diese Aminosäuresequenz erkennt und an sie bindet.

3.1.2 Westernblot

Die Charakterisierung der Antikörper wurde auf heterolog exprimierten Membranproteinen mit Hilfe der Westernblot-Technik gezeigt. Der immunologische Nachweis erfolgte durch die Antikörper 4D9, 4F6, 6C5 und 7H7 gegen das HCN3-Kanalprotein.

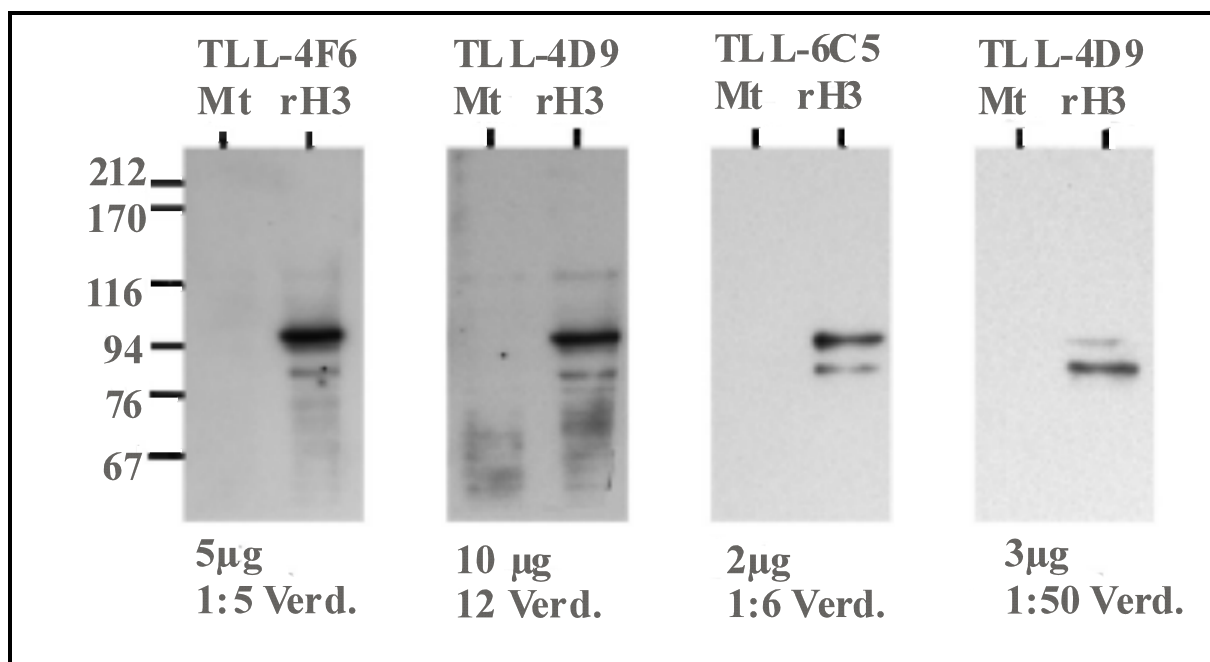


Abbildung 7: Die eingesetzten Mengen von Membranproteinen und die verwendeten Antikörperverdünnungen sind unter der jeweiligen Abbildung angegeben. Links sind die Molekulargewichte der Größenstandards in kDa angegeben. Die Abkürzung Mt bedeutet Mock-transfizierte Zellen, rH3 steht für pcA-rHCN3-transfizierte Zellen.

Die HCN3-Antikörper erkennen in transfizierten HEK 293-Zellen zwei Proteine mit einer Größe von 88 kDa und 95 kDa (Abb. 7). Das kleinere Protein entspricht dem errechneten Molekulargewicht von rHCN3. Um nachzuweisen, dass die Antikörper jeweils nur einen Typ

Ergebnisse

der HCN-Kanäle erkennen, wurden die Antikörper auch auf Membranproteinen von HEK 293-Zellen getestet, die mit einem der drei anderen HCN-Kanaltypen transfiziert worden waren. Dabei kam es zu keiner Kreuzreaktion der Antikörper mit einem anderen HCN-Kanalprotein. Alle vier getesteten Antikörper sind folglich zum immunologischen Nachweis von HCN3-Kanälen im Westernblot geeignet. Durch Westernblot-Analysen kann nun untersucht werden, ob sich der native HCN3-Kanal von den heterolog exprimierten Kanalproteinen oder von anderen Proteinen unterscheidet. Der Vergleich dieser Untersuchung mit den entsprechenden Untersuchungen der anderen HCN-Kanäle können genauere Hinweise darauf geben, ob HCN-Kanäle in vivo als homo- oder heterooligomere Komplexe vorliegen.

3.1.2.1 Westernblot-Analysen mit Membranproteinen der Rattenretina

Mit Hilfe der Westernblot-Technik wurde untersucht, ob der HCN3-Kanaltyp in der Rattenretina exprimiert wird, und welche Modifikationen das Kanalprotein eventuell erfährt. Der immunologische Nachweis erfolgte mit dem spezifischen Antikörpern 6C5 gegen den jeweiligen HCN3-Kanaltyp. Zur Kontrolle wurden die in der Rattenretina detektierten Proteine mit dem HCN3-Kanalprotein aus transfizierten HEK 293-Zellen verglichen. Die bisherigen Westernblot-Experimente (Scholten, IBI, Forschungszentrum Jülich) ließen bereits vermuten, dass die HCN-Kanäle glykosyliert sein könnten, weswegen die Membranproteine deglykosyliert wurden. Jeweils eine unbehandelte und eine deglykosylierte Probe wurden nebeneinander aufgetragen. Abbildung 8 zeigt die Westernblot-Analysen mit Membranproteinen von transfizierten HEK 293-Zellen und der Rattenretina.

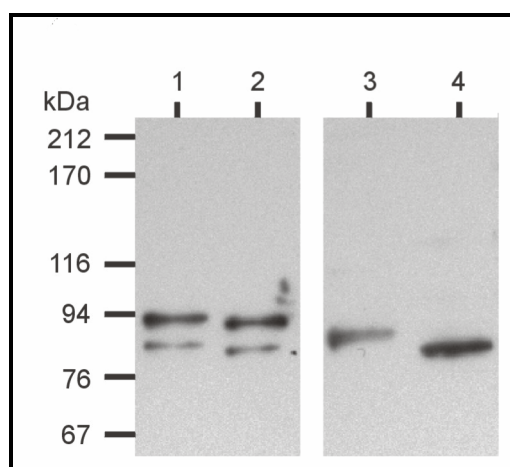


Abbildung 8: Aufgetragen wurden 2 μ g Membranproteine aus transfizierten HEK 293-Zellen (Spuren 1 und 2), bzw. 120 μ g Membranproteine aus Rattenretina (Spuren 3 und 4). In den Spuren 1 und 3 waren die unbehandelten, in den Spuren 2 und 4 die deglykosylierten Proben aufgetragen. Der Antikörper TLL-6C5 wurde in einer 1:5-Verdünnung eingesetzt

Ergebnisse

Der Antikörper TLL-6C5 erkennt in rHCN3-exprimierenden HEK 293-Zellen zwei Proteine mit Größen von 88 kDa und 92 kDa (Abb. 8 Spur 1). Das höhere Molekulargewicht lässt sich in diesem Fall nicht mit einer Glykosylierung erklären, da eine Behandlung mit PNGase F lediglich einen Größenverlust beider Proteine, nicht aber eine generelle Änderung des Bandenmusters bewirkt (Spur 2). Auch eine Dephosphorylierung der Membranproteine ändert das Bandenmuster nicht (nicht gezeigt). Auf welche Weise das rHCN3-Kanalprotein in HEK 293-Zellen stattdessen modifiziert ist, muss in zukünftigen Experimenten geklärt werden. Eindeutiger ist dagegen die Situation in der Rattenretina: In einer unbehandelten Membranfraktion wird ein Protein mit einer Größe von 90 kDa detektiert (Spur 3). Durch Deglykosylierung verringert sich die Größe auf 86 kDa (Spur 4), was dem kleineren Protein in transfizierten HEK 293-Zellen entspricht und mit dem errechneten Molekulargewicht von rHCN3 übereinstimmt.

Mit Hilfe der vorliegenden Westernblot-Analysen konnte gezeigt werden, dass das HCN3-Kanalgen in der Rattenretina exprimiert wird und im nativen Gewebe in einer glykosylierten Form vorliegt. Zwischen dem nativen Gewebe (Rattenretina) und dem heterologen Expressionssystem (HEK 293-Zellen) bestehen allerdings Unterschiede im Glykosylierungsmuster. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Kanalproteine auch in verschiedenen Geweben unterschiedlich glykosyliert sein könnten. Es gibt keine Hinweise darauf, dass die Kanalproteine in der Rattenretina außer Glykosylierung noch andere posttranslationale Modifikationen, wie beispielsweise Phosphorylierungen, erfahren. Ebenso wenig konnten Spleißvarianten mit anderen Molekulargewichten nachgewiesen werden. In transfizierten HEK 293-Zellen dagegen ist das Kanalprotein rHCN3 noch zusätzlich modifiziert. Die Art der Modifizierung konnte bislang nicht geklärt werden.

3.1.2.2 Westernblot-Analysen mit Membranproteinen des Rattengehirns

Die Expression der HCN-Kanäle im Ratten- und Mausgehirn wurde mit Hilfe der Westernblot-Technik untersucht. Der immunologische Nachweis erfolgte durch spezifische Antikörper gegen den jeweiligen Typ von HCN-Kanal. Der Antikörper TLL-6C5 wurde in einer 1:10-Verdünnung, der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:7000 eingesetzt. Der im Rattengehirn durchgeführte Westernblot ergab wegen eines stark erhöhten Proteinbedarfs und daraus resultierender verstärkter Kreuzreaktionen kein verwertbares Ergebnis. Der Antikörper 6C5, ein monoklonaler Antikörper, der in der Ratte erstellt wurde, wurde im Westernblot mit Rattengehirn als zweiter Antikörper verwendet. Da beim Westernblot im Rattengehirn ein Homogenat von sämtlichen Membranproteinen der Ratte

Ergebnisse

verwendet wird, ist ein Antikörper, der in der selben Spezies eingesetzt wird, in der er auch erstellt worden ist, als zweiter Antikörper nicht optimal geeignet um das entsprechende Protein in dieser Spezies zu detektieren.

3.1.3 Epitopmapping

Das Nachweisverfahren der ELISA untersuchte die Spezifität des Antikörpers 6C5 für die Aminosäuresequenz rHCN3₆₃₈₋₆₇₃ des HCN3-Kanalproteins. Zudem brachten die Ergebnisse des Epitopmapping Hinweise auf die Art der Spezifität des Antikörpers. Das Epitopmapping des Antikörpers 6C5 für den HCN3-Kanal und des Antikörpers 4A6 für den HCN2-Kanal sind vergleichend in der Abbildung 9 zu sehen.

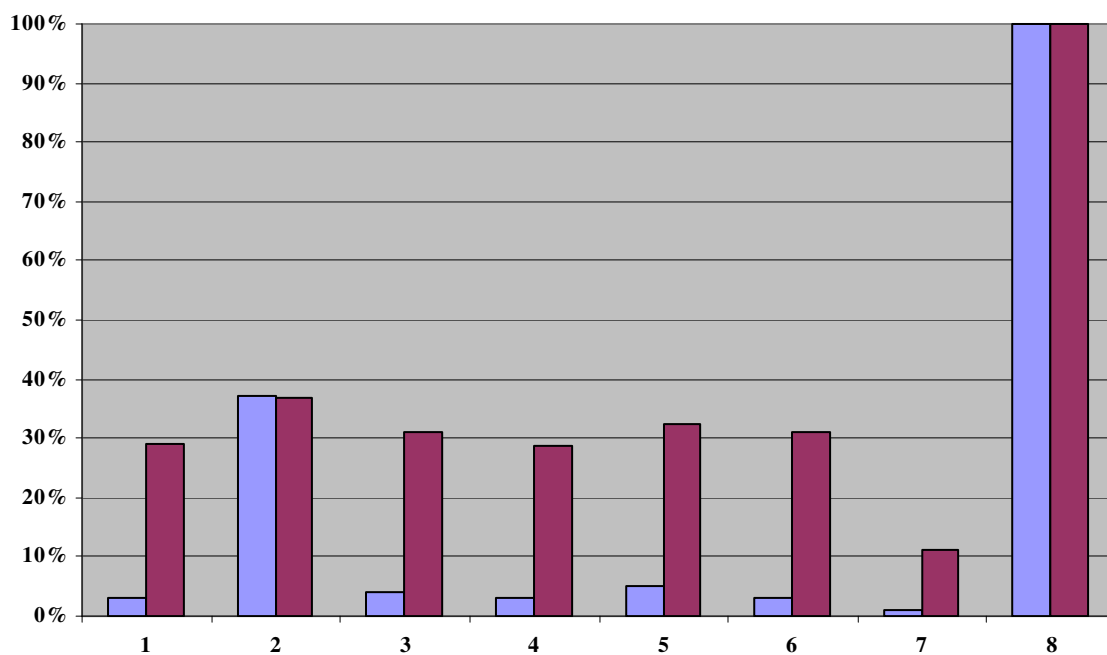


Abb. 9 Auf der **X-Achse** ist die optische Dichte in % angegeben. 100% entsprechen der optischen Dichte der Reaktion der Antikörper 6C5 und 4A6 mit der jeweiligen Aminosäuresequenz rHCN3₆₃₈₋₆₇₃ und rHCN2₄₂₆₋₄₅₁ (Säule 8). Auf der **Y-Achse** ist die Reaktion des Antikörpers mit den einzelnen Peptiden der Aminosäuresequenz rHCN3₆₃₈₋₆₇₃ und rHCN2₄₂₆₋₄₅₁ (Säulen 1-6) zu sehen. Die Säule 7 zeigt die nonspezifische Bindung des Antikörpers mit den Wänden der Reaktionsvertiefung der ELISA-Platte. Bordeauxrot ist der Antikörper 6C5 und blau der Antikörper 4A6 dargestellt.

Die Reaktion des Antikörpers 6C5 (bordeauxrote Säulen) liegt bei allen 6 einzelnen Peptiden (Säulen 1 bis 6) nur geringfügig über der nonspezifischen Bindung (Säule 7), während die Bindung an die Sequenz rHCN3₆₃₈₋₆₇₃ (Säule 8) deutlich über der der nonspezifischen Bindung liegt. Der Antikörper 6C5 ist folglich spezifisch für die 35 Aminosäuren umfassende Sequenz rHCN3₆₃₈₋₆₇₃ des HCN3-Kanalproteins und spezifisch für eine Konformation, die diese Aminosäuresequenz enthält.

Ergebnisse

Der Antikörper 4A6 hingegen, der zur Darstellung HCN2-immunpositiver Neurone eingesetzt wurde, ist spezifisch für das zweite Peptid, da die Reaktion des zweiten Peptids (Säule 2) höher als bei den übrigen einzelnen Peptiden (Säulen 1, 3, 4, 5 und 6) und über der nonspezifischen Bindung (Säule 7) liegt. Es liegt somit ein sequenzspezifischer Antikörper vor. Die Bindung an das gesamte „Mutterpeptid“ (Säule 8) liegt ebenfalls deutlich über der der nonspezifischen Bindung. Zusammenfassend lässt sich sagen, der Antikörper 6C5 ist spezifisch für die Aminosäuresequenz des HCN3-Kanalproteins und es liegt ein konformationsspezifischer Antikörper vor. In beiden Fällen wird die Aminosäuresequenz in der Homologiesuche mit anderen Sequenzen verglichen.

Epitopmapping weiterer HCN3-Antikörper

Für die Antikörper 4D9, 4F6 und 7H7 wurde ebenfalls ein Epitopmapping durchgeführt. Bei beiden Antikörpern handelt es sich um konformationsspezifische Antikörper, wobei eine Prävalenz des Ak 4D9 für das fünfte Peptid besteht (Abb. 14, Anhang). Der Antikörper 7H7 erzeugt zudem, wie in Säule 7 (Abb. 14, Anhang) zu sehen ist, bei der Reaktion mit dem Immunisierungspeptid einen höheren Hintergrund, als die anderen drei Antikörper.

