

Aus dem  
C. & O. Vogt-Institut für  
Hirnforschung  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. K. Zilles

**Darstellung der Verteilungscharakteristik des  
HCN4-Kanalproteins im zentralen  
Nervensystem der Ratte**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

**Tudor Cristian Räder**

**2008**

Erklärung:

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. Karl Zilles

Korreferent: Prof. Dr. Kurt Gottmann

Für meine Eltern,  
die ihr Leben und ihre Bedürfnisse in den Hintergrund gestellt  
und sich unvergleichlich aufgeopfert haben,  
um uns ein neues Leben zu ermöglichen.  
Für ihre wunderbare Liebe, die sie  
uns Kindern zukommen lassen.



	Seite
<b>I Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>II Abkürzungen</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>01</b>
1.1 Hyperpolarisationsströme.....	02
1.2 Hyperpolarisations-aktivierter und zyklisch Nukleotid-gesteuerter Kationenkanal.....	03
1.3 Aufbau des HCN-Kanals.....	04
1.4 Homologien der HCN-Proteine.....	05
1.5 Elektrophysiologische Eigenschaften des HCN-Kanals.....	06
1.6 Modulatoren des HCN-Kanals.....	08
1.7 Funktionen des HCN-Kanals.....	09
1.8 Zielsetzung.....	10
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>11</b>
2.1 Materialien.....	11
2.1.1 Chemikalien.....	11
2.1.2 Immunochemikalien.....	11
2.1.3 Primärantikörper.....	11
2.1.4 Sekundärantikörper.....	12
2.1.5 Utensilien.....	13
2.1.6 Versuchstiere.....	13
2.2 Materialgewinnung.....	14
2.2.1 Präparation der Gehirne.....	14
2.2.2 Fixierungslösungen.....	15
2.2.3 Histologische Präparation.....	17
2.3 Immunhistochemie.....	18
2.3.1 Immunhistochemisches Protokoll.....	18
2.3.2 Negativkontrolle.....	20
2.3.3 Absorptionskontrolle.....	20
2.4. Antikörper-Charakterisierung.....	20
2.4.1 Epitop-Charakterisierung.....	20
2.4.2 Homologiesuche.....	23

<b>3 Ergebnisse</b> .....	25
3.1 Antikörper-Charakterisierung.....	25
3.1.01 Epitop-Charakterisierung.....	25
3.1.02 Homologiesuche.....	26
3.1.03 Vergleich der immunhistochemischen Darstellung.....	27
3.1.04 Negativkontrollen und Absorptionskontrollen.....	30
3.2 Verteilungscharakteristik des HCN4-Kanals im Rattengehirn.....	30
3.2.01 Isocortex.....	31
3.2.02 Hippocampus.....	32
3.2.03 Thalamus.....	33
Ncl. reticularis.....	33
3.2.04 Metathalamus.....	34
Corpus geniculatum laterale.....	34
Corpus geniculatum mediale.....	34
3.2.05 Hypothalamus.....	36
Ncl. praeopticus medialis.....	36
Ncl. supraoticus.....	36
Ncl. paraventricularis.....	37
3.2.06 Tegmentum mesencephali.....	38
Ncl. ruber.....	38
Ncll. lemnisci lateralis.....	38
3.2.07 Tectum mesencephali.....	40
Colliculus superior (craniales).....	40
Colliculus inferior (caudales).....	40
3.2.08 Andere Hirnstammregionen.....	41
Oliva superior et Ncl. corporis trapezoidei.....	41
3.2.09 Viszeromotorische Kerne.....	42
Ncl. dorsalis n. vagi (X).....	42
3.2.10 Somatomotorische Kerne.....	42
Ncl. n. oculomotorius (III).....	42
Ncl. motorius n. trigemini (V).....	44
Ncl. n. abducentis (VI).....	44
Ncl. n. facialis (VII).....	45
Ncl. ambiguus.....	46