Epitopmapping der HCN3-Antikörper 6C5, 4D9, 4F6, 7H7

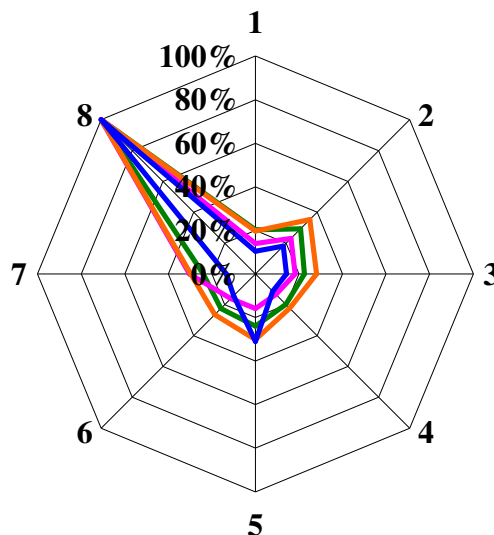


Abb. 11 Das Epitopmapping der Antikörper ist wie folgt farblich markiert: 6C5 4D9 4F6 7H7

Auf der zentralen Achse 1 ist die optische Dichte in Prozentzahlen angegeben. 100% entspricht der optischen Dichte der ganzen Aminosäuresequenz rHCN3₆₃₈₋₆₇₃ im Epitopmapping (Achse 8). Die Achsen 2-6 zeigen die Reaktion der Antikörper mit den einzelnen Peptiden. Die Achse 7 zeigt die nonspezifische Bindung der Antikörper mit den Wänden der Reaktionsvertiefung der ELISA-Platte.

3.1.4 Homologiesuche

Die Homologiesuche zeigt, dass die Aminosäuresequenz rHCN3₆₃₈₋₆₇₃ bisher nur in Bereichen gefunden wurde, wie beispielsweise im Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* und in einigen Pflanzenarten, die auf die immunhistochemische Darstellung des HCN3-Kanals im Nagergehirn keine Auswirkungen haben. Auch das Ergebnis der Homologiesuche spricht für die Spezifität des Antikörpers.

Die höchste Homologie weist das HCN3-Kanalprotein der Ratte mit dem hypothetischen, noch nicht vollständig charakterisierten Protein KIAA1535 und zweier Fragmente von ihm auf. Dabei handelt es sich um eine 55%ige Identität des gesamten Proteins KIAA1535 mit dem HCN3-Kanal der Ratte, wobei die Homologie des entsprechenden Abschnitts des gesamten hypothetischen Proteins mit dem HCN3-Kanal sogar 94,619 % beträgt. Die Fragmente des KIAA1535 zeigen eine noch höhere Homologie von 95,27 % und 96,02 % und sind im Anhang aufgeführt. Vermutlich handelt es sich bei dem vorliegenden hypothetischen Protein KIAA1535 um den HCN3-Kanal des Menschen.

Im Folgenden wird die Homologie des HCN3-Kanals der Ratte mit dem Protein KIAA1535 gezeigt. Das Zeichen „:“ bedeutet, es liegt eine sogenannte konservative Bindung vor. Das heißt das Basentriplett der unterschiedlichen DNAs codiert für die gleiche Aminosäure. Ein einfacher Punkt bedeutet, es liegt eine nichtkonservative Bindung vor, bei der im Basentriplett eine Base ausgetauscht ist und für eine andere, aber verwandte Aminosäure codiert. Zur Auswertung der Homologiesuche wurden nur die konservativen Bindungen gezählt, sodass bei dem Einbeziehen der nonkonservativen Bindungen eine noch größere Homologie zwischen dem HCN3-Kanal der Ratte und dem hypothetischen KIAA1535 Protein des Menschen besteht.

KIAA1535 Protein (446 AS) versus HCN3 Protein (780AS)

Es liegen 24 Abweichungen in einer 446 Aminosäuren langen Sequenz vor. Dies entspricht einer Diskrepanz von 5,381% und damit einer Homologie von 94,619%.

Scoring matrix: Blossum 62

Gap penalties: -12/-2

55.0% identity

Global alignment score: 217, Zeitpunkt: 22.11.02

```

323350 M-----
      :
      MEEEARPAVGDGEAATPARETPPAAPAQARAASGGVPESAPEPKRRQLGTLLOPTVNFKS
      10          20          30          40          50          60
323350 -----
  
```

Ergebnisse

```

LRVFGSHKAVEIEQERVKSAGAWIIHPYSDFRFYWDLIMLLLMVGNLIVLVPVGITFFKEE
      70          80          90          100         110         120

323350 -----
NSPPWIVFNVLSDTFFLLDLVLFNFRGTGIVVEEGAEILLAPRAIRTRYLRTWFLVDLISSI
      130         140         150         160         170         180

323350 -----
PVDYIFLVVELEPRLDAEVYKTARALRIVRFTKILSLRLRLSRLIRYMHQWEEIFHMT
      190         200         210         220         230         240

323350 -----
YDLASAVVRIFNLIQMMLLLCHWDGCLQFLVPMLODFPDCWVSMNRMVNHWSGROYSHA
      250         260         270         280         290         300

323350 -----
                                10         20         30
LFSMIVGATCYAMFIGHATALIQSLDSSRRQYQ
      310         320         330         340         350         360
      40         50         60         70         80         90
EKYKQVEQYMSFHKLTPADTRQRIHEYYEHRVYQKMFDEESILGELSEPLREEIINFTRCG
      370         380         390         400         410         420

323350 -----
                                100        110        120        130        140        150
LVAHMLPLFAHADPSFVTAVLTKLRFVFPQGDVVREGSVGRKMYFIQHGLLSVLARGAR
      430         440         450         460         470         480

323350 -----
                                160        170        180        190        200        210
DTRLTDGYSYFGEICLLTRGRRTASVRADTYCRLYSLSVDHFNVALEEFPMRRRAFETVAM
      490         500         510         520         530         540

323350 -----
                                220        230        240        250        260        270
DRLRLRIGKKNLQQRKRSEPSGSS--GGIMEQHLVQHDRDMARGVGRAPSTGAQLSGKP
      550         560         570         580         590         600

323350 -----
                                280        290        300        310        320        330
VLWEPLVHAPLQAAAVTSNVAIALTHQRGPLPLSPDSPATLLARSARRSAGSPASPLVPV
      610         620         630         640         650         660

323350 -----
                                340        350        360        370        380
RAGP-----WASTSRLPAPPARTLHASLSRAGRSQVSLLGPPPGGGRRRLGPRGRPLSA
      670         680         690         700         710         720

323350 -----
                                390        400        410        420        430        440
SQPSLPQRATGDGSPGRKSGSERLPPSGLLAKPPRTAQPPRPPVPEPATPRGLQLSANM
      730         740         750         760         770         780
SQPSLPQRATGDGSPRRKSGSERLPPSGLLAKPPGTVPQSRSSVPEPVTPRGPQISANM

```

3.1.5 Verschiedene Spezies und Fixierungen

Ein Antikörper gilt unter anderem auch dann als spezifisch, wenn er das gleiche Protein in unterschiedlichen Spezies erkennt und sichtbar macht. Die lichtmikroskopische Auswertung der Ergebnisse ergibt, wie im Bildteil dieser Arbeit (S.60-S.88) dokumentiert wird, das Vorkommen HCN31-immunpositiver Neurone in den gleichen Hirnarealen aller drei Nagetiere. Bei den der Ratte näher verwandten Spezies, wie dem Hamster, ist der nonspezifische Hintergrund durch den Sekundärantikörper Anti-Ratte etwas höher, als bei dem aus Südamerika stammenden Meerschweinchen. Bei der immunhistochemischen Darstellung des HCN3-Kanals im Meerschweinchenhirn ist, wie im Bildteil gezeigt wird, kaum nonspezifischer Hintergrund zu sehen.

Bei den unterschiedlichen Fixierungen (Abb. 12, 13) der Tiere sind HCN31-immunpositive Neurone in den gleichen Hirnarealen und mit ähnlicher Intensität detektiert worden. Auch diese Tatsache spricht für die Spezifität des Antikörpers 6C5 für den HCN3-Kanal.

In den Abbildungen 12 und 13 sieht man HCN3-immunpositive Neurone unterschiedlich fixierter Tiere.

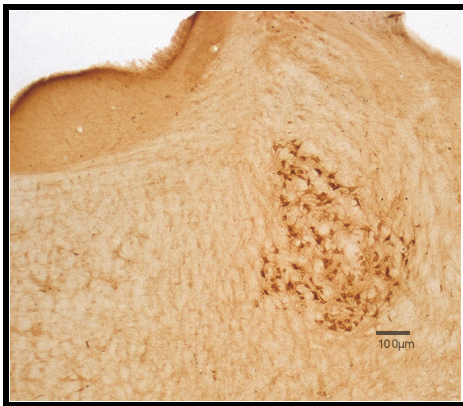


Abb. 12 zeigt den Nucleus motorius nervi trigemini einer mit modifizierter Zambonifixierung nach Görcs behandelten Ratte

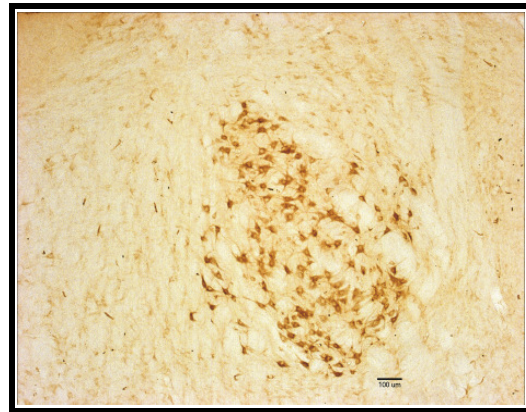


Abb.13 zeigt den Nucleus motorius nervi trigemini einer mit Acrolein fixierten Ratte

3.2 Fazit der Antikörpercharakterisierung

Zusammenfassend lässt sich sagen, aus den Ergebnissen der Nachweisverfahren zur Spezifität des Antikörpers 6C5 lässt sich schließen, dass dieser Antikörper spezifisch für die Aminosäuresequenz rHCN3₆₃₈₋₆₇₃ des HCN3-Kanalproteins ist.

Der synthetisierte und eingesetzte Antikörper 6C5 erkennt und bindet in der Absorptionskontrolle an die Aminosäuresequenz rHCN3₆₃₈₋₆₇₃, gegen die er in der Ratte synthetisiert worden ist. Im Westernblot der Rattenretina wird der HCN3-Kanal durch den Antikörper 6C5 spezifisch nachgewiesen. Im Epitopmapping zeigt sich, dass der Antikörper

6C5 für das diskontinuierliche Epitop der Aminosäuresequenz rHCN3₆₃₈₋₆₇₃ spezifisch ist. Diese Aminosäuresequenz kommt nach heutigem Kenntnisstand nur im HCN3-Kanalprotein der Ratte und des Menschen und in Bereichen der Natur vor, die auf die immunhistochemische Darstellung des HCN3-Kanals im Nagergehirn keine Auswirkungen hatten.

3.3 Ergebnisse der Spezifitätskontrolle der Methode

3.3.1 Reagenzienkontrolle

Das Ergebnis der Reagenzienkontrolle zeigte neben einem niedrigen homogenen Hintergrund keine Färbung des Gewebes, wodurch eine nonspezifische Bindung des Sekundärantikörpers und des Avidin-Biotin-Komplexes zu Proteinen im Gewebe ausgeschlossen werden kann (Ergebnisse sind nicht gezeigt).

3.3.2 Substitutionskontrolle

Die Substitutionskontrolle ergab einen gleichbleibend gering erhöhten Hintergrund im Gewebe, sodass der verwendete Sekundärantikörper in der immunhistochemischen Methode eingesetzt werden konnte (Ergebnisse sind nicht gezeigt).

3.3.3 Absorptionskontrolle

Das Ergebnis der Absorptionskontrolle zeigt eine leichte immunhistochemische Färbung der den HCN3-Kanal enthaltenden Neurone. Es lässt sich eine höhere Affinität des Primärantikörpers zu der Konformation der Aminosäuresequenz rHCN3₆₃₈₋₆₇₃ im Gewebe schlussfolgern (Ergebnisse sind nicht gezeigt).

3.4 Immunologische Detektion des HCN3-Kanals

HCN3-Immunpositivität wird in vielen unterschiedlichen Neuronengruppen des Nagergehirns gefunden. Besonders der Hirnstamm mit seinen motorischen Hirnnervenkernen, der Nucleus reticularis thalami und der Nucleus supraopticus zeigen HCN3-Immunpositivität. Im Folgenden werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Versuche beschrieben und in einer an der Neuroanatomie orientierten Übersichtstabelle exemplarisch für die Ratte und das Meerschweinchen zusammengefasst. Es werden nur HCN3-immunpositive Regionen aufgeführt und Regionen. Dabei bedeuten ++++ eine starke, +++ eine mittlere, ++ eine schwache, + eine sehr schwache und 0 keine Immunpositivität.

Ergebnisse

<u>HCN3</u>	<u>Ratte</u>	<u>Meer- schweinchen</u>
<u>Neocortex</u>		
Laminae I-VI	++++	++++
Cortex piriformis	++++	++
<u>Septum und basales Vorderhirn</u>		
Nucleus septi medialis	+++	+++
Pars dorsalis	+++	+++
Pars intermedialis	+++	+++
Pars ventralis	+++	+++
Nucleus septi lateralis	+	+
Diagonales Band von Broca	+++	+++
Pars horizontalis	+++	+++
Pars verticalis	+++	+++
<u>Basalganglien</u>		
Globus pallidus	++++	+++
Ventrales Pallidum	+++	++
Nucleus subthalamicus	+++	++
<u>Hippocampus</u>		
CA1		
Stratum oriens	+	+
Stratum pyramidale	++++	++++
CA2		
Stratum oriens	++	+
Stratum pyramidale	++++	++++
CA3		
Stratum pyramidale	++++	++++
Gyrus dentatus		
Stratum moleculare	++	++
Subiculum	++++	+++
<u>Thalamus</u>		
Nucleus anterodorsalis thalami	++++	++++
Nucleus ventralis posteromedialis	+++	+++
Nucleus ventralis posterolateralis	+++	+++
Nucleus mediodorsalis	++	++
Nucleus reuniens	+++	+++
Nucleus suprageniculatus	++	++
Nucleus angularis	+++	
Nucleus paraventricularis	++	+
Nucl. subparafasciculatus parvicellularis	++++	+++
Nucleus reticularis thalami	++++	++++
Zona incerta	+++	++++
<u>Metathalamus</u>		
Corpus geniculatum laterale	++	++
Corpus geniculatum mediale	+++	+++
<u>Hypothalamus</u>		
Nucleus paraventricularis	+++	+++
Nucleus supraopticus	++++	++
Nucleus mamillaris lat.	++++	++++
Nucleus mamillaris medialis	+++	+++
Area hypothalamica anterior	++	++-++++
<u>Hirnstamm</u>		
<u>Mesencephalon</u>		
Nucleus ruber	++++	+++-++++
Pars magnocellularis	++++	++++
Pars parvicellularis	++++	+++
Nucleus praerubralis	++++	++++
Nucleus pararubralis/retrorubralis	+++	++++
<u>Substantia nigra</u>		
Pars compacta	+++	+++

Ergebnisse

Pars reticularis	++++	++++
Pars lateralis	++++	++++
Nucleus interpeduncularis	+-++++	+++
Colliculus superior		
Stratum zonale	+	+
Stratum griseum superficiale	++	+++
Stratum opticum	+	+
Stratum griseum medius	+	+
Stratum album medius	+++	++
Stratum griseum profundum	+++	+++
Stratum album profundum	+	++
Nucleus oculomotorius acc. EW	++	++
Nucleus Darkschewitsch	++	++
Nucleus oculomotorius	++++	++++
Nucleus trochlearis	+++	++++
Nucleus paratrochlearis	+++	+++
Colliculus inferior	+++	+++
Nucleus mesencephalicus n. V	+++	+++
Nucleus parabigeminalis	+++	+++
Cerebellum		
Stratum moleculare	++	++
Purkinjezellen	+++	+++
Stratum granulosum	++	+++
Nucleus cerebellaris lateralis	+++	++++
Pons		
Nucleus pontis	++++	++++
Nucleus parabrachialis medialis	+++	+++
Nucleus tegmentalis ventralis	++++	++++
Griseum centrale	+-++	++
Nucleus lemniscus lat.	++++	++++
Nucleus motorius nervi V	++++	++++
Nucleus olivaris superior	++++	++++
Pars medialis	++++	++++
Pars lateralis	++++	++++
Nucleus paraolivaris superior	++++	++++
Nucleus paraolivaris dorsalis	++++	++++
Nucleus periolivaris medioventralis	++++	++++
Nucleus periolivaris lateroventralis	++++	++++
Nucleus corporis trapezoidei	++++	++++
A5 Noradrenerge Zellen	++++	++++
Medulla oblongata		
Nucleus spinalis nervi V	++++	++++
Nucleus nervi abducentis	++++	++++
Nucleus nervi facialis	++++	++++
Nucleus accessorius nervi facialis	++++	++++
Nucleus prepositus hypoglossi	++++	++++
Nucleus cochlearis dorsalis	++++	+++
Nucleus cochlearis ventralis	++++	+++
Nucleus salivatorius superior	++++	+++
Nucleus salivatorius inferior	++++	++++
Nucleus vestibularis med.	++	+++
Nucleus vestibularis lat.	++	+++
Nucleus vestibularis inf.	++	++
Nucleus vestibularis sup.	+++	++++
Nucleus ambiguus	++++	++++
Nucleus nervi hypoglossi	++++	++++
Nucleus tractus solitarius	+-++++	+-++++
Nucleus cuneatus	++	+++
Nucleus gracilis	+++	+++
Nucleus cuneatus externus	+	+
Nucleus dorsalis n. vagi	+-++++	+++

Ergebnisse

A1/A2/A5 Noradrenerge Zellen	++-++++	++-++++
Nucleus reticularis gigantocellularis	++++	++++
<u>Rückenmark</u>		
α-Motoneurone	++++	++++
γ-Motoneurone	++++	++++

Cerebraler Cortex

In weiten Teilen des cerebralen Cortex sind stark HCN31-immunpositive Neurone gefunden worden. Auf allen Schnitten der drei Nagergehirne besteht eine Präferenz für die Schichten II, III und IV. Dabei sind sowohl die Zellsomata (ca. 10 µm im Durchmesser) als auch Fortsätze über einen langen Abschnitt intensiv angefärbt. Die Form der Somata variiert kaum, so dass vermutet werden kann, dass es sich überwiegend um die gleiche Art von Neuronen handelt. Eine genaue Zuteilung der verschiedenen Cortexareale zu funktionellen Cortexabschnitten wurde nicht vorgenommen. Der Cortex piriformis (Fotos 3 und 4, S. 60) ist gleichermaßen in mittlerer Intensität HCN31-immunpositiv.

Nuclei septi und basales Vorderhirn

Die Nuclei septi medialis (Foto 8, S.60) und lateralis zeigen eine unterschiedliche Immunreaktion. Während im Nucleus septi medialis eine mittlere Immunreaktion zu finden ist, ist der Nucleus septi lateralis in der Pars dorsalis nur sehr schwach und zum Teil nicht angefärbt (nicht gezeigt). Die HCN31-Immunpositivität war sehr intensiv in allen drei Teilen des Nucleus septi medialis, im ventralen, dorsalen und intermediären Teil. Intensive HCN31-Immunpositivität wurde sowohl im horizontalen, als auch im vertikalen Teil des diagonalen Bandes von Broca beobachtet (Fotos 5, 6 und 7, S.60). Hier sind viele kleine ovale Zellen angefärbt, die dicht gedrängt aneinander liegen. Der Nucleus triangularis septi ist ebenfalls HCN31-immunpositiv (nicht gezeigt). Beim Hamster ist diese Region insgesamt schwächer HCN31-immunpositiv.

Basalganglien

Die Basalganglien zeigen ein charakteristisches Immunreaktionsmuster. In allen Gehirnen der drei Nagerarten ist der Globus pallidus deutlich HCN31-immunpositiv (Fotos 11, 12, 14, 15, 16, S.61). Mittlere feingranulierte membranassoziierte Immunpositivität zeigen einige kleine Zellen des Nucleus subthalamicus (Foto 13, S.61).

Hippocampus

Der Hippocampus ist ein Hirnareal in dem mehrfach und ausführlich Ih-Ströme beschrieben wurden (Lupica et al, 2001; Bräuer, 2001; Vasilyev et al. 2002). Mit dem in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Antikörper ist es gelungen, deutlich HCN31-immunpositive Neurone im Stratum pyramidale der CA1 (Fotos 17 und 18, S.62), CA2 und CA3 Region aller drei Nagetiere zu finden. Bei diesen Neuronen handelt es sich aufgrund der Lokalisation

Ergebnisse

überwiegend im Stratum pyramidale und aufgrund ihrer ovalen bis pyramidenförmigen Zellsomata wahrscheinlich um Pyramidenzellen. Auch im Gyrus dentatus (nicht gezeigt) und im Subiculum wurde starke HCN31-Immunpositivität detektiert (Fotos 19 und 20, S.62). Die Zellsomata sind hier ebenfalls oval- bis pyramidenförmig und im Stratum pyramidale gelegen, weswegen es sich wahrscheinlich auch hier um Pyramidenzellen handelt. Jedoch sind die HCN31-immunpositiven Fortsätze über eine weniger lange Strecke zu verfolgen, als die Neurone im Stratum pyramidale der CA1-3 Region.

Metathalamus

Im Metathalamus, bestehend aus den Corpora geniculatum laterale und mediale, sind beide spezifischen Kerne intensiv immunhistochemisch angefärbt. Das zum auditiven System gehörende CGM zeigt in allen drei Spezies eine ausgeprägte plasmamembranassoziierte Färbung der Zellsomata und einer zipfeligen membranären Ausziehung, vermutlich des Axonhügels, wobei der perinukleäre und nukleäre Bereich keine Färbung aufweisen (Fotos 21-24, S.63). Das zum visuellen System gehörende CGL ist weniger stark HCN31-immunpositiv. Die circa 10µm großen Neurone sind ebenfalls plasmamembranassoziiert angefärbt, eine immunhistochemische Darstellung des Axonhügels bleibt jedoch aus (Fotos 25, 26, S. 63).

Thalamus

Im spezifischen Thalamus sind die zum limbischen System gehörenden Nuclei anteriores thalami im anterodorsalem Teil stark HCN31-immunpositiv gefärbt. Dicht gedrängt liegen die Somata nebeneinander, während keine Anfärbung von Fortsätzen beobachtet werden konnte (Fotos 27, 28, S.64). In der medialen Kerngruppe, die vor allem mit dem frontalen Cortex verbunden ist, ist keine HCN31-Immunpositivität zu finden. Auch der Nucleus anteroventralis, der sich in den prämotorischen Cortex projiziert, zeigt keine HCN31-Immunreaktion. Hingegen ist im Nucleus ventralis posterolateralis (Fotos 29, 30, S. 64) und im Nucleus ventralis posteromedialis (Fotos 31, 32, S. 64) mittlere HCN3-Immunpositivität zu finden. Ebenso ist der Nucleus mediodorsalis in seiner pars lateralis (MDL) bei allen drei Spezies schwach HCN31-immunpositiv (Fotos 33, 34, S. 64). Von den kleineren Kernen der Mittellinie, dem Nucleus rhomboidalis, dem Nucleus reuniens und dem Nucleus paratenialis, ist nur der im weiter caudal liegende Nucleus reuniens thalami in mittlerer Intensität HCN31-immunhistochemisch gefärbt (Foto 37, S.65). Der Nucleus reuniens ist nicht nur HCN31-immunpositiv, sondern auch durch andere Verfahren den HCN3-Kanal enthaltend beschrieben worden (Moosmang, 2000). Aus der Gruppe der Nuclei posteriores, den zellreichen Nucleus suprageniculatus und limitans, sowie den unscharf begrenzten Nucleus

Ergebnisse

posterior umfassend, ist der Nucleus suprageniculatus schwach HCN31-immunpositiv (Foto 39, S. 65), in dem auch amplifiziertes HCN3mRNA-Signal gefunden worden ist (Monteggia, 2000). Das zu den unspezifischen Thalamuskernen gehörende Pulvinar zeigt keine HCN31-Immunpositivität. Die Nuclei intralaminares des unspezifischen Thalamus, die zum aufsteigenden retikulären System gehören, das unter anderem an der Regulierung des Schlaf-Wachrhythmus beteiligt ist, sind nur sehr schwach und zum Teil nicht HCN31-immunpositiv. Der Nucleus reticularis thalami bildet die dünne laminäre Schicht lateral von der Lamina medullaris externa und zeigt ebenfalls starke HCN31-Immunpositivität. Hier sind nicht nur die Zellsomata gefärbt, sondern auch viele neuronale Zellfortsätze (Fotos 45-48, S. 66). Der Nucleus paraventricularis mit seiner Pars anterior und Pars posterior (Fotos 42, 43, S. 66) und der Nucleus subparafasciculatus pars parvicellularis (Foto 44, S. 66) reagieren mittel bis schwach HCN31-immunpositiv. Keine HCN3-Immunpositivität wurde hingegen im Nucleus geniculatus ventrolateralis und im Nucleus ethmoidalis thalami gefunden. Der sehr kleine weit caudal im Thalamus liegende Nucleus angularis thalami ist nur bei der Ratte getroffen und mittel stark HCN31-immunpositiv (Fotos 41, 42, S. 66).

Regio subthalamica

In der Zona incerta (Fotos 35, 36, S.65) sind einige verschiedene unterschiedlich große Neurone stark HCN31-immunpositiv. Es sind die Zellsomata kleiner ovaler und größerer pyramidenförmiger Neurone sowie membranäre Ausziehungen gefärbt.

Hypothalamus

In der Area hypothalamica anterior sind die dem neuroendokrinen System angehörenden Nuclei supraopticus und paraventricularis (Fotos 54-57, S.67-68) stark HCN31-immunpositiv. Zudem zeigt diese Region, wie auch mit anderen immunohistochemischen Verfahren gezeigt wurde (Tabelle S. 95) HCN31-immunpositive Reaktion (Fotos 62, 63, S.68). Sehr deutlich hervortretende Immunreaktion ist in allen drei Nagergehirnen im Nucleus supraopticus zu sehen (Fotos 58-61, S.68). Die circa 20 µm großen fast kreisrunden Neurone zeigen eine membranständige, feingranulierte Färbung mit Aussparung der nukleären Zone im Zellsoma und der Fortsätze. Das Corpus mamillare zeigt als einzige Struktur der Regio hypothalamica posterior HCN31-Immunpositivität. Dabei sind der laterale Teil der Pars medialis (Foto 53, S.67) und die Pars lateralis mit zahlreichen, diffus verteilten, HCN31-immunpositiven, kleinen Neuronen gefärbt (Fotos 49-52, S.67).

Mesencephalon

Die höchste Intensität der HCN31-Immunreaktion im Mesencephalon zeigt sich in der Substantia nigra pars reticularis und pars lateralis, dem Nucleus oculomotorius, dem Nucleus

ruber pars parvicellularis und magnocellularis, dem Nucleus praerubralis, dem Nucleus mesencephalis nervi trigemini, dem Colliculus inferior und dem Stratum griseum profundum des Colliculus superior.

Hirnstamm

Ein sehr weitgestreutes Reaktionsmuster der HCN31-Immunreaktion findet sich im Hirnstamm, wo insgesamt das meiste HCN31-Immunsignal gefunden wurde. Intensive Immunreaktion zeigte die Substantia nigra (Fotos 64-69, S.69). Die Pars reticularis (Foto 64, S.69) und die Pars lateralis (Fotos 68, 69, S.69) sind stark HCN31-immunpositiv, wohingegen die Pars compacta (Fotos 66, 67, S.69) nur in mittlerer Intensität mit dem Antikörper 6C5 reagiert.

Ein sehr starkes HCN31-Reaktionsmuster bildet der Nucleus oculomotorius der Ratte (Foto 88, S.71) und des Hamsters (Foto 87, S.71), dessen Neurone stark HCN31-immunpositiv sind. Der dem Nucleus oculomotorius mediodorsal anliegende parasymphatische Nucleus oculomotorius accessorius Edinger-Westphal (Fotos 70-71, S.69), der die glatten Augenmuskeln, den Musculus ciliaris und den Musculus sphincter pupillae innerviert, sowie der Nucleus Darkschewitsch (Foto 71, S. 69) sind bei allen drei Spezies schwach bis mittel HCN31-immunpositiv. In mittlerer Intensität reagierten der Nucleus interpeduncularis pars lateralis der Ratte (Foto 83, S.71) und des Meerschweinchens (Fotos 80-81, S.71), der Nucleus parabrachialis und das Stratum griseum medium des Colliculus superior. Im Colliculus superior zeigt nur das Stratum griseum profundum intensiv gefärbte, dicht aneinander liegende, HCN31-immunpositive Neurone (Foto 84, S.71). Schwach gefärbt sind hingegen die wenigen Neurone im Stratum album profundum (Foto 102, S.73) und Stratum griseum medium (Fotos 85, 86, S.71). Die anderen Schichten sind frei von HCN31-Signal. Auch der Nucleus parabrachialis mit einigen großen und mehreren kleinen HCN31-immunpositiven Neuronen (Foto 89, S. 72) sowie der Nucleus trochlearis des Meerschweinchens sind HCN31-immunpositiv, wohingegen das HCN31-Signal des gleichen Kerns des Hamsters schwächer ausfällt (Fotos 90-92, S. 72). Auch im Nucleus paratrochlearis der Ratte (Fotos 93-94, S.72) und des Hamsters (Fotos 95-97, S.73) sind einige wenige ovale Neurone immunhistochemisch angefärbt. Der Colliculus inferior mit intensiv immunhistochemisch gefärbten Neuronen (Foto 97, S.73) zeigt zwei unterschiedliche Neuronenpopulationen, die aus großen (40µm) intensiv gefärbten und kleineren (20µm) schwächer gefärbten Neuronen bestehen. Von rostral bis caudal ist der Nucleus mesencephalicus nervi trigemini mit großen, fast kreisrunden, in ihrer Form für diese Region sehr typischen, HCN31-immunpositive Neuronen zu sehen.

Cerebellum

Das Verteilungsmuster der HCN31-Immunreaktion im Cerebellum zeigt sowohl intensiv gefärbte, runde Purkinjezellen, die im Stratum ganglionare dicht aneinandergereiht liegen, als auch deren verzweigte Dendritenbäume, die weit ins Stratum moleculare reichen (Foto 143, S.80). Die von den Körnerzellen des Stratum granulosum ausgehenden Parallelfasern konnten im Stratum moleculare nicht immunhistochemisch auffindig gemacht werden. Im faserreichem Stratum moleculare sind auch einige, wenngleich schwächer angefarbte, ovale Somata zu sehen (Fotos 143-145, S. 80). Im Stratum granulosum sind nur wenige mittel HCN31-immunpositive Zellen zu sehen, bei denen es sich wahrscheinlich um die inhibitorischen Golgizellen handelt (Fotos 146, 147, S. 80). Von den Kleinhirnkernen ist der Nucleus cerebellaris lateralis bei allen drei Spezies stark HCN31-immunpositiv (Foto 148, S.80).

Pons und Medulla oblongata

Viele Kerne der Pons und der Medulla oblongata reagieren mit dem Antikörper 6C5. Das Corpus trapezoideum, der Nucleus nervi facialis (Foto 110, S.75), der Nucleus accessorius nervi facialis (Foto 110, S.75), der Olivarkomplex mit dem Nucleus olivaris superior pars lateralis und pars medialis, dem Nucleus paraolivaris superior und dorsalis, sowie den Nuclei periolivares medioventrales und lateroventrales (Fotos 118-122, S.76) sind gegenüber dem niedrigen, homogenen Hintergrundsignal stark HCN31-immunpositiv. Ebenso zeigt das Verteilungsmuster des HCN31-Immunsignals auf Höhe des Genu nervi facialis (Foto 130, S.78) eine starke Immunreaktion einiger Hirnareale mit dem Antikörper. Die kleinen parasymphatischen Nuclei salivatorii superiores und inferiores sind nicht vollständig auf allen Präparaten angeschnitten und daher auch nur mit wenigen, aber intensiv gefärbten HCN31-immunpositiven Neuronen zu sehen (Fotos 131-133, S.78). Der Nucleus solitarius, der den Kern des sensorischen Anteils des Nervus facialis darstellt, die Kerne des Nervus vestibulocochlearis, die Nuclei vestibulares (Fotos 161-164, S.83) und die Nuclei cochleares sind ebenfalls stark HCN31-immunpositiv (z.B. Fotos 155,165, S.82). Auch der Nucleus motorius nervi trigemini ist auf unterschiedlichen Präparaten (Fotos 136-142, S.79) zwischen dem Fasciculus longitudinalis medialis und dem Pedunculus cerebri superior stark HCN31-immunhistochemisch angefarbt. Auffallend sind die feinen Granulationen und die deutliche Aussparung des HCN31-immunhistochemischen Signals um den Nucleus.

Schwache bis mittlere Immunpositivität wurde hingegen im Nucleus principalis nervi trigemini (Foto 110, S.75), in Neuronen des Zentralen Grau (Fotos 115-116, S.75), im Nucleus parabrachialis pontis (Fotos 128-129, S.77), im Nucleus lemniscus lateralis, in den

Nuclei pontis und den Neuronen des Nucleus tegmentalis ventralis (Fotos 106-107, S.74) entdeckt. Von den sechs noradrenergen Neuronenpopulationen des ZNS zeigen die noradrenergen Zellen (A5) aller drei Spezies ein deutliches HCN3l-positives immunhistochemisches Signal, sowohl der Zellsomata als auch der Fortsätze (Fotos 110-113, S.75). Der Nucleus interpeduncularis pontis der Ratte zeigt einige homogene, aber schwach angefärbte Neurone umgeben von einem hohen Hintergrund (nicht gezeigt). Ebenso verhält es sich mit dem Nucleus dorsalis nervi vagi (Foto 181, S. 85), der neben den Nuclei salivatorii inferiores und superiores und dem Nucleus oculomotorius accessorius Edinger-Westphal das vierte parasymphatische Kernzentrum des Hirnstamms darstellt.