Ncl. n. hypoglossi (XII) .....	46
3.2.11 Somatosensible Kerne.....	48
Ncl. sensorii n. trigemini principalis.....	48
Ncll. vestibulares.....	48
3.2.12 Formatio reticularis medialis.....	50
Ncl. reticularis gigantocellularis.....	50
Ncl. praepositus hypoglossi.....	50
3.2.13 Medulla spinalis.....	51
3.3 Tabellarische Zusammenfassung der Lokalisation des HCN4-Kanalproteins im ZNS der Ratte.....	52
<b>4 Diskussion</b> .....	55
4.1 Antikörper-Charakterisierung.....	55
4.2 Lokalisationsanalyse des HCN4-Kanalproteins im zentralen Nervensystem der Ratte.....	57
4.3 Co-Lokalisation der HCN-Kanäle.....	65
4.4 Channelopathien.....	68
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	71
<b>6 Anhang</b> .....	73
6.1 Vergleich der Ergebnisse mit veröffentlichten Daten.....	73
6.2 Untersuchte Medikamente.....	78
6.3 Voraussage der Strukturbestimmung des HCN4-Kanals.....	79
6.4 Homologiesuche.....	81
<b>7 Literaturverzeichnis</b> .....	86
<b>8 Danksagungen</b> .....	92
<b>9 Curriculum vitae</b> .....	93

3V	Dritter Ventrikel	Cx	Cortex
4V	Vierter Ventrikel	D3V	Dorsaler Anteil des dritten Ventrikels
5-HT <sub>4</sub>	Serotonin <sub>4</sub> Rezeptor	d	dorsal
5-HT <sub>7</sub>	Serotonin <sub>7</sub> Rezeptor	Da	Dalton
7	Ncl. n. facialis	DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
12	Ncl. n. hypoglossus	DCIC	dorsaler, corticaler Bereich des Colliculus inferior
12n	N. hypoglossus	DG	Fascia/Gyrus dentatus
III	N. oculomotorius	DL	dorsolateraler Bereich des Ncl. motorius n. trigemini
V	N. trigeminus	DLL	dorsaler Unterbereich der Ncll. lemnisci lateralis
V <sub>I</sub>	1. Ast des N. trigeminus - N. ophthalmicus	DLG	Ncl. geniculatum laterale dorsale
V <sub>II</sub>	2. Ast des N. trig. - N. maxillaris	DMSO	Dimethylsulfoxid
V <sub>III</sub>	3. Ast des N. trig. - N. mandibularis	DNA	Desoxyribonukleinsäure
VI	N. abducentis	DpG	Stratum griseum profundum des Colliculus superior
VII	N. facialis	DpWh	Stratum medullare (album) profundum des Colliculus superior
X	N. vagus	ECIC	äußerer, corticaler Bereich des Colliculus inferior
XII	N. hypoglossus	E. coli	Escherichia coli
A <sub>1</sub>	Adenosin <sub>1</sub> Rezeptor	ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
Abb.	Abbildung	EPSP	exzitatorische postsynaptische Potentiale
ABC	Avidin-Biotin-Komplex	E-Wert	bezeichnet den Erwartungswert der für eine gefundene Homologie
AC	Adenylatcyclase	Fa.	Firma
AC	Ansa cervicalis	g	Gramm
AD	M. digastricus	GC	Guanylatcyclase
AK	Antikörper	GG	M. genioglossus
Aq	Aquaeductus	GH	M. geniohyoideus
ar	Radiatio acoustica	GrDG	Stratum granulosum des Gyrus dentatus
AS	Aminosäuren	G <sub>s,o,i</sub>	stimulierende und inhibierende G-Proteine
Ba <sup>2+</sup>	Barium	h	Stunde(n)
BCNG	<i>brain cyclic nucleotide-gated channel</i>	H <sub>2</sub>	Histamin <sub>2</sub> Rezeptor
BSA	Rinderserum-Albumin ( <i>bovine serum albumine</i> )	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
°C	Grad Celsius	HAC	<i>hyperpolarization-activated cation channel</i>
C1	Rückenmarksabschnitt in Höhe des ersten Halswirbels	HCN	<i>hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channel</i>
CA	Cornu ammonis des Hippocampus	HEK 293	Menschliche, embryonale Nierenzellen ( <i>human embryonic kidney</i> )
CA1, -2, -3	Unterbereiche des Cornu ammonis	HY	M. hyoglossus
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat	IBI	Innere Oberfläche des DG
CC	Canalis centralis	I <sub>h</sub>	<i>hyperpolarization-current</i>
cc	Corpus calosum	I <sub>f</sub>	<i>funny-current</i>
cDNA	revers transkribierte DNA	I <sub>q</sub>	<i>queer-current</i>
CeCv	Ncl. centralis cervicalis	I <sub>AR</sub>	<i>anomalous rectifier-current</i>
Cg	Cortex ciguli	I <sub>IR</sub>	<i>inward rectifier-current</i>
CGL	Corpus geniculatum laterale	IgA, -G, -M	Immunglobulin der Subklasse A, G, oder M
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-Monophosphat	IGL	Intergeniculatum Flügel
CGM	Corpus geniculatum mediale	IHC	immunhistochemisch
CHF	kongestive (dilatative) Herzinsuffizienz	ILL	intermediärer Unterbereich der Ncll. lemnisci lateralis
CIC	centrale Bereich des Colliculus inferior		
CNG	zyklisches Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal ( <i>cyclic nucleotide-gated channel</i> )		
cNMP	zyklische Nukleotid Monophosphat- Bindestelle		
COOH	Carboxy-Terminus einer Polypeptidkette (C-Terminus)		
CPu	Ncl. caudatus - Putamen		