Rückenmark

Im Rückenmark aller drei Nagetierarten sind zwei Gruppen motorischer Neurone immunhistochemisch angefärbt. Gezeigt werden Querschnitte des Rückenmarks der Ratte und des Hamsters (Fotos 192-194, S.87). Hierbei handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit zum einen um die kleineren weiter medial im Vorderhorn liegenden γ -Motoneurone, die für die Erregung der in den Muskelspindeln gelegenen Muskelfasern zuständig sind, sowie die größeren multipolaren α -Motoneurone, deren Somata und Fortsätze eine feine immunhistochemische Granulierung und eine noch stärkere Immunfärbung aufweisen. In der Vergrößerung (Foto 193, S.87) sieht man deutlich nukleäre Aussparungen des immunhistochemischen Signals. Auch die kleinen Neurone des Nucleus motorius nervi trigemini reagieren mit dem Antikörper 6C5 und sind schwach immunhistochemisch gefärbt (Fotos 196, 197, S.87).

3.5 Lichtmikroskopische Darstellung HCN3l-immunpositiver Neurone

Atlasfiguren des Rattengehirns und Fototeil

Im folgenden Bildteil werden die Ergebnisse dieser Arbeit photographisch dokumentiert. Da die Versuche zum größten Teil mit Ratten durchgeführt wurden, liegt der Schwerpunkt der bildlichen Dokumentation in der vollständigen Präsentation der Ergebnisse HCN3l-immunpositiver Neurone im Rattengehirn. Um die Spezifität des Antikörpers 6C5 für den HCN3-Kanal zu belegen, werden sehr viele HCN3l-immunpositive Hirnareale zweier weiterer Spezies, des Meerschweinchens und des Hamsters, zum Vergleich hinzugefügt. Bei den erstellten Gewebeschnitten handelt es sich zum größten Teil um Coronarschnitte. Die Photographien werden daher analog zur Schnittrichtung von rostral nach caudal gezeigt. Zur neuroanatomischen Orientierung und zum topographischen Vergleich der einzelnen Hirnareale sind den Photographien Auszüge aus einem Rattengehirnatlas (Paxinos and Watson, 1998) vorangestellt.

4. Diskussion

Die Charakterisierung eines geeigneten Antikörpers zur immunhistochemischen Darstellung des HCN3-Kanals im Nagerhirn ist erst kürzlich erstmalig beschrieben worden und gelang auch in dieser Arbeit. Die Distribution des HCN3-Kanals stimmt mit den Ergebnissen einer der molekularbiologischen Arbeiten, den der elektrophysiologischen Untersuchungen gefundenen Verteilungsmustern der I_h -Ströme und der immunhistochemischen Distribution in großen Teilen überein und geht über die bisherigen Beschreibungen dieser Ströme hinaus.

4.1 Der HCN3-Kanal im zentralen Nervensystem

4.1.1 Vergleich von immunhistochemischen und elektrophysiologischen Daten

Die Ergebnisse der Immunhistochemie zeigen, dass der HCN3-Kanal im Gehirn des Hamsters, der Ratte und des Meerschweinchens in vielen verschiedenen neuronalen Systemen vorkommt. In vielen dieser HCN3-immunpositiven Hirnregionen wurden auch native I_h -Ströme beschrieben.

Cerebraler Cortex

In weiten Teilen des Cortex cerebri wurde HCN3-Immunreaktivität gefunden. Auch elektrophysiologisch konnte dort das Vorliegen des I_h -Stroms nachgewiesen werden (Solomon und Nerbonne, 1993; Budde et al, 1994). In der Lamina II des entorhinalen Cortex wurden I_h -Ströme beobachtet, die zur Bildung von Theta-Rhythmizität im entorhinalen-hippocampalen Netzwerk beitragen (Richter et al, 2000). In der Lamina V des Cortex besteht eine hohe Dichte an I_h -Stömen in den distalen Dendriten der Pyramidenzellen. Dort verstärkt I_h die bidirektionale Abschwächung in somatofugaler und somatopetaler Richtung von spontanen exitatorischen postsynaptischen Potentialen (sEPSPs) (Berger et al, 2001). Auch in den Pyramidenzellen selbst ist der I_h -Strom nachgewiesen (Williams und Stuart, 2000), wo ebenfalls starke HCN3-Immunreaktion zu finden ist. Eine pharmakologische Erhöhung von I_h in den Dendriten cortikaler Pyramidenzellen reduziert deren Erregbarkeit, wodurch I_h auch eine besondere Bedeutung in der Genese von Epilepsien beigemessen wird (Poolos et al, 2002).

Hippocampus

Auch im Hippocampus wurden I_h -Ströme mehrfach beschrieben (Bräuer A et al, 2001). Dort modulieren über den Einfluss auf I_h verschiedene Neurotransmitter den

Informationsfluss durch den hippocampalen Kreislauf und spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle neuronaler Aktivität. In den Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippocampus der Ratte hebt Serotonin die Aktivierungskurve von I_h zu positiveren Potentialen an und erhöht den maximalen Ionenfluss des I_h -Stroms (Gasparini und DiFrancesco, 1999).

In hippocampalen Interneuronen des Stratum oriens der CA1-Region ist ein langsam depolarisierender Einwärtsstrom beobachtet worden, der durch Hyperpolarisation aktiviert, von Natrium- und Kaliumionen getragen und selbst durch langanhaltende Hyperpolarisation nicht deaktiviert wird (Maccaferri und McBain, 1996). Dieser Strom ist unempfindlich gegenüber Barium und kann durch Caesium und ZD7288 blockiert werden, weist also die typischen Eigenschaften des I_h -Stroms auf. Im Hippocampus machen inhibitorischen Interneurone nur etwa 10-20% der Neuronenpopulation aus (Svoboda und Lupica, 1998) und die Mehrzahl der Interneurone in der CA1-Region exprimiert I_h (Lupica et al, 2001). Die inhibitorischen Interneurone haben eine wichtige Funktion in der Kontrolle der Aktivität des Hippocampus und stehen mit Hunderten von principalen Neuronen in synaptischer Verbindung. Im Hinblick auf ihre Membraneigenschaften, Transmitterempfindlichkeit und ihren Neuropeptidgehalt sind sie zwar sehr heterogen, gemeinsam ist ihnen jedoch die Freisetzung inhibitorischer Transmitter wie beispielsweise GABA und die darauffolgende Hemmung neuronaler Aktivität.

Geht ein hemmendes Signal in ein inhibitorisches Interneuron ein, entsteht eine verstärkte Erregbarkeit der mit ihm in Verbindung stehenden postsynaptischen Neurone. Auf diese Weise kann in einem Netzwerk inhibitorischer Interneurone durch hemmenden Einfluss wiederum eine Desinhibition, also eine Excitation erfolgen. Opioide hemmen über Opioid-Rezeptoren, G_i/G_o -gekoppelte Rezeptoren sowohl die Adenylatcyclase, als auch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (VDCCs) im zentralen und peripherem Nervensystem (Childers, 1993; Moises et al, 1994). So werden über die Adenylatcyclase durch Opioide auch die inhibitorischen Interneurone des Hippocampus gehemmt. Die Reduktion des I_h führt zu einer reduzierten Freisetzung des inhibitorischen Transmitters GABA. Dies führt wiederum zu einer gesteigerten Aktivität der Pyramidenzellen in der CA1-Region des Hippocampus (Svoboda und Lupica, 1998). Auch immunhistochemisch wurden kleine, ovale Zellen im Stratum oriens der CA1-Region HCN31 angefärbt, bei denen es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um die inhibitorischen Interneurone handelt. Zudem führen Läsionen des entorhinalen Cortex und Unterbrechungen der entorhinalen-hippocampalen

Fasern zu einer spezifischen Verringerung der mRNA Expression des HCN1-Kanals in CA1-CA3, nicht jedoch des HCN2-, HCN3- oder HCN4-Kanals (Bräuer et al, 2001).

Thalamus

Ein besonders gut erforschtes Gebiet ist der Thalamus, wo I_h -Ströme mehrfach als Generator rhythmischer, elektrischer Entladungen charakterisiert wurden (Munsch und Pape, 1999). Ein wichtiges Merkmal des thalamocorticalen Netzwerks ist die Erzeugung verschiedener synchroner Oszillationsmuster. Neben dem Nucleus reticularis thalami (Franz et al, 2000), einem Areal, das auch eine deutliche HCN31-Immunpositivität zeigt, ist I_h auch in thalamocorticalen Zellen nachgewiesen. Hier bewirkt der Ionenstrom spindelförmige Oszillationen, die in der frühen Phase des Schlafes auftreten. Die spindelförmigen Oszillationen werden bidirektional von thalamocorticalen Zellen und vom Nucleus reticularis thalami erzeugt und weisen eine starke Periodizität von 5-20 Sekunden auf. Calcium bewirkt in diesem Areal über einen noch ungeklärten Mechanismus eine Verstärkung von I_h (Lüthi und McCormick, 1998). Auch in anderen Teilen des Thalamus, wie beispielsweise im ventrobasalen Komplex (Williams et al, 1997), sind I_h -Ströme nachgewiesen worden. Hier zeigt sich jedoch keine HCN31-Immunreaktion. Im Nucleus anterodorsalis bewirkt Serotonin über 5-HT₇-Rezeptoren cAMP-abhängig, aber Proteinkinase A-unabhängig eine Depolarisation durch Erhöhung des I_h (Chapin und Andrade, 2001).

Hypothalamus

Magnocelluläre, neurosekretorische Zellen des Hypothalamus sind für die Synthese und Freisetzung der Hormone Vasopressin und Oxytocin verantwortlich. Die Sekretion der in den Zellsomata synthetisierten und in Vesikeln zum terminalen Axonende transportierten Hormone wird durch die Ankunft von Aktionspotentialen getriggert. Änderungen in der Oszillierungsrate und im Oszillierungsmuster sind daher für die neuronale Antwort auf physiologische und pathologische Reize von großer Bedeutung. Im Nucleus supraopticus der Ratte wurden nicht nur I_h -Ströme (Ghamari-Langroudi und Bourque, 2000), sondern auch eine starke HCN31-Immunreaktion gefunden (Fotos 57-61, S.69).

Mesencephalon

Im Mesencephalon wird in dopaminergen Neuronen der I_h -Strom in unterschiedlicher Dichte vorliegend beschrieben, was mit der unterschiedlichen pathophysiologischen Antwort dopaminergener Zellen auf metabolischen Stress zurückgeführt werden könnte (Neuhoff et al, 2002). In der Substantia nigra pars compacta ist der I_h -Strom ebenso

beschrieben worden. Dort erniedrigt Neurotensin über Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) die I_h Leitung. Auch Noradrenalin und Dopamin erzeugen in diesem Hirnareal eine Hemmung des I_h -Stroms (Cathala und Paupardin-Tritsch, 1997, 1999). Der durch Hyperpolarisation ausgelöste I_h -Strom ist wiederum in dopaminergen Zellen der Substantia nigra pars compacta maßgeblich an einer intrazellulären Erhöhung der Natriumionen beteiligt, wodurch eine Lücke postsynaptischer Aktivität erklärt werden könnte (Knöpfel et al, 1998). In diesem Hirnareal ist neben anderen Basalganglien eine deutliche HCN31-Immunreaktion gefunden worden (Fotos 64-69, S. 70).

Cerebellum

Der I_h -Strom ist zudem in den Purkinjezellen des Cerebellum (Li et al, 1993) und in präsynaptischen Enden cerebellarer Korbzellen der Maus nachgewiesen worden, wo eine Blockierung des I_h -Stroms durch den selektiven Blocker ZD7288 eine deutliche Reduzierung der Amplitude und Frequenz spontaner inhibitorischer postsynaptischer Potentiale in Purkinjezellen bewirkte. Hier spielen I_h -Ströme möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Modulierung zentraler synaptischer Übertragung (Southan et al, 2000). Auch immunhistochemisch sind die Purkinjezellen aller untersuchten Nagetierarten stark positiv (Fotos 143-145, S. 81)

Pons und Medula oblongata

Auch in Neuronen des Tegmentum ventralis sind I_h -Ströme gefunden worden. Dort werden sie durch Dopamin und Baclofen über Dopamin D_2 - und $GABA_B$ (γ -Aminobuttersäure)-Rezeptoren spannungsunabhängig und ohne Einbeziehung des cAMP gehemmt (Jiang et al, 1993). Auch im respiratorischen System wird dem I_h -Strom eine große physiologische Bedeutung in der Erzeugung des respiratorischen Rhythmus beigemessen. Dieser Rhythmus besteht aus drei Phasen: der Inspiration, der Post-Inspiration und der aktiven Expiration. Schrittmachend ist die rhythmische Aktivität inspiratorischer Neurone. Der Rhythmusimpuls wird vom Pre-Bötzinger-Komplex erzeugt, in dem der I_h -Strom gefunden wurde, der jedoch keine HCN31-immunhistochemisch angefärbten Neurone enthält. Die motorische Umsetzung des inspiratorischen Impulses erfolgt im Nucleus nervi hypoglossi, in dem ebenso I_h nachgewiesen wurde (Bayliss et al, 1994) und der stark HCN31-positiv ist (Fotos 180-185, S. 86). Beide Kerne weisen eine synchrone respiratorische Aktivität auf. Blockierung des I_h führt in Abhängigkeit von der Erregbarkeit des respiratorischen Netzwerkes und in Abhängigkeit von der initialen Respirationsfrequenz zu unterschiedlichen Effekten auf die Inspiration.

Schwache Immunreaktion zeigte sich im Nucleus vestibularis medialis, in dem auch I_h detektiert wurde. Dort trägt insbesondere I_h zu postinhibitorischen „rebound firing“ bei. Im Nucleus dorsalis lemniscus lateralis liegt wie in anderen Teilen des auditorischen Systems I_h und starke HCN31-Immunreaktion vor (Fotos 103, 104, S.74). Der Nucleus dorsalis lemniscus lateralis spielt eine wichtige Rolle in der binauralen Lokalisation von Tönen und in der Hemmung der Weiterleitung von Informationen zu höheren Ebenen. I_h trägt in den Neuronen dieses Kerns zwar nicht wie in vielen anderen Hirnarealen zur Stabilisierung des Ruhemembranpotentials bei, scheint jedoch das Ausmaß der Erregung dieser Neurone zu verstärken (Fu et al, 1997). Der I_h -Strom ist entlang der gesamten auditorischen Bahn im Hirnstamm nachgewiesen worden (Cuttle et al, 2001). In Zellen des Nucleus cochlearis ventralis, von dem eine der Hauptbahnen des auditorischen Systems zum Nucleus paraolivaris superior und zum Nucleus ventralis lemniscus lateralis aufsteigt, trägt I_h im Zusammenspiel mit einem anderen Ionenkanal ($I_{k(L)}$) zur Formung der synaptischen Antwort auf die Aktivierung auditorischer Nervenfasern bei (Bal und Oertel, 2000). Eine starke HCN31-Immunreaktion liegt auch im Nucleus nervi facialis aller drei Nagergehirne vor, in dem ebenfalls I_h beschrieben wurde (Larkman und Kelly, 2001). Auch der Nucleus dorsalis nervi vagi weist sowohl HCN31-Immunreaktion, als auch I_h auf (Travagli und Gillis, 1994).

Rückenmark

Bisher ist der I_h -Strom nicht im Rückenmark elektrophysiologisch beschrieben worden. Mit der immunhistochemischen Methode gelang es erstmals den HCN3-Kanal im Rückenmark in α - und γ -Motoneuronen nachzuweisen.

4.1.2 Vergleich immunhistochemischer und molekularbiologischer Daten

Seitdem die molekulare Grundlage der I_h -Ströme in den vier Mitgliedern der HCN-Kanalfamilie gefunden wurde, gibt es einige In-situ-Hybridisierungs-Dateien über das Verteilungsmuster eines jeden HCN-Kanals, die sich zum Teil widersprechen. 1998 veröffentlichten drei verschiedene Arbeitsgruppen unabhängig voneinander ihre Ergebnisse zur molekularen Klonierung der vier HCN-Kanalgene. Dabei ergaben sich unterschiedliche Verteilungsmuster eines jeden HCN-Kanals. HCN1 ist besonders im Neocortex, Hippocampus, cerebellaren Cortex und im Hirnstamm lokalisiert (Santoro et al, 1999; 2000). Im Gegensatz dazu ist HCN2 im ZNS weit verbreitet, besonders jedoch im Thalamus, Hirnstamm und dem Herzen (Santoro et al, 1999; Ludwig et al, 1998). HCN3 ist ebenso im Gehirn, allerdings auf niedrigem Niveau, exprimiert und findet sich auch in

der Leber, Lunge und den Nieren (Moosmang et al, 1999). Besonders im Thalamus, dem Herzen und dem Hoden ist HCN4 zu finden (Seifert et al, 1999) Lisa Monteggia entdeckte ein für jeden HCN-Kanal unterschiedliches Verteilungsmuster von mRNA im Rattengehirn. Der HCN3-Kanal wurde von ihr in mehr als 70 Hirnarealen, besonders aber im Nucl. supraopticus des Hypothalamus gefunden. Im Sinusknoten ist vor allem der HCN4-Kanal exprimiert. Die Heterogenität von nativem I_h kann somit mindestens teilweise durch die differentielle Expression der HCN-Kanäle erklärt werden (Moosmang et al., 2000). Neben einem im gesamten Mausgehirn niedrigem, aber weit verbreitetem Expressionsmuster der HCN3mRNA (Moosmang et al 2000) wurde mit einer ähnlichen molekularbiologischen Methode keine Expression von mRNA des HCN3-Kanals festgestellt (Santoro et al, 1999). Die Tabelle 6 gibt einen zusammenfassenden Überblick zu den Ergebnissen der In-situ-Hybridisierungs-Methode und der immunhistochemischen Distribution des HCN3-Kanals im Rattenhirn.

4.1.3 Vergleich der immunhistochemischen Daten

Die immunhistochemische Distribution des HCN3-Kanals zeigt in beiden Studien ein übereinstimmendes Muster in den subkortikalen Regionen wie dem Thalamus und Hypothalamus, aber auch in zahlreichen anderen Hirnregionen besteht Übereinstimmung der Ergebnisse. Lediglich die Intensität der Anfärbung weicht zum Teil voneinander ab.

4.1.4 Auswertung der Ergebnisse unterschiedlicher Methoden zur Darstellung des HCN3-Kanals

Aus der Tabelle 6 lässt sich eine große Übereinstimmung der immunhistochemischen und der molekularbiologischen Ergebnisse Monteggias entnehmen. Mit dem Antikörper 6C5 konnten nicht nur die von Monteggia beschriebenen Regionen immunhistochemisch dargestellt, sondern in den verschiedenen Hirnarealen auch eine ähnlich starke Intensität des dem Verfahren entsprechenden Signals nachgewiesen werden.

Zum Vergleich mit den Ergebnissen Sven Moosmangs stehen weniger Regionen zur Verfügung und er beschreibt ein im Rattengehirn, mit Ausnahme des Bulbus olfactorius niedriges Expressionsmuster von HCN3mRNA. Eine weitere molekularbiologische Arbeit wurde von Bina Santoro durchgeführt, die kein Signal im Rattengehirn gefunden hat.

Es gibt drei Ansätze, die Diskrepanz in den Ergebnissen der vorliegenden In-Situ-Hybridisierung untereinander und im Vergleich mit der immunhistochemischen Darstellung des HCN3-Kanals im Nagerhirn zu erklären.

Diskussion

Die In-Situ-Hybridisierung ist kein sensitives Detektionsverfahren für Regionen, in denen nur auf niedrigem Niveau mRNA-Expression stattfindet, insofern keine Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation des Signals eingesetzt wird. Monteggia hat daher zur Amplifikation der im ZNS niedrigen Expression von HCN3mRNA (Moosmang S., 1999) die Polymerasekettenreaktion mit einer Amplifikation von 93° für 30 Sekunden, 59° für 30 Sekunden und 72° für 90 Sekunden à 32 Zyklen durchgeführt. Im Ergebnis wurde die Verteilung des HCN3-Kanals im Rattengehirn deutlich sichtbar. Weder von Moosmang noch von Santoro wurde zur Darstellung des HCN3-Kanals eine Amplifikation des Signals durchgeführt. Ferner kann die von Moosmang und Santoro gefundene niedrige, beziehungsweise gar nicht vorhandene HCN3mRNA Expression und die immunhistochemische Darstellung des HCN3-Kanals durch eine lange Halbwertszeit des HCN3-Kanalproteins erklärt werden. Das von HCN3mRNA synthetisierte HCN3-Kanalprotein kumuliert bei einer langen Halbwertszeit und lässt sich immunhistochemisch darstellen, wohingegen keine großen Mengen an der tatsächlich gering vorhandenen HCN3mRNA notwendig sind. Zudem kann die In-Situ-Hybridisierung, die zudem nur an intakten Neuronen vorgenommen werden kann, das Vorkommen der HCN-Kanäle nicht vollständig charakterisieren, weswegen weitere Verfahren zu Rate gezogen werden müssen.

Erfreulicherweise detektieren die beiden immunhistochemischen Studien zu einem sehr großen Teil in den gleichen Hirnarealen HCN3-Kanäle.

<u>HCN3</u>	<u>IHC (Ratte)</u>	<u>Moosmang</u>	<u>Monteggia</u>	<u>Notomi</u>
<u>Neocortex</u>		+/-	++	
Laminae I	0			+
Laminae II	++++			+
Laminae III	++++			+
Laminae VI	++++			+
Laminae V	0			0
Laminae VI	0			0
Cortex piriformis	++++	+/-	+++	++++
<u>Septum und basales Vorderhirn</u>				
Nucl. septi medialis	+++		+++	++
Pars dorsalis	+++			++
Pars intermedialis	+++			++
Pars ventralis	+++			++
Nucl. septi lateralis	+		+--+	+
Diagonales Band von Broca	+++			+++
Pars horizontalis	+++			+++
Pars verticalis	+++			+++
<u>Basalganglien</u>				
Corpus striatum	0		+	+
Globus pallidus	++++		0-+	++++
Ventrales Pallidum	+++		+++	+++
Nucl. subthalamicus	+++		++	++++

Diskussion

Nucl. accumbens	0		+	+
<u>Hippocampus</u>				
CA1		+/-		
Stratum oriens	+			0
Stratum pyramidale	++++		++++	+
Stratum radiatum	0			0
Stratum lacunosum-moleculare	0			+
CA2		+/-		
Stratum oriens	++			
Stratum pyramidale	++++		++++	
Stratum radiatum	0			
CA3		+/-		
Stratum oriens	0			+
Stratum pyramidale	++++		++++	++
Stratum radiatum	0			0
Stratum lucidum	0			0
Stratum lacunosum-moleculare	++			++
Gyrus dentatus				
Stratum moleculare	++			++
Stratum granulare	++++	+/-	++++	0
Subiculum	++++		++++	0
<u>Thalamus</u>				
Nucl. anterodorsalis thalami	++++		++	+++
Nucl. ventralis posteromedialis	+++			+
Nucl. ventralis posterolateralis	+++			+
Nucl. mediodorsalis	++			++
Nucl. reuniens	+++			+
Nucl. suprageniculatus	++			++
Nucl. paraventricularis	++		++++	+++
Nucl. subparafasciculatus parvicellularis	++			++
Nucl. reticularis thalami	++++		+++	++
Zona incerta	+++			+
<u>Metathalamus</u>				
Corpus geniculatum laterale	++			+++-++++
Corpus geniculatum mediale	+++		+	+
<u>Hypothalamus</u>		+/-		
Nucl. paraventricularis	+++		++++	++++-++++
Nucl. supraopticus	++++		+++++	+++
Area preoptica	0		++	+-++++
Nucleus mamillaris lateralis	++++		++++	++
Nucleus mamillaris medialis	+++			+++
Area hypothalamica anterior	++			+++
<u>Hirnstamm</u>		+/-		
<u>Mesencephalon</u>				
Nucl. ruber	++++		+++	
Pars magnocellularis	++++			0
Pars parvicellularis	++++			0
Nucl. parabrachialis/retrobrachialis	+++			+++
Substantia nigra				
Pars compacta	+++		+++	++++
Pars reticularis	++++		+	++
Pars lateralis	++++			++
Nucl. interpeduncularis	+++++		+++	++++
Colliculus superior		+/-	++	
Stratum griseum superior	++			+++
Stratum opticum	+		++	+
Stratum griseum medius	+			++
Stratum album medius	+			+
Nucl. oculomotorius acc. EW	++		+	0
Nucl. Darkschewitsch	++			
Nucl. oculomotorius	++++		+++	++
Nucl. trochlearis	+++		+	++
Colliculus inferior	+++	+/-	+	+
Nucl. parabrachialis	+++		+	++
Nucl. mesencephalicus n. V	+++		+	+

Diskussion

Cerebellum	+++++		+++	
Stratum moleculare	++	+/-		+
Purkinjezellen	+++	+/-		+
Stratum granulosum	++	+/-		++
Nucl. cerebellaris lateralis	+++			++
Pons				
Nucl. pontis	++++		++++	++
Nucl. parabrachialis medialis	+++			+++
Nucl. tegmentalis ventralis	++++		++	+++++
Nucl. tegmentalis dorsalis	+++		++++	++++
Griseum centrale	+++		++++	
Nucl. lemniscus lateralis	++++			+++
Nucl. motorius nervi V	++++		++++	+
Nucl. olivaris superior pars lateralis	++++		++++	++++
Nucl. olivaris superior pars medialis	++++		++++	++++
Nucleus paraolivaris superior	++++			++
Nucleus paraolivaris dorsalis	++++			
Nucl. corporis trapezoidei	++++		++++	++
Nucl. principalis nervi V	+		++	++
Medulla oblongata				
Nucl. spinalis nervi V	++++		+	+----
Nucl. nervi abducentis	++++		++++	++
Nucl. nervi facialis	++++		++++	+
Nucl. accessorius nervi facialis	++++			
Nucl. prepositus hypoglossi	++++		+++	+++-----
Nucl. cochlearis dorsalis	++++		+++	++++
Nucl. cochlearis ventralis	+++		+++	+++
Nucl. salivatorius superior	++++			
Nucl. salivatorius inferior	++++			
Nucl. vestibularis med.	++		++++	+++-----
Nucl. vestibularis lat.	++		++++	+
Nucl. vestibularis inf.	++		++++	+
Nucl. vestibularis sup.	++		++	+++
Nucl. ambiguus	++++		+++	+++
Nucl. nervi hypoglossi	++++		+++	++
Nucl. solitarius	+		+	+++
Nucl. cuneatus	+		+	++
Nucl. gracilis	+		+	++
Nucl. cuneatus externus	+		+	++
Nucl. dorsalis n. vagi	+++		+	++++
A1/A2/A5 Noradrenerge Zellen	+++++			
Nucl. reticularis gigantocellularis	++++		+	+
Rückenmark				
α-Motoneurone	++++			
γ-Motoneurone	++++			

Tabelle 6

1. Monteggia et al, 2000 “0 no expression to 5 (+++++) strongly expression “
2. Moosmang et al, 1999 “+++ strong, ++ moderate, + low, - no signal”
3. Immunohistochemische Untersuchung „+++++ starke, +++ mittlere, ++ schwache, + sehr schwache, 0 kein Signal“
4. Notomi and Shigemoto, 2004 “+++++ very intense, +++ intense, ++ moderate, + weak, 0 backgroundlevel”

Fazit

Die mit der immunhistochemischen Methode gefundenen Ergebnisse stimmen mit der elektrophysiologischen Verteilung der untersuchten I_h -Ströme überein, und detektieren über die erhältlichen elektrophysiologischen Daten hinaus HCN3-Kanäle im Nagergehirn. Neben dem Spezifitätsnachweis des eingesetzten Antikörpers lässt sich daraus weiterhin

schlussfolgern, dass der charakterisierte Antikörper den HCN3-Kanal im Nagerhirn immunhistochemisch darstellt. Zudem zeigen die immunhistochemischen Ergebnisse im Bezug auf die molekularbiologischen Daten nicht nur ein fast identisches Verteilungsmuster des HCN3-Kanals im Rattengehirn, sondern sogar eine ähnliche Intensität des Signals, insofern die mRNA durch PCR amplifiziert wurde. Ebenso verhält es sich mit der zum Vergleich der immunhistochemischen Methoden herangezogenen größten Studie zur immunhistochemischen Distribution des HCN3-Kanals im Nagerhirn. Das gemeinsame Ergebnis der unterschiedlichen Methoden, die derzeitige Kenntnis um die Verteilung der HCN-Kanäle im gesunden wie im pathologischem Gewebe kann ihre physiologische Bedeutung weiter erklären und für pharmakologische Zwecke nützlich machen.

4.2 Ausblick

Die molekulare Identifikation der HCN Kanäle und weiterführende Untersuchungen ihrer Eigenschaften können das Verständnis pathologischer Prozesse wie von Epilepsien, Herzrhythmusstörungen oder neuropsychiatrische Erkrankungen bereichern. Änderungen der Eigenschaften von HCN-Kanälen führen zu Änderungen des endogenen Oszillationsmusters. Beispielsweise ändern Mutationen der Aminosäuren im positiv geladenem S4-Segment des HCN2-Kanals der Maus kumulativ die mittlere, spannungsabhängige Aktivierungskonstante um je -20mV pro neutralisierter Aminosäure. Das dadurch stärker hyperpolarisierte Membranpotential hat vielfache Folgen für physiologische Prozesse (Vaca, 2000).

Des Weiteren führt Acetazolamid, ein selektiver Sulfonamidhemmer der Carboanhydrase, der als Antiepileptikum unter anderem gegen Absencen eingesetzt wird zur intrazellulären Alkalisierung thalamocortikaler Neurone und damit zu einem positiven Shift des Membranpotentials (Munsch und Pape, 1999). Bislang war der Wirkungsmechanismus unklar. Nun ist bekannt, dass die Veränderung des pH-Wertes eine Erhöhung der Amplitude des I_h -Stroms zur Folge hat und wiederum das Muster intrinsischer Oszillation verändert. Über die Modulation elektrophysiologischer Eigenschaften der HCN-Kanäle im Gehirn können folglich Erkrankungen des ZNS beeinflusst werden.

HCN-Kanäle haben auch Einfluss bei der Schmerzverarbeitung durch periphere Nerven (Grafe et al, 1997; Vargas und Lucero, 2002; Chaplan et al, 2003; Antal et al, 2004) und könnten Ansatz weiteren pharmakologischen Forschens im Bereich der Schmerztherapie

und Anästhesie sein. Eine zukünftige Aufgabe besteht auch in der Herstellung selektiver Inhibitoren für die einzelnen HCN-Subtypen, um die Distribution der HCN-Kanäle in hetero- oder homomeren Formationen weiter zu differenzieren. Die vier HCN Isoforme zeigen ein unterschiedliches, aber sich überlappendes Verteilungsmuster. Zudem werden die Kanäle coexprimiert und die in solchen Arealen erhobenen biophysikalischen Eigenschaften unterscheiden sich stark von denen der homomeren HCN-Kanäle. Die Aktivierungskinetik und Spannungsabhängigkeit coexprimierter HCN1 und HCN2-Kanäle im Neocortex der Ratte beispielsweise liegt zwischen den Eigenschaften homomerer HCN1- und HCN2-Kanäle (Chen S et al, 2001). Ebenso werden HCN2, HCN3 und HCN4 in den meisten dopaminergen und in thalamischen Neuronen coexprimiert (Franz et al, 2000). Dies legt die Vermutung nahe, dass die HCN-Kanäle auch in anderen Hirnarealen heteromere Kanäle mit neuen biophysikalischen Eigenschaften bilden (Much B et al, 2003) und bei Veränderung dieser Eigenschaften an Erkrankungen des ZNS beteiligt sind.

Eine Erkrankung die mit den HCN-Kanälen in Zusammenhang gebracht wird ist zum Beispiel die autosomal-dominant vererbte nächtliche frontale Epilepsie (ADNFLE), die auf demselben Chromosom (15q24) lokalisiert ist wie das humane HCN4 Gen. Das hHCN4 Gen wird auch mit anderen pathologischen Prozessen des ZNS in Verbindung gebracht (Seifert, 1999). Auch das HCN2 Gen wurde bereits auf Chromosom 19p13.3 lokalisiert. Ein Zusammenhang mit einer neuronalen Krankheit ist bisher jedoch nicht beschrieben worden (Moroni et al, 2000). Ebenso wird vermutet, dass die Grenze zur Auslösung intracorticaler fokaler Anfälle durch pharmakologische Blockierung des I_h -Stroms erhöht wird, da der durch HCN-Kanäle generierte I_h -Strom an der Erzeugung und Synchronisation fokaler paroxysmaler Aktivität des Cortex beteiligt ist (Timofeev et al, 2002). Zudem wurde bei künstlich verlängerten Fieberkrämpfen eine Korrelation zwischen Veränderungen des Expressionsmusters von HCN-Kanälen und einer länger andauernden Übererregbarkeit des Hippocampus mit konsekutiver Krampfneigung festgestellt. Auch bei Patienten, die an Temporallappenepilepsien leiden, wurde ein verändertes HCN1mRNA Expressionsmuster im Hippocampus dieser Patienten beobachtet (Bender et al, 2003). Eine mögliche Ursache von Epilepsien könnte also eine transskriptionale Dysregulation von HCN-Kanälen sein. Nicht zuletzt wäre eine Beteiligung der HCN-Kanäle bei der Genese des Vasospasmus cerebraler Gefäße denkbar.