IMM	Ncl. intermediomedialis	MVe	mediales Kerngebiet der Ncll. vestibulares - Ncl. Schwalbe
InG	Stratum griseum medium des Colliculus superior	MvePC	Ncl. vestibulares mediales parvocellulares
InWh	Stratum medullare medium des Colliculus superior	MveC	caudaler Anteil des Ncl. vestibulares mediales
i. p.	intra peritoneal	MveMC	magnocellulärer Bereich des Ncl. vestibulares mediales
IP	Immunpositiv	MY	M. Mylohyoideus
IPSP	inhibitorische postsynaptische Potentiale	N.	Nervus
IR	Immunreaktion, immun histochemische Reaktion	NA <sub>β</sub>	β-adrenerger Rezeptor
ISH	<i>In situ</i> Hybridisierung	NB	Northern Blot
KLH	Hämocyanin der Napfschnecke ( <i>keyhole limpet hemocyanin</i> )	Ncl.	Nucleus
kg KG	Kilogramm Körpergewicht	Ncll.	Nuclei
l	Liter	ND	nicht durchgeführt
LatC	Ncl. lateralis cervicalis	NGS	normales Ziegen Serum ( <i>Normal Goat Serum</i> )
Li <sup>+</sup>	Lithium	NH <sub>2</sub> -Terminus	Amino-Terminus einer Polypeptidkette (N-Terminus)
LL	Ncll. lemnisci lateralis	nm	Nanometer
LMol	Startum lacunosum moleculare des Hc	NO	Stickstoffmonoxid
LP	Ncl. parabrachialis lateralis	OBI	Äußere Oberfläche des DG
LSO	Oliva superior lateralis	OD	Optische Dichte
LSp	Ncl. lateralis spinalis	Op	Stratum opticum des Colliculus superior
LV	lateral Ncl. des MG	OPD	o-Phenylenediamin dihydrochlorid
LVe	laterales Kerngebiet der Ncll. vestibulares - Ncl. Deiter	OPμ	μ-Opioider-Rezeptor
m	Meter	Or	Stratum oriens des Hc
M	Molar	OV	ovoider Nucleus des MG
M. (Mm.)	Muskel(n)	OX	Chiasma opticum
M <sub>a</sub>	anteriorer, tiefer Anteil des M. masseter	PKA	Proteinkinase A
M <sub>s</sub>	superficieller Anteil des M. masseter	P <sub>0</sub>	Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle
MBS	3-Maleimidobenzoyl-N-hydroxy-succinimidester	PAG	Substantia grisea centralis mesencephali
Me5	Ncl. sensorii n. trigemini mesencephalicus	PB	<i>phosphate buffer</i>
MGD	Ncl. dorsalis des Corpus geniculatum mediale	PBS	<i>phosphate-buffer-salin</i>
MGM	Ncl. medialis des Corpus geniculatum mediale	PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
MGV	Nucleus ventralis des Corpus geniculatum mediale	PFA	Paraformaldehyd
MHb	Ncl. habenulae medialis	pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
min.	Minute(n)	P <sub>1</sub>	M. Pterygoideus lateralis
MIRP1	MinK Related Peptide1	P <sub>m</sub>	M. Pterygoideus medialis
μM	mikro (10 <sup>-6</sup> ) Molar	P <sub>Na<sup>+</sup>/P<sub>K<sup>+</sup></sub></sub>	relative Permeabilität von Na <sup>+</sup> - gegenüber K <sup>+</sup> -Ionen
Mo	motorischer Cortex	PoDG	Stratum plexiforme des Gyrus dentatus
Mo5	Ncl. motorius n. trigemini	Pr5	Ncl. sensorii n. trigemini principalis
mRNA	messenger Ribonukleinsäure	Pr	Ncl. praepositus hypoglossi
MPO	Ncl. praeopticus medialis	Py	Stratum pyramidale des Hc
MPOC	zentralen Unterbereich des Ncl. praeopticus medialis	py	Tractus pyramidalis
MPOL	lateralen Unterbereich des Ncl. praeopticus medialis	R	Ncl. Ruber
MPOM	medialen Unterbereich des Ncl. praeopticus medialis	RA	rechtes Atrium, rechter Vorhof
MSO	Oliva superior medialis	Rad	Stratum radiatum des Hc
mV	Milli (10 <sup>-3</sup> ) Volt	rh	Fisura rhinalis
		RNA	Ribonukleinsäure
		RT	Raumtemperatur