6. Zusammenfassung

Der HCN3-Kanal ist eines von vier Mitgliedern der HCN-Genfamilie. Die HCN-Kanäle sind sowohl spannungsabhängige als auch an zyklische Nukleotide gekoppelte Kationenkanäle und werden daher HCN (**h**yperpolarisation-activated **c**yclic **n**ukleotid-gated cation channel) genannt. Diesen Kanälen liegt der Ionenstrom I_h zugrunde. I_h ist für Kalium und Natrium nichtselektiv, wird durch Hyperpolarisation aktiviert und ist selbst depolarisierend. Seit über 20 Jahren wird I_h elektrophysiologisch untersucht und wurde in vielen Geweben gefunden. I_h spielt eine Schlüsselrolle in der Initiierung, Modulation und Feinabstimmung von Schrittmacherdepolarisationen sämtlicher physiologischer Prozesse, wie beispielsweise dem Schlagen des Herzens, der Steuerung des Schlaf-Wach-Rhythmus, dem pulsatilem Freisetzen von Releasinghormonen, der rhythmischen Kontraktion glatter Muskulatur des graviden Uterus und der Flagellabewegung des Spermiums. Aber auch in pathologischen Prozessen wie Herzrhythmusstörungen, Epilepsien und Vasospasmen kann die immunhistochemische Lokalisation der HCN Subtypen das Verständnis der Pathophysiologie dieser Prozesse bereichern. Die genaue Distribution der HCN-Kanäle war bislang weitgehend unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden HCN3-immunpositive Neurone im Nagerhirn nachgewiesen. Zur immunhistochemischen Darstellung wurde hierzu zunächst eine als Antigen geeignete Aminosäuresequenz des HCN3-Kanalproteins gesucht, die keine Homologien zu den anderen HCN-Kanälen aufweist. Gegen die gefundene Aminosäuresequenz des HCN3-Kanals wurden monoklonale Antikörper der Ratte gewonnen und im Rahmen dieser Arbeit in mehreren Verfahren auf ihre Spezifität für den HCN3-Kanal getestet. Der eingesetzte Antikörper detektierte HCN3-Immunpositivität in vielen Hirnarealen, besonders im Hirnstamm, in motorischen Hirnnervenkernen, in somatosensorischen Regionen und im Hippocampus. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Darstellung von HCN3 im Nagerhirn stimmen zu einem großen Teil mit den Ergebnissen der Elektrophysiologie, In-Situ-Hybridisierung und einer kürzlich veröffentlichten großen Studie zur immunhistochemischen Distribution des HCN3-Kanals im Rattengehirn überein. Alle Verfahren weisen eine sich überlappende Lokalisation in mehreren Hirnarealen auf, sodass der HCN3-Kanal als hetero- oder homotetramerer Kanal vermutlich Bestandteil eines regulativen neuronalen HCN-Systems.

7 Literaturverzeichnis:

- Accili EA, Proenza C, Baruscotti M, DiFrancesco D (2002) From funny current to HCN channels: 20 years of excitation *News Physiol Sci* 17:32-7
- Antal M, Papp I, Bahaerguli N, Veress G, Vereb G (2004) Expression of hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated cation channel subunit 2 in axon terminals of peptidergic nociceptive primary sensory neurons in the superficial spinal dorsal horn of rats. *Eur J Neurosci* 19(5):1336-42
- Attwell D and Wilson M (1980) Behaviour of the rod network in the tiger salamander retina mediated by membrane properties of individual rods 1980 *J Physiol (Lond)* 309: 287-315
- Bader CR and Bertrand D (1984) Effect of changes in intra- and extracellular sodium on the inward (anomalous) rectification in salamander photoreceptors *J Physiol* 347:611-31
- Bal R and Oertel D (2000) Hyperpolarization-activated, mixed-cation current (I_h) in octopus cells of the mammalian cochlear nucleus *Journal of Neurophysiology* 84:806-817
- Bal T and McCormick DA (1997) Synchronized oscillation in the inferior olive are controlled by the hyperpolarisation-activated cation current I_h *Neurophysiol* 77:3145-3165
- Barnes S and Hille B (1989) Ionic channels of the inner segment of tiger salamander cone photoreceptors *J Gen Physiol* 94(4):719-43
- Baruscotti M and DiFrancesco D (2004) Pacemaker Channels *Ann N Y Acad Sci* 1015:111-121
- 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
- Beaumont V and Zucker RS (2000) Enhancement of synaptic transmission by cyclic AMP modulation of presynaptic I_h channel *Nat Neurosci* 3:133-141
- Bender RA, Soleymani SV, Brewster AL, Nguyen ST, Beck H, Mathern GW, Baram TZ (2003) Enhanced expression of a specific hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel (HCN) in surviving dentate gyrus granule cells of human and experimental epileptic hippocampus *J Neurosci* 23(17):6826-36.
- Berger T, Larkum ME and Lüscher HR (2001) High I_h channel density in the distal apical dendrite of layer V pyramidal cells increases bidirectional attenuation of EPSPs *J Neurophysiol* 85:855-868
- Biel M, Schneider A and Wahl C (2002) Cardiac HCN Channels Structure, Function, and Modulation *Trends Cardiovasc Med* 12(5):206
- Bourne JA Handbuch I der Immunperoxidase Färbemethoden (1997) *Immunhistochemistry laboratory DAKO Corporation*
- Bräuer A, Savaskan S, Kole M, Plaschke M, Monteggia L, Nestler E, Simbürger E, Deisz R, Ninnemann O and Nitsch R (2001) Molecular and functional analysis of hyperpolarisation activated pacemaker channels in the hippocampus after entorhinal cortex lesion *The FASEB Journal* 15:2689-2701
- Brown HF, Clark A and Noble SJ (1976) Identification of the pace-maker current in frog atrium *J Physiol* 258(3):521-45
- Brown HF, DiFrancisco D and Noble SJ (1979) Adrenaline action on rabbit sino-atrial node *J Physiol* 290(2):31-32
- 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
- Cathala L and Paupardin-Tritsch D (1997) Neurotensin inhibition of the hyperpolarization-activated cation current (I_h) in the rat substantia nigra pars compacta implicates the protein kinase C pathway *J Physiol Lond* 503:87-97
- Chapin EM and Andrade R (2001) A 5-HT₇ receptor-mediated depolarization in the anterodorsal thalamus. II. Involvement of the hyperpolarization-activated current I_h *J of Pharmacol and Experim Therapeut* 297:403-409

- Chaplan SR, Guo HQ, Lee DH, Luo L, Liu C, Kuei C, Velumian AA, Butler MP, Brown SM, Dubin AE (2003) Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain *J Neurosci* 15;23(4):1169-78
- Chen J, Mitcheson JS, Lin M and Sanguinetti MC (2000) Functional roles of charged residues in the putative voltage sensor of the HCN2 pacemaker channel *J Biol Chem* 275(46):36465-71
- Chen J, Mitcheson JS, Tristani-Firouzi M, Lin M and Sanguinetti MC (2001) The S4-S5 linker couples voltage sensing and activation of pacemaker channels *Proc Natl Acad Sci* 98(20):11277-82
- Chen S, Wang J, Siegelbaum SA (2001) Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide *J Gen Physiol* 117(5):491-504
- Childers SR (1993) Opioid receptor-coupled second messenger systems. In: Handbook of experimental pharmacology: opioids, Vol I (Herz, A, ed), pp New York: Springer
- Clapham DE (1998) Not so funny anymore: pacing channels are cloned *Neuron* 21:5-7
- Crowther JR (1995) Methods in Molecular Biology Vol 42-ELISA: Theory and Practice Humana Press, Totowa, NJ
- Cuttle MF, Rusznak Z, Wong AYC, Owens S and Forsythe ID (2001) Modulation of a presynaptic hyperpolarization-activated cationic current (I_h) at an excitatory synaptic terminal in the rat auditory brainstem. *Journal of Physiology London* 534 (3):733-744
- Decher N, Chen J, Sanguinetti MC (2004) Voltage-dependent gating of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated pacemaker channels: molecular coupling between the S4-S5 and C-linkers *J Biol Chem* 279(14):13859-65.
- Demontis GC, Moroni A, Gravante B, Altomare C, Longoni B, Cervetto L, DiFrancesco D (2002) Functional characterisation and subcellular localisation of HCN1 channel in rabbit retinal rod photoreceptors *J of Physiol* 542.1:89-97
- Dickson CT, Magistretti J, Shalinsky MH, Fransen E, Hasselmo ME and Alonso A (2000) Properties and role of I_h in the pacing of subthreshold oscillations in entorhinal cortex layer II neurons. *J Neurophysiol* 83 (5):2562-2579
- DiFrancesco D (1993) Pacemaker mechanisms in cardiac tissue *Annu Rev Physiol* 55:455-72
- DiFrancesco D (1999) Dual allosteric modulation of pacemaker (f) channels by cAMP and voltage in rabbit SA node *J Physiol Lond* 515 (Pt 2):367-376
- DiFrancesco D and Noble D (1979) The influence of voltage non-uniformity on the determination of E_{rev} for iK₂ *J Physiol (Lond)* 297:158-162
- Franz O, Liss B, Neu A and Roeper J (2000) Single-cell mRNA expression of HCN1 correlates with a fast gating phenotype of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channels (I_h) in central neurons *Eur J Neurosci* 12(8):2685-2693
- Fu XW, Brezden BL and Wu SH (1997) Hyperpolarization-activated inward current in neurons of the rat's dorsal nucleus of the lateral lemniscus in vitro. *J Neurophysiol* 78 (5):2235-2245
- Gargini C, Demontis GC, Bisti S and Cervetto L (1999) Effects of blocking the hyperpolarization-activated current (I_h) on the cat electroretinogram *Vision Res* 39(10):1767-1774
- Gasparini S and DiFrancesco D (1997) Action of the hyperpolarization-activated current (I_h) blocker ZD 7288 in hippocampal CA1 neurons. *Pflugers Arch* 435 (1):99-106
- Gauss R, Seifert R and Kaupp UB (1998) Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm *Nature* 393(6685):583-587
- Ghamari-Langroudi M and Bourque CW (2000) Excitatory role of the hyperpolarization-activated inward current in phasic and tonic firing of rat supraoptic neurons. *J Neurosci* 20 (13):4855-4863
- Gill CH, Randall A, Bates SA, Hill K, Owen D, Larkman PM, Cairns W, Yusuf SP, Murdock PR, Strijbos PJ, Powell AJ, Benham CD, Davies CH (2004) Characterization of the human HCN1 channel and its inhibition by capsazepine *Br J Pharmacol*. 143(3):411-21

Literaturverzeichnis

- Grafe P, Quasthoff S, Grosskreutz J and Alzheimer C (1997) Function of the hyperpolarization-activated inward rectification in nonmyelinated peripheral rat and human axons. *J Neurophysiol* 77(1):421-426
- Halliwell JV and Adams PR (1982) Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons *Brain Res* 250(1):71-92
- Harlow E and Lane D (1988) Antibodies: A Laboratory Manual *Cold Spring Harbor Laboratory Press* NY, 553-612
- Heine M, Ponimaskin E, Bickmeyer U and Richter DW (2002) 5-HT-receptor-induced changes of the intracellular cAMP level monitored by a hyperpolarization-activated cation channel. *Pflugers Arch* 443 (3):418-426
- Jan LY and Jan YN (1997) Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes *Annu Rev Neuroscience* 20:91-123
- Jiang ZG, Pessia M and North RA (1993) Dopamine and baclofen inhibit the hyperpolarization-activated cation current in rat ventral tegmental neurones. *J Physiol Lond* 462:753-764
- Kaupp UB, Seifert R (2001) Molecular diversity of pacemaker ion channels *Annu Rev Physiol* 63:235-57
- Knopfel T, Guatteo E, Bernardi G and Mercuri NB (1998) Hyperpolarization induces a rise in intracellular sodium concentration in dopamine cells of the substantia nigra pars compacta. *Eur J Neurosci* 10 (5):1926-1929
- Lamas JA (1998) A hyperpolarization-activated cation current (I_h) contributes to resting membrane potential in rat superior cervical sympathetic neurones *Pflugers Arch* 436 (3):429-435
- Larkman PM and Kelly JS (2001) Modulation of the hyperpolarisation-activated current, I_h, in rat facial motoneurons in vitro by ZD-7288 *Neuropharmacol* 40 (8):1058-1072
- Li SJ, Wang Y, Strahlendorf HK and Strahlendorf JC (1993). Serotonin alters an inwardly rectifying current (I_h) in rat cerebellar Purkinje cells under voltage clamp. *Brain Res* 617 (1):87-95
- Ludwig A, Zong X, Hofmann F, Biel M (1999) Structure and function of cardiac pacemaker channels *Cell Physiol Biochem* 9(4-5):179-86
- Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F and Biel M (1998) A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels *Nature* 393(6685):587-91
- Lupica CR, Bell JA, Hoffman AF and Watson PL (2001) Contribution of the hyperpolarization-activated current (I_h) to membrane potential and GABA release in hippocampal interneurons. *J of Neurophysiol* 86 (1):261-268
- Luthi A and McCormick DA (1998a) H-current: properties of a neuronal and network pacemaker *Neuron* 21:9-12
- Luthi A and McCormick DA (1998b) Periodicity of thalamic synchronized oscillations: the role of Ca²⁺-mediated upregulation of I_h *Neuron* 20:553-563
- Luthi A and McCormick DA (1999) Ca²⁺-mediated up-regulation of I_h in the thalamus How cell-intrinsic ionic currents may shape network activity *Ann N Y Acad Sci* 868:765-769
- 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 Lond* 497(Pt 1):119-130
- Macri V, Proenza C, Agranovich E, Angoli D, Accili EA (2002) Separable Gating Mechanisms in a Mammalian Pacemaker Channel *J Biol Chem* 277(39):35939-35946
- Magee JC and Carruth M (1999) Dendritic voltage-gated ion channels regulate the action potential firing mode of hippocampal CA1 pyramidal neurons *J Neurophysiol* 82(4):1895-1901
- McCloskey KD, Toland HM, Hollywood MA, Thornbury KD and McHale NG (1999) Hyperpolarisation-activated inward current in isolated sheep mesenteric lymphatic smooth muscle *J Physiol* 521(1):201-211
- McCormick DA and Pape HC (1990) Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones *J Physiol* 431:291-318
- Mistrik P, Torre V (2004) Histidine 518 in the S6-CNBD linker controls pH dependence and gating of HCN channel from sea-urchin sperm *Pflugers Arch* 448(1):76-84
- Moises HC, Rusin KI, McDonald RL (1994) μ -Opioid receptor mediated reduction of neuronal calcium current occurs via a G_o-type GTP-binding protein. *J Neurosci* 14:3842-3851

- Monteggia LM, Eisch AJ, Tang MD, Kaczmarek LK, Nestler EJ (2000) Cloning and localization of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel family in rat brain *Molecular Brain Research* 81:129-139
- Moosmang S, Biel M, Hofmann F and Ludwig A (1999) Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain *Biol Chem* 380(7-8):975-80
- Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (2001) Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues *Eur J Biochem* 268(6):1646-52
- Moroni A, Barbuti A, Altomare C, Viscomi C, Morgan J, Baruscotti M, DiFrancesco D (2000) Kinetic and ionic properties of the human HCN2 pacemaker channel *Pflugers Arch* 439(5): 618-626
- Moroni A, Gorza L, Belmonte M, Gravante B, Vaccari T, Bianchi M, Altomare C, Longhi R, Heurteaux C, Vitadello M, Malgaroli A and DiFrancesco D (2001) Hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated Channel 1 is a molecular determinant of the pacemaker Current I_f *J of Biol Chem* 276,3:29233-29341
- Much B, Wahl-Schott C, Zong X, Schneider A, Baumann L, Moosmang S, Ludwig A, Biel M (2003) Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem* 278(44):43781-6
- Muller F, Scholten A, Ivanova E, Haverkamp S, Kremmer E, Kaupp UB (2003) HCN channels are expressed differentially in retinal bipolar cells and concentrated at synaptic terminals *Eur J Neurosci* 17(10):2084-96
- Munsch T and Pape HC (1999) Modulation of the hyperpolarization-activated cation current of rat thalamic relay neurones by intracellular pH *J Physiol* 519 (Pt2):493-504
- Munsch T and Pape HC (1999) Upregulation of the hyperpolarization-activated cation current in rat thalamic relay neurones by acetazolamide *J Physiol Lond* 519:505-514
- Neuhoff H, Neu A, Liss B and Roeper J (2002) Ih channels contribute to the different functional properties of identified dopaminergic subpopulations in the midbrain. *J Neurosci* 22 (4):1290-1302
- Noble N and Tsien RW (1968) The kinetics and rectifier properties of the slow potassium current in cardiac Purkinje fibres *J Physiol (Lond)* 195: 185-214
- Noll S and Schaub-Kuhnen S (2000) Praxis der Immunhistochemie *Urban & Fischer*
- Noma A and Irisawa HA (1976) Time- and voltage-dependent potassium current in the rabbit sinoatrial node cell *Pflugers Arch* 366(2-3):251-8
- Notomi T and Shigemoto R (2004) Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain *J Comp Neurol* 471(3):241-76
- Okabe K, Inoue Y, Kawarabayashi T, Kajiya H, Okamoto F and Soeda H (1999) Physiological significance of hyperpolarization-activated inward currents (Ih) in smooth muscle cells from the circular layers of pregnant rat myometrium *Pflugers Arch* 439 (1-2):76-85
- Pape HC (1996) Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons *Annu Rev Physiol* 58:299-327
- Paxinos G and Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates, 4. Auflage *George Paxinos & Charles Watson Academic Press*
- Pearson WR, Wood T, Zhang Z and Miller W (1997) Comparison of DNA sequences with protein sequences *Genomics* 46: 24-36
- Perlmann H and Perlmann P (1994) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay *Cell Biology: A Laboratory Handbook San Diego, CA, Academic Press, Inc, 322-328*
- Poolos NP, Michele M and Johnston D (2002) Pharmacological upregulation of h-channels reduces the excitability of pyramidal neuron dendrites. *Nat Neurosci* 5(8):767-774

- Proenza C, Angoli D, Agranovich E, Macri V, Accili EA (2002) Pacemaker channels produce an instantaneous current *J Biol Chem* 277(7):5101-9
- Proenza C, Tran N, Angoli D, Zahynacz K, Balcar P, Accili EA (2002) Different roles for the cyclic nucleotide binding domain and amino terminus in assembly and expression of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channels *J Biol Chem* 277(33):29634-42
- Qu J, Altomare C, Bucchi A, DiFrancesco D and Robinson RB (2002) Functional comparison of HCN isoforms expressed in ventricular and HEK 293 cells *Pflugers Arch- Eur J Physiol* 444:597-601
- Richter H, Heinemann U and Eder C (2000) Hyperpolarization-activated cation currents in stellate and pyramidal neurons of rat entorhinal cortex. *Neurosci Lett* 281 (1):33-36
- Roncaglia P, Mistrík P and Torre V (2002) Pore Topology of the Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channel from Sea Urchin Sperm *Biophys* 83(4):1953-1964
- Rothberg K, Shin S, Prashant S and Yellen G (2002) Voltage-controlled Gating at the Intracellular Entrance to a Hyperpolarization-activated Cation Channel *J of General Physiology* 119(1):83-91
- Santoro B and Tibbs GR (1998) The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels *Ann NY Acad Sci* 30;868:741-64
- Santoro B, Chen S, Luethi A, Pavlidis P, Shumzatskz G, Tibbs G and Siegelbaum SA (2000) Molecular and functional Heterogeneity of hyperpolarisation-activated pacemaker channels in the mouse CNS *The Journal of Neuroscience* 20(14):5264-5275
- Santoro B, Liu 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* 29;93(5):717-29
- Satho TO, Yamaha M (1999) A bradycardiac agent ZD7188 blocks the hyperpolarization-activated current (I_h) in rod photoreceptors *Neuropharmacol* 39:1284-1291
- Satoh H (1995) Identification of a hyperpolarization-activated inward current in uterine smooth muscle cells during pregnancy. *Gen Pharmacol* 26 (6):1335-1338
- Seifert R, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P and Kaupp UB (1999) Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart and testis *Proc Natl Acad Sci* 96(16):9391-6
- Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT, Pan Z, Robinson RB, Dixon JE, McKinnon D and Cohen IS (1999) Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channels (HCN) mRNA expression in cardiac tissues *Circ Res* 85,1:1-6
- Shin KS, Maertens C, Proenza C, Rothberg BS, Yellen G (2004) Inactivation in HCN channels results from reclosure of the activation gate: desensitization to voltage *Neuron* 4;41(5):737-44
- Shin KS, Rothberg BS and Yellen G (2001) Blocker state dependence and trapping in hyperpolarization-activated cation channels: evidence for an intracellular activation gate *J Gen Physiol* 117(2):91-101
- Solomon JS and Nerbonne JM (1993) Two kinetically distinct components of hyperpolarization-activated current in rat superior colliculus-projecting neuron *Physiol* 469:291-313
- Solomon JS, Doyle JF, Burkhalter A and Nerbonne JM (1993) Differential expression of hyperpolarization-activated currents reveals distinct classes of visual cortical projection neurons *J Neurosci* 13 (12):5082-5091
- Southan AP, Morris NP, Stephens GJ and Robertson B (2000) Hyperpolarization-activated currents in presynaptic terminals of mouse cerebellar basket cells *J Physiol* 526:91-97
- Svoboda KR and Lupica CR (1998) Opioid inhibition of hippocampal interneurons via modulation of potassium and hyperpolarization-activated cation (I_h) currents *J Neurosci* 18(18):7084-7098
- Thoby-Brisson M, Telgkamp P and Ramirez JM (2000) The role of the hyperpolarization-activated current in modulating rhythmic activity in the isolated respiratory network of mice. *J Neurosci* 20 (8):2994-3005

- Timofeev I, Bazhenov M, Sejnowski T and Steriade M (2002) Cortical hyperpolarization-activated depolarizing current takes part in the generation of focal paroxysmal activities *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (14):9533-9537
- Travagli RA and Gillis RA (1994) Hyperpolarization-activated currents, IH and IKIR, in rat dorsal motor nucleus of the vagus neurons in vitro *J Neurophysiol* 71(4):1308-17
- Vaca L, Stieber J, Zong X, Ludwig A, Hofmann F, Biel M (2000) Mutations in the S4 domain of a pacemaker channel alter its voltage dependence *FEBS Lett.*479(1-2):35-40
- Vaccari T, Moroni A, Rocchi M, Gorza L, Bianchi ME, Beltrame M and DiFrancesco D (1999) The human gene coding for HCN2, a pacemaker channel of the heart *Biochim Biophys Acta* 1446(3):419-25
- Vargas G and Lucero MT (2002) Modulation by PKA of the Hyperpolarization-activated Current (Ih) in Cultured Rat Olfactory Receptor Neurons. *J Membr Biol* 188 (2):115-125
- Vasilyev DV and Barish ME (2002) Postnatal development of the Hyperpolarisation Activated Exitatory Current Ih in Mous Hippocampal Pyramidal Neurons *The Journal of Neuroscience* 22(20):8992-9004
- Vemana S, Pandey S, Larsson HP (2004) S4 movement in a mammalian HCN channel *J Gen Physiol* 123(1):21-32
- Wainger BJ, DeGennaro M, Santoro B, Siegelbaum SA, Tibbs GR (2001) Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels *Nature* 411(6839):805-10
- Williams SR and Stuart GJ (2000) Site independence of EPSP time course is mediated by dendritic I_h in neocortical pyramidal neurons *J Neurophysiol* 83:3177-3182
- Xue T, Marban E and Li RA (2002) Dominant-negative suppression of HCN1- and HCN2-encoded pacemaker currents by an engineered HCN1 construct: insights into structure-function relationships and multimerization *Circ Res* 90(12):1267-73
- Yanagihara K and Irisawa H (1980) Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell *Pflugers Arch* 385(1):11-19
- Yu H, Chang F and Cohen IS (1995) Pacemaker current i(f) in adult canine cardiac ventricular myocytes *J Physiol* 485 (Pt 2):469-83
- Zagotta WN and Siegelbaum SA (1996) Structure and function of cyclic nucleotide gated channels *Annu Rev Neurosci* 19:235-263
- Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, Young EC, Olson R, Gouaux E (2003) Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels *Nature* 425(6954):200-5
- Zhong N, Beaumont V, Zucker RS (2004) Calcium influx through HCN channels does not contribute to cAMP-enhanced transmission *J Neurophysiol* 92(1):644-7
- Zong X, Stieber J, Ludwig A, Hofmann F, Biel M (2001) A single histidine residue determines the pH sensitivity of the pacemaker channel HCN2 *J Biol Chem* 276(9):6313-6319

Abkürzungsverzeichnis

7 Abkürzungsverzeichnis

10	Nucleus motorius nervi vagi	Icj	Nucleus insulae calejae
1-10	Lobuli cerebellares	Icp	Pedunculus cerebellaris inferior
12	Nucleus nervi hypoglossi	IHC	Immunhistochemie
2n	Nervus opticus	II	Seitenventrikel
7n	Nervus facialis	III	dritter Ventrikel
8vn	Nervus vestibulocochlearis	ILL	Nucleus intermedius lemnisci lateralis
A2	Noradrenerge Zellen	InCo	Nucleus intercollicularis
aca	Commissura anterior pars anterior	IntA	Nucleus cerebellaris interpositus anterior
Acb	Nucleus accumbens	IO	Nucleus medialis
ACo	Nucleus amygdala corticalis anterior	IOD	Nucleus medialis subnucleus D
Acs 7	Nucleus accessorius nervi facialis	IPAC	Nucleus interstitialis commissura anterior pars posterior
Acs5	Nucleus accessorius nervi trigemini	IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
Acs 6	Nucleus accessorius nervi abducentis	IRt	Nucleus reticularis intermedius
AHA	Area hypothalamica anterior	IS	Nucleus salivatorius inferior
AHi	Area amygdalohippocampalis	kDA	Kilodalton
AHiAL	Area amygdalohippocampalis anterolateralis	La	Nucleus lateroanterior hypothalmi
AHiPM	Area amygdalohippocampalis posteromedialis	Lat	Nucleus cerebellaris lateralis
Ak	Antikörper	LatPC	Nucleus cerebellaris lateralis pars parvicellularis
AM	Nucleus anteromedialis thalami	LC	Locus coeruleus
Amb	Nucleus ambiguus	Ld	Zona septi lamboidea
AP	Area postrema	LD	pars laterodorsalis
Apir	Area amygdalopiriformis	lfp	Fasciculus longitudinalis pontis
APTD	Nucleus pretectalis anterior	LGP	Globus pallidus pars lateralis
As	Aminosäure	LH	Area hypothalamica laterale
Atg	Nucleus tegmentalis anterior	Lo	Tuberculum olfactorium laterale
AVDM	Nucleus anteroventralis pars dorsomedialis	lo	Tractus olfactorius pars lateralis
AVVL	Nucleus anteroventralis pars ventrolateralis	LOT	Nucleus tractus olfactorius laterale
Bar	Nucleus Barrington	LP	Nucleus posterolateralis
BMA	Nucleus amygdalae basomedialis anterior	LPB	Nucleus parabrachialis lateralis
BPL	Nucleus amygdalae basolateralis posterior	LPBV	Nucleus parabrachialis lateralis pars ventralis
cc	canalis centralis	LRt	Nucleus reticularis lateralis
CC	corpus callosum	LSD	Nucleus septi lateralis pars dorsalis
Ce	pars centralis	LSI	Nucleus septi intermedius
CG	Griseum centrale	LSO	Nucleus olivaris lateralis
CL	Nucleus centrolateralis thalami	LSS	Striatum stratum laterale
Co	pars corticalis	LSV	Nucleus septi lateralis pars ventralis
cp	Pedunculus cerebri	LVe	Nucleus vestibularis lateralis
cu	Fasciculus cuneatus	m5	Tractus motorius nervi trigemini
Cu	Nucleus cuneatus	MCPO	Nucleus preopticus magnocellularis
CVL	Nucleus reticularis caudoventralis	MDC	Nucleus mediodorsalis centralis
das	Stria acustica dorsalis	MdD	Nucleus Reticularis medullaris dorsalis
DC	Nucleus cochlearis dorsalis	MDL	Nucleus mediodorsalis lateralis
DEn	Nucleus endopiriformis dorsalis	MDM	Nucleus mediodorsalis medialis
DEv	Nucleus endopiriformis ventralis	MdV	Nucleus reticularis medullaris ventralis
DG	Gyrus dentatus	Me	Nucleus amygdalae medialis
dhc	Commissura hippocampalis dorsalis	Me5	Nucleus mesencephalicus nervi trigemini
DLG	Nucleus geniculatus dorsalis pars lateralis	MeVeMC	Nucleus vestibularis magnocellularis
DMD	Nucleus hypothalami dorsomedialis	MeVPC	Nucleus vestibularis parvicellularis
DMSp5D	Nucleus spinalis nervi trigemini dorsalis	MGP	Globus pallidus medialis
DMTg	Area tegmentalis dorsomedialis	Mhb	Nucleus habenulae medialis
DpG	Colliculus superior stratum griseum profundum	MiTg	Nucleus tegmentalis microcellularis
DPGi	Nucleus paragigantocellularis dorsalis	ml	Lemniscus lateralis
DpMe	Nucleus mesencephalicus profundum	mm	Lemniscus medialis
DpWh	Colliculus superior stratum album profundum	ML	Nucleus mamillaris lateralis
DRV	Nucleus raphe dorsalis	MM	Nucleus mamillaris medialis
dsc	Tractus spinocerebellaris dorsalis	MnR	Nucleus raphe medianus
ECIC	Colliculus inferior cortex externus	Mo5	Nucleus mesencephalicus nervi trigemini
f	Fornix	MPB	Nucleus parabrachialis medialis
F	Nucleus of the field of Forel	MPn	Nucleus pontinus medialis
fi	Fimbria hippocampi	MS	Nucleus septi medialis
fr	Fasciculus retroflexus	MSO	Nucleus olivaris medialis
Gem	Nucleus gemini hypothalamicus	mtg	Tractus mamillotegmentalis
Gi	Nucleus reticularis gigantocellularis	n.	nervi (Gen.)
GiA	Nucleus gigantocellularis alpha	N.	Nervus
GP	Globus pallidus	nervi V	nervi trigemini
HCN	hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated cation channel	Nn.	nervi (Pl.)
HCN31-	HCN3like	Nucl.	Nucleus
HDB	Nucleus horizontalis bandolettae brocae	ocb	Fasciculus olivocochlearis Rasmussen
Ic	Capsula interna	PaAP	Nucleus paraventricularis pars anterior
		PAG	Periaquaeductales Grau
		PBG	Nucleus parabigeminalis
		PBW	Nucleus parabrachialis

Abkürzungsverzeichnis

PC	Nucleus paracentralis thalami	VTM	Nucleus tuberomamillaris pars ventralis
PCRtA	Nucleus reticularis parvicellularis alpha	Zi	Zona incerta
PF	Nucleus parafasciculatus thalami		
PH	Area hypothalami pars posterior		
Pir	Cortex piriformis		
PL	Nucleus paralemniscalis		
PLCo	Nucleus amygdalae posterolateralis corticalis		
PMCo	Nucleus amygdalae posteromedialis corticalis		
PMD	Nucleus premamillaris dorsalis		
PMn	Nucleus reticularis paramedianus		
PMnR	Nucleus raphe paramedianus		
PnC	Nucleus reticularis pontis pars caudalis		
PnO	Nucleus reticularis pontis pars oralis		
PnV	Nucleus reticularis pontis pars ventralis		
Po	Nuclei posteriores thalami		
PoDG	Gyrus dentatus stratum polymorphe		
PPTg	Nucleus tegmentalis pedunculopontinus		
Ppy	Nucleus parapyramidalis		
PR	Area prerubralis		
Pr5VL	Nucleus principalis nervi trigemini pars ventrolateralis		
PrC	Nucleus precommissuralis		
PT	Nucleus paratenialis		
PVA	Nucleus paraventricularis thalami		
Py	Tractus pyramidalis		
Re	Nucleus reuniens thalami		
Ri	Nucleus interstitialis rostralis		
Rmg	Nucleus raphe magnus		
Ro	Nucleus Roller		
rs	Tractus rubrospinalis		
Rs	Tractus rubrospinalis		
Rt	Nucleus reticularis thalami		
RtTg	Nucleus pontis reticulotegmentalis		
RVL	Nucleus reticularis		
s5	Tractus sensorius nervi trigemini		
SCh	Nucleus suprachiasmaticus		
SI	Substantia innominata		
sm	stria medullaris thalami		
SM	Nucleus striae medullaris		
SO	Nucleus supraopticus		
Sol	Tractus solitarius		
SolC	Nucleus tractus solitarii commissuralis		
SolDM	Nucleus tractus solitarii dorsomedialis		
SolM	Nucleus tractus solitarii medialis		
sp5	Tractus spinalis nervi trigemini		
Sp5	Nucleus tractus spinalis nervi trigemini		
Sp5O	Nucleus spinalis nervi trigemini pars oralis		
SPFPC	Nucleus subparafasciculatus		
Sph	Nucleus sphenoides		
SPO	Nucleus paraolivaris superior		
SPTg	Nucleus tegmentalis subpeduncularis		
SpVe	Nucleus vestibularis spinalis		
st	Stria terminalis		
Sth	Nucleus subthalamicus		
SubC	Nucleus subcoeruleus		
SubD	Nucleus submedius dorsalis		
SubG	Nucleus subgeniculatus		
SubV	Nucleus submedius ventralis		
ts	Tractus tectospinalis		
tth	Tractus trigeminothalamicus		
Tu	Tuberculum olfactorium		
TZ	Corpus trapezoideus		
VCA	Nucleus cochlearis ventralis anterior		
VCP	Nucleus cochlearis ventralis posterior		
VeCb	Nucleus vestibulocochlearis		
VEn	Nucleus endopiriformis ventralis		
VL	Nucleus thalami ventrolateralis		
VLH	Nucleus hypothalamicus ventrolateralis		
VLL	Nucleus ventralis lemniscus lateralis		
VM	Nucleus ventromedialis		
VMPn	Nucleus pontis ventromedialis		
VPL	Nucleus ventralis posterolateralis		
VPM	Nucleus ventralis posteromedialis		
VPM	Nucleus ventralis posteromedialis thalami		
vsc	Tractus spinocerebellaris ventralis		