Rt	Ncl. reticularis thalami
RT-mPCR	<i>reverse transcription multiplex polymerase chain reaction</i>
s (sek)	Sekunde
S1-S6	Transmembransegmente
SCG	Ganglion cervicale superius
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat - Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Se	sensorischer Cortex
SHG-Peptid	entspricht der am C-Terminus befindliche Region 1048-1083 des hHCN4-Proteins
SNR	Substantia nigra
SO	Hauptpol des Ncl. supraopticus
SOC	Oliva superior Komplex
SOR	retrochiasmatische Teilbereich des Ncl. supraopticus
SPO	Ncl. paraolivarius superius
Sp5	Ncl. sensorii n. trigemini spinalis
SpIH	Strongylocentrotus purpuratus I <sub>h</sub>
SuG	Stratum griseum superfuciale des Colliculus superior
SpVe	caudales/spinales Kerngebiet der Ncll. vestibulares - Ncl. Roller
SuVe	oberes Kerngebiet der Ncll. vestibulares - Ncl. Bechterew
Str.	Stratum
STY	M. styloglossus
T	M. temporalis
Tab.	Tabelle
TVA	Tierversuchsanlage
Tz	Ncl. corporis trapezoidei
ü.N.	über Nacht
V <sub>1/2</sub>	Spannung bei der 50 % der Kanäle offen sind
V	Volt
v	ventral
VB	Ncl. ventrobasalis talami
VLG	Ncl. geniculatum laterale ventrale
VLL	ventraler Unterbereich der Ncll. lemnisci lateralis
VM	ventromedial Bereich des Ncl. motorius n. trigemini
VPO	Ncl. periolivarius ventralis
WAG/Rij	Wistar Ratten Albino Glaxo aus Rijswijk
WB	Western Blot
ZD7288	4-(N-ethyl-N-phenylamino)-1,2- dimethyl-6-(methylamino) pyrimidinium chloride
ZNS	Zentrale Nervensystem
ZO	Stratum zonale des Colliculus superior

## **1 Einleitung**

Biologische Systeme werden auf verschiedenen Ebenen, wie z.B. auf organismischer, zellulärer oder molekularer Ebene, durch rhythmische Aktivitäten beeinflusst und kontrolliert. So wird das rhythmische Feuern von neuronalen Netzwerken, das selbständige Schlagen des Herzens, der Schlaf-Wach Rhythmus, die periodische Hormonsekretion, die Genexpression oder die Proteinphosphorylierung durch Rhythmen generiert. Diese rhythmischen Aktivitäten besitzen ein sehr breites Frequenzspektrum, das von hundertstel Sekunden bis hin zu Jahren reichen kann (Santoro & Tibbs 1999). Zellen haben die Fähigkeit nieder- oder hochfrequenten Rhythmen zu bilden. Ein Beispiel für niederfrequente Rhythmen ist das Zusammenspiel zwischen Transkription und Translation, hervorgerufen durch die "Clock" Gene. Es scheint so, dass dieses Zusammenspiel dem primären zirkadianen Schrittmacher dient (Hastings 1997). Hochfrequente Rhythmen werden von spezialisierten Zellen erzeugt und sind für eine Vielzahl von Körperfunktionen verantwortlich. Aufgrund eines komplexen Zusammenspiels verschiedener Ionenkanäle (z.B. in Zellen des Herzens und in Neuronen) kommt es zu endogener rhythmischer Aktivität, welche für die jeweiligen Zellen oder Zellkomplexe charakteristisch ist (Santoro & Tibbs 1999).

Ionenkanäle sind Transportproteine, die sich in der Plasmamembran der Zelle befinden und der Interaktion zwischen extra- und intrazellulären Raum dienen. Es sind selektive Poren für den transmembranalen Transport von Ionen. Die elektrochemische Potenzialdifferenz ist die Triebkraft für den Transport und gibt Richtung und Menge des Transports vor. Ionenkanäle werden anhand ihres Aktivierungsmechanismus in ligandengesteuerte oder spannungsabhängige Ionenkanäle unterteilt. Durch extra- oder intrazelluläre Botenstoffe wird der Aktivierungsmechanismus der ligandengesteuerten Kanäle reguliert. Änderungen des Membranpotentials führen zur Aktivierung der spannungsabhängigen Ionenkanäle. Zusätzlich können spannungsabhängige Ionenkanäle anhand ihrer Selektivität für Ionen unterteilt werden. Man unterscheidet Ionenkanäle, die selektiv für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Cl}^-$  sind, im Vergleich zu den Kanälen, die nicht- oder gering selektiv gegenüber diesen Ionen sind (Klinke & Silbernagl 2000).

### **1.1 Hyperpolarisationsströme**

Eine wichtige Rolle in der Kontrolle von rhythmisch elektrischer Aktivität spielt vor allem eine besondere Art von Ionenkanal. Bei diesem Ionenkanal handelt es sich um einen durch Hyperpolarisation aktivierbaren, nicht selektiven Kationen-Kanal, welcher durch  $\text{Cs}^{2+}$  blockiert wird, während er gegenüber  $\text{Ba}^{2+}$  unempfindlich bleibt (siehe Kapitel 1.5). Die von diesem Ionenkanal erzeugten Ströme wurden erstmals in Zellen des Sinusknotens in den späten 70er Jahren entdeckt (Brown *et al.* 1979). Ionenströme mit ähnlichen zuvor beschriebenen Eigenschaften wurden innerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) zuerst in Photorezeptoren und anschließend in einer großen Breite im gesamten ZNS beschrieben (Attwell & Wilson 1980, Halliwell & Adams 1982, Kubota *et al.* 1985). Die im Folgenden aufgeführten Ionenströme weisen ähnliche elektrophysiologische Merkmale auf:

- $I_h$  für „hyperpolarization“ in Stäbchenzellen der Retina (Attwell & Wilson 1980)
- $I_f$  für “funny” in Sinusknotenzellen (Brown & DiFrancesco 1980)
- $I_q$  für “queer” im Hippocampus (Halliwell & Adams 1982)
- $I_{AR}$  für “anomalous rectifier“ im sensorischen Cortex der Katze (Spain *et al.* 1987)
- $I_{IR}$  für “inward rectifier“ in dem Nucleus raphe dorsalis (Williams *et al.* 1988)

Diese besonderen Ionenströme wurden des Weiteren in vielen anderen Geweben gefunden, welche rhythmische Aktivitäten aufweisen, wie z.B. im Hypothalamus (Arroyo *et al.* 2006), in der Adenohypophyse (Tian & Shipston 2000), im Nervus opticus (Eng *et al.* 1990), im Nervus vagus (Dalle *et al.* 2001), in der hinteren sensiblen Spinalnervenzwurzel (Wang *et al.* 1997), im Ganglion cervicale superius (Lamas 1998) und in peripheren Nervenfasern (Takigawa *et al.* 1998). Des Weiteren in glatten Muskelzellen der Vena portae (Greenwood & Prestwich 2002), des Ileums (Yanagida *et al.* 2000), des Stratum circulare und longitudinale, des Myometriums von schwangeren Ratten (Okabe *et al.* 1999, Satoh 1995) und des Musculus detrusor vesicae (Green *et al.* 1996).

## **1.2 Hyperpolarisations-aktivierter und zyklisch Nukleotid-gesteuerter Kationenkanal**

Erst 20 Jahre nach Entdeckung des  $I_h$  ( $I_f$ ,  $I_q$ ) -Stroms wurden mehrere Gene identifiziert und kloniert, die Proteine kodieren, welche die  $I_h$ -Strom produzierenden Kanäle bilden. Die Identifizierung der Gene erfolgte zeitgleich durch mehrer Forschungsgruppen, so dass anfänglich gleiche Gene unterschiedlich benannt wurden [brain cyclic nucleotide-gated channel (BCNG)- Santoro *et al.* 1998; hyperpolarization-activated cation channel (HAC) - Ludwig *et al.* 1998 und Strongylocentrotus purpuratus  $I_h$  (SpIH) - Gauss *et al.* 1998]. In der Veröffentlichung von Clapham (1998) wurde der Name „**hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels**; (HCN)“ (Hyperpolarisations-aktivierte und zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle) vorgeschlagen und seitdem generell verwendet (Tabelle 1.1).

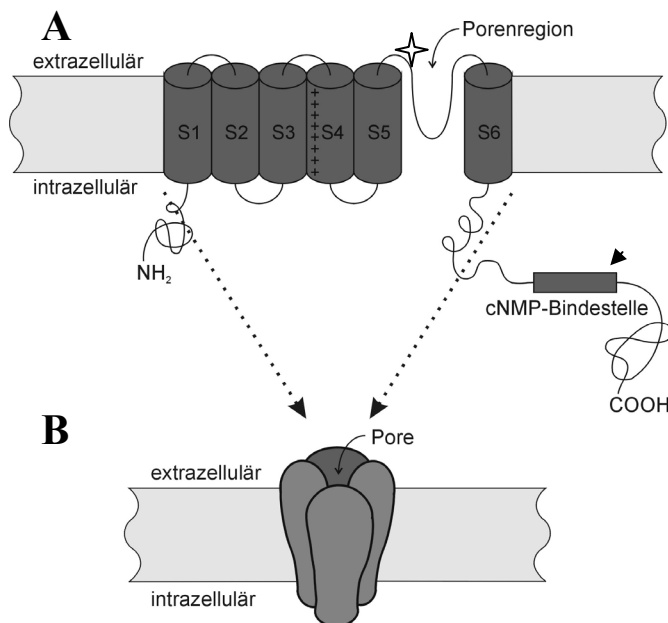
Während in den untersuchten Vertebraten jeweils vier verschiedene HCN-Gene identifiziert wurden, fand man in Invertebraten (Seeigel, Seidenspinner und Fruchtfliege) jeweils nur ein oder zwei Gene (Tabelle 1.1, Gauss & Seifert 2000, Galindo *et al.* 2005). Die vier verschiedenen Isoformen werden bei den Säugetieren als HCN1 bis HCN4 bezeichnet, wobei ein Präfix die Spezies kennzeichnet (**h**uman; **m**ouse; **r**at; **r**abbit).

Name	Originaler Name	Spezies
<b>HCN1</b>	HAC2/mBCNG-1/hBCNG-1	Maus/Maus/Mensch
<b>HCN2</b>	HAC1/hHCN2/ mBCNG-1/ hBCNG-2	Maus/Mensch/Maus/Mensch
<b>HCN3</b>	HAC3/mBCNG-4	Maus/Maus
<b>HCN4</b>	HAC4/hHCN4/mBCNG-3	Kaninchen/Mensch/Maus
<b>spHCN1</b>	SPIH	Seeigel
<b>spHCN2</b>	spHCN2	Seeigel
<b>HvHCN</b>	HvCNG	Seidenspinner
<b>DmHCN</b>	DMIH	Fruchtfliege

**Tab. 1.1:** Zusammenfassung der HCN-Gene in Vertebraten und Invertebraten

### 1.3 Aufbau des HCN-Kanals

Die HCN-Kanäle gehören zur Superfamilie der spannungsabhängigen Kationen-Kanäle und sind mit dem  $K^+$ -Kanal vom Typ *EAG*-, *Shaker*-, *HERG*-, *KAT1*- und mit dem CNG-Kanal verwandt (Biel *et al.* 1999, Gauss & Seifert 2000, Ludwig *et al.* 1998, Santoro & Tibbs 1999). Aufgrund der aus der Aminosäuresequenz hervorgegangenen Voraussage der Sekundärstruktur (siehe Kapitel 6.3) geht man davon aus, dass das HCN-Kanalprotein wahrscheinlich sechs transmembranäre Helices (S1-S6), ein positiv geladenes S4 Segment und eine Porenregion zwischen S5 und S6 mit intrazellulär liegenden  $NH_2$  und  $COOH$ -Termini besitzt (Abbildung 1.1). Am C-Terminus der Aminosäuresequenz befindet sich eine 120 Aminosäuren (AS) lange cNMP-Bindestelle, welche aus drei  $\alpha$ -Helices (A-, B- und C-Helix) und einer zwischen der A-Helix und der B-Helix liegenden anti-parallelen  $\beta$ -Faltblattstruktur besteht (Weber & Steitz 1987, Shabb & Corbin 1992).



**Abb. 1.1:** **A:** Schematische Darstellung eines HCN-Kanals. Zwischen S5 und der Porenregion befindet sich eine mutmaßliche Stickstoff gebundene Glycosylierungsstelle (✱) und an der cNMP Bindestelle eine mutmaßliche Proteinkinase A (PKA) Phosphorylierungsstelle (➔). **B:** Modell eines HCN-Kanals, der durch vier Untereinheiten gebildet wird. Bilder übernommen von Kaupp & Seifert 2001.

Aus der Analogie zu den  $K^+$ -Kanälen vom *Shaker*-Typ und CNG-Kanälen wird vermutet, dass vier Untereinheiten einen Kanal bilden (Jan & Jan 1997, Biel *et al.* 1999, Kaupp & Seifert 2001). Diese Theorie wird durch den Fund einer 52 AS langen Sequenz unterstützt. Diese spezifische Region spielt eine große Rolle in der Bildung eines Tetramers durch aminoterminal Interaktionen und Plasmamembranlokalisation, ähnlich der T1 Region im *Shaker*-Kanal (Kobertz & Miller 1999, Proenza *et al.* 2002). Diese Sequenz befindet sich vor der S1 Helix und zeigt in allen vier HCN-Isoformen eine hohe Sequenzidentität (> 90%). Bislang ist aber noch nicht erwiesen, ob sich die HCN-Kanäle *in vivo* zu funktionellen homooligomeren oder heterooligomeren Kanälen umformen können (siehe Kapitel 4.3).

Eine Vielzahl von *in vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass HCN1-4 homooligomere Kanäle jeweils charakteristische elektrophysiologische Eigenschaften besitzen (siehe Kapitel 1.5). Es gibt bisher nur wenige Arbeiten in denen gezeigt wurde, dass HCN1 und HCN2 heterooligomere Kanäle bilden (Chen S *et al.* 2001, Ulens & Tytgat 2001). Diese in *Xenopus*-Oozyten exprimierten Kanäle zeigen im Gegensatz zu den homooligomeren Kanälen gemischte elektrophysiologische Eigenschaften. In Geschmackszellen der Papillae vallatae der Zunge wurde des Weiteren gezeigt, dass HCN1- und HCN4-Kanäle co-exprimiert werden (Stevens *et al.* 2001). Neue Ergebnisse weisen auf die Möglichkeit hin, dass diese Schrittmacherkanäle eine  $\beta$ -Untereinheit (MIRP1 - MinK Related Peptide1) zusätzlich zu den HCN Untereinheiten mit einbeziehen (Yu *et al.* 2001). Die Co-Expression von MIRP1 mit HCN1 oder HCN2 hat Veränderungen in der Aktivierungs- / Deaktivierungskinetik gezeigt, so dass die Gegenwart einer  $\beta$ -Untereinheit zur Kinetikvielfalt von HCN-Kanälen beiträgt (ausführlicher in Kapitel 4.3).

#### **1.4 Homologien der HCN-Proteine**

Die vier HCN-Isoformen sind eng miteinander verwandt und zeigen auf der ganzen Aminosäuresequenz eine 60%ige Aminosäuren-Identität. Im Bereich der transmembranen Segmente S1 bis S6 und an der cNMP-Bindestelle findet man eine noch stärkere AS-Sequenzhomologie (80-90%ige AS-Identität). Hingegen zeigen die intrazellulär liegenden N- und C-terminalen Bereiche der vier Untereinheiten eine geringere AS-Sequenz-Identität untereinander. HCN2 weist eine 90,6%tige Homologie mit HCN4 auf (Biel *et al.* 1999, Santoro & Tibbs 1999). Das HCN4-Gen einer Ratte zeigt eine 97%ige Ähnlichkeit mit dem HCN4-Gen einer Maus und ist mit dem menschlichen HCN4-Gen identisch (Monteggia *et al.* 2000).

### 1.5 Elektrophysiologische Eigenschaften des HCN-Kanals

- Der HCN-Kanal wird durch eine Hyperpolarisation der Plasmamembran aktiviert, im Gegensatz zu den meisten Ionenkanälen, welche durch Depolarisation aktiviert werden. Je nach Zellart öffnen sich die Kanäle bei einem Membranpotential von -65 bis -95 mV (Review Gauss & Seifert 2000).
- Der HCN-Kanal ist ein nicht selektiver Kationen-Kanal. Er ist vor allem für  $K^+$ -Ionen aber auch für  $Na^+$ -Ionen permeabel. Die relative Ionen-Permeabilität  $P_{Na}/P_K$  des Ionenkanals ist