8 Anhang:

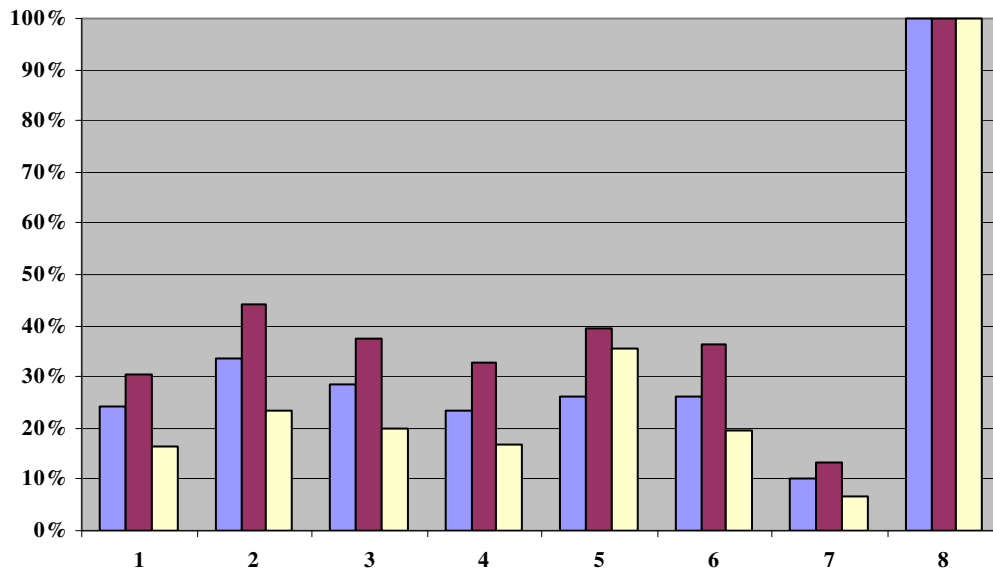


Abb. 14 Auf der **X-Achse** ist die optische Dichte in % angegeben. 100% entsprechen der optischen Dichte der Reaktion des Antikörpers mit der ganzen Aminosäuresequenz rHCN3₆₃₈₋₆₇₃ (Säule 8). Die blaue Säule stellt die Reaktion des Antikörpers 7H7 dar. Die bordeauxfarbene Säule und die gelbe Säule stellen die Antikörper 4F6 und 4D9 dar. Auf der **Y-Achse** ist die Reaktion des Antikörpers mit den einzelnen Peptiden (Säulen 1-6) zu sehen. Die Säule 7 zeigt die nonspezifischen Bindung des Antikörpers mit den Wänden der Reaktionsvertiefung der ELISA-Platte.

Die Antikörper 7H7, 4D9 und 4F6 sind konformationsspezifische Antikörper, wobei der Antikörper 4D9 eine Prävalenz für das fünfte Peptid und der Antikörper 4F6 eine Prävalenz für das zweite Peptid aufweisen.

Homologiesuche

Hypothetisches Protein Fragment (571 AS) versus HCN3 Protein (780AS)

Es liegen 27 Abweichungen in einer 570 Aminosäuren langen Sequenz vor. Dies entspricht einer Diskrepanz von 4,73 % und damit einer Homologie von 95,27%.

Gap penalties: -12/-2

70,4 % identity

Global alignment score: 3275

Zeitpunkt: 22. November 2002

```

227734 -----
-   MEEEARPAVGDGEAATPARETPPAAPAQARAASGGVPESAPEPKRRQLGTLLOPTVNFKS
      10      20      30      40      50      60

227734 -----
-   LRVFGSHKAVEIEQERVKSAGAWIIHPYSDFRFYWDLIMLLMVGNIIVLPVGITFFKEE
  
```

Anhang

```

      70          80          90          100          110          120
227734 -----
_  NSPPWIVFNVLSDTFFLLDLVLNFRFTGIVVEEGAEILLAPRAIRTRYLRWFLVDLISSI
      130          140          150          160          170          180

                        10          20          30
227734 -----ARGLRIVRFTKILSLLRLLRSLRIRYIHWEEIFHMT
_  PVDYIFLVVELEPRLDAEVYKTARALRIVRFTKILSLLRLLRSLRIRYMHQWEEIFHMT
      190          200          210          220          230          240

      40          50          60          70          80          90
227734 YDLASAVVRIFNLIQMMLLCHWDGCLQFLVPMLODFPPDCWVSINHMVNHWSWGRQYSHA
_  YDLASAVVRIFNLIQMMLLCHWDGCLQFLVPMLODFPDCWVSMNRMVNHWSWGRQYSHA
      250          260          270          280          290          300

      100          110          120          130          140          150
227734 LFKAMSHMLCIGYGQAPVGMPPDVWLTMLSMIVGATCYAMFIGHATALIQSLDSSRRQYQ
_  LFKAMSHMLCIGYGQAPVGMPPDVWLTMLSMIVGATCYAMFIGHATALIQSLDSSRRQYQ
      310          320          330          340          350          360

      160          170          180          190          200          210
227734 EKYKQVEQYMSFHKLTPADTRQRIHEYYEHRVYQKMFDEESILGELSEPLREEIINFTRG
_  EKYKQVEQYMSFHKLTPADTRQRIHEYYEHRVYQKMFDEESILGELSEPLREEIINFTRG
      370          380          390          400          410          420

      220          230          240          250          260          270
227734 LVAHMPLFAHADPSFVTAVLTKLRFVVFQPGDLVVREGSVGRKMYFIQHGLLSVLARGAR
_  LVAHMPLFAHADPSFVTAVLTKLRFVVFQPGDLVVREGSVGRKMYFIQHGLLSVLARGAR
      430          440          450          460          470          480

      280          290          300          310          320          330
227734 DTRLTDGSYFGEICLLTRGRRTASVRADTYCRLYSLSVDHFNVALEEFPMRRRAFETVAM
_  DTRLTDGSYFGEICLLTRGRRTASVRADTYCRLYSLSVDHFNVALEEFPMRRRAFETVAM
      490          500          510          520          530          540

      340          350          360          370          380          390
227734 DRLLRIGKKNLQKRSESPGSS--GGIMEQHLVQHVRDMARGVGRAPSTGAQLSGKP
_  DRLLRIGKKNLQKRSESPGSSGGVMEQHLVQHVRDMARGIRGLAPGTGARLSGKP
      550          560          570          580          590          600

      400          410          420          430          440          450
227734 VLWEPLVHAPLQAAAVTSNVAIALTHQRGPIPLSPDPATLLARSARRSAGSPASPLVPV
_  VLWEPLVHAPLQAAAVTSNVAIALTHQRGPIPLSPDPATLLARSARRSAGSPASPLVPV
      610          620          630          640          650          660

      460          470          480          490          500          510
227734 RAGP-----WASTSRLPAPPARTLHASLSRAGRSQVSLLGPPPGGGRRRLGPRGRPLSA
_  RAGPLLARGPWASTSRLPAPPARTLHASLSRAGRSQVSLLGPPPGGGRRRLGPRGRPLSA
      670          680          690          700          710          720

      520          530          540          550          560          570
227734 SQPSLPQRATGDGSPGRKSGSERLPPSGLLAKPPRTAOPRPPVPEPATPRGLQLSANM
_  SQPSLPQRATGDGSPRRKSGSERLPPSGLLAKPPGTVPSSVPEPVTPRGPQISANM
      730          740          750          760          770          780

```

Hypothetisches Proteinkinase KIAA1535 (703 AS) versus HCN3 Protein (780AS)

Es liegen 28 Abweichungen in einer 703 Aminosäuren langen Sequenz vor. Dies entspricht einer Diskrepanz von 3,98 % und damit einer Homologie von 96,02%. Gap penalties: -12/-2; 87,4 % identity
Global alignment score: 4409, Zeitpunkt: 22.11.02

Anhang

```

10      20      30      40      50      60
524839 MEEEARPAVGDEAATPARETPPAAPAQARAASGGVPESAPEPKRRQLGTLLOPTVKNKFS
-----
70      80      90      100     110     120
524839 LRVFGSHKAVEIEQERVKSAGAWIHPYSDFRFYWDLIMLLLMVGNLIVLPVGITFFKKE
       : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-----EIEQERVKSAGAWIHPYSDFRFYWDLIMLLLMVGNLIVLPVGITFFKKE
       10      20      30      40      50

130     140     150     160     170     180
524839 NSPPWIVFNVLSDTFFLLDLVLFNFRFTGIVVEEGAEILLAPRAIRTRYLRWFVLDLISSI
       : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-----NSPPWIVFNVLSDTFFLLDLVLFNFRFTGIVVEEGAEILLAPRAIRTRYLRWFVLDLISSI
       60      70      80      90      100     110

190     200     210     220     230     240
524839 PVDYIFLVVELEPRLDAEVYKTARALRIVRF TKILSLLRLLRLSRLIRYMHQWEEIFHMT
       : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-----PVDYIFLVVELEPRLDAEVYKTARALRIVRF TKILSLLRLLRLSRLIRYMHQWEEIFHMT
       120     130     140     150     160     170

250     260     270     280     290     300
524839 YDLASAVVRIFNLIGMMLLLCHWDGCLQFLVPMLQDFPDCWVSMNRMVNHWSWGRQYSHA
       : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-----YDLASAVVRIFNLIGMMLLLCHWDGCLQFLVPMLQDFPDCWVSNHMHVNHWSWGRQYSHA
       180     190     200     210     220     230

310     320     330     340     350     360
524839 LFKAMSHMLCIGYGQAPVGM PDVWLTMLSMIVGATCYAMFIGHATALIQSLDSSRRQYQ
       : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-----LFKAMSHMLCIGYGQAPVGM PDVWLTMLSMIVGATCYAMFIGHATALIQSLDSSRRQYQ
       240     250     260     270     280     290

370     380     390     400     410     420
524839 EKYKQVEQYMSFHKLPADTRQRIHEYYEHRVYQGMFDEESILGELSEPLREEIINFTCRG
       : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-----EKYKQVEQYMSFHKLPADTRQRIHEYYEHRVYQGMFDEESILGELSEPLREEIINFTCRG
       300     310     320     330     340     350

430     440     450     460     470     480
524839 LVAHMP LFAHADPSFVTAVLTKLRF EVFQPGLLVREGSVGRKMYFIQHGLLSVLARGAR
       : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-----LVAHMP LFAHADPSFVTAVLTKLRF EVFQPGLLVREGSVGRKMYFIQHGLLSVLARGAR
       360     370     380     390     400     410

490     500     510     520     530     540
524839 DTRLTDGSYFGEICLLTRGRRTASVRADTYCRLYSLSVDHFNAVLEEFPMRRRAFETVAM
       : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-----DTRLTDGSYFGEICLLTRGRRTASVRADTYCRLYSLSVDHFNAVLEEFPMRRRAFETVAM
       420     430     440     450     460     470

550     560     570     580     590     600
524839 DRLRIGKKNSILQKRSESPGSSSGGVMEQHLVQHDRDMARGIRGLAPGTGARLSGKP
       : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-----DRLRIGKKNSILQKRSESPGSSSGGVMEQHLVQHDRDMARGIRGRAPSTGAQLSGKP
       480     490     500     510     520

610     620     630     640     650     660
524839 VLWEPLVHAPLQAAAVTSNVAIALTHORGPLPLSPDSPATLLARSARRSAGSPASPLVPV
       : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-----VLWEPLVHAPLQAAAVTSNVAIALTHORGPLPLSPDSPATLLARSARRSAGSPASPLVPV
       530     540     550     560     570     580

670     680     690     700     710     720
524839 RAGPLLARGPWASTSRLPAPPARTLHASLSRTGRSQVSLGPPPGGGRRIGPRGRPLSA
       : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-----RAG-----PWASTSRLPAPPARTLHASLSRAGRSQVSLGPPPGGGRRIGPRGRPLSA
       590     600     610     620     630     640

730     740     750     760     770     780
524839 SQPSLPORATGDGSPRRKSGSERLPPSGLLAKPPGTVP SRSSVPEPVTPRGPOISANM
       : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-----SQPSLPORATGDGSPRRKSGSERLPPSGLLAKPPRTAQPPRPPVPEPATPRGLQLSANM
       650     660     670     680     690     700

```

Danksagung

Meinen Dank möchte ich an dieser Stelle allen aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Karl Zilles für die Anregung und Unterstützung dieser Arbeit sehr danken. Ganz besonders danken möchte ich ihm auch dafür, dass er stets ein offenes Ohr für meine Fragen gehabt und mich in verschiedenen Planungsfragen vielfältig beraten hat. Herrn Prof. Zilles bin ich auch in soweit sehr dankbar, als er bei mir die Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten geweckt hat.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Tamas Görcs, der die Arbeit betreut hat. Unermüdlich ist er allen Fragen mit ausführlichen Antworten begegnet und hat durch Ratschläge, Literaturtipps und seine humorvollen Art zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank für die schöne und ereignisreiche Zeit, an die ich mich gerne zurückerinnere!

Danken möchte ich auch meinen Eltern, die mich manchmal, wohl aus Sorge um mein Wohlergehen, überraschend des Nachts im Institut besuchten. Meinem Vater möchte ich zudem für das mehrfache Korrekturlesen und die hilfreichen Verbesserungsvorschläge sehr danken.

Nicht zuletzt möchte ich auch ganz besonders meinem Mann Jan danken, der den gesamten Werdegang dieser Doktorarbeit miterlebt hat und für Aufmunterung und Ablenkung während dieser Arbeit sorgte.

Curriculum vitae

Julia Liersch

Persönliche Daten:

Julia Liersch, geb. Schüler, am 30. August 1976 in Oberhausen geboren

Beruf:

seit 01.02 2005 Assistenzärztin, Neurochirurgische Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Schulbildung:

1996 Abitur
1994-95 Lycée Jaques Amyot, Auxerre, Frankreich
1987-94 Annette-von-Droste-Hülshoff-Gymnasium, Düsseldorf
1983-87 Grundschule Urdenbach, Düsseldorf

Medizinische Ausbildung:

12/2004 3. Staatsexamen
10/2003 Praktisches Jahr an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
 Wahlfach: Neurochirurgie
08/2003 2. Staatsexamen
03/2001 1. Staatsexamen
2000-2005 Promotionsvorhaben in der experimentellen Hirnforschung zum Thema „Der HCN3-Kanal im Nagergehirn: immunhistochemische Untersuchung“, bei
 Universitätsprofessor Dr. K. Zilles, Institut der Hirnforschung C. und O. Vogt
2001 Posterpräsentation auf der 18. Arbeitstagung der anatomischen Gesellschaft,
 Würzburg
10/1997 Studium der Medizin Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Sonstige Studien:

2/2003 Diplom im Fach Musik (Viola)
2002-2003 Studium der Musik, Hochschule für Musik Köln, Abt. Wuppertal
 (Klasse: Prof. W. Dickel)
1997-2002 Studium der Musik, Robert-Schumann Hochschule Düsseldorf
 Studiengang: Künstlerische Instrumentalbildung
 Hauptfach: Viola (Klasse: U. Hartmann), Nebenfach: Klavier
1996-97 Studium der Rechtswissenschaft an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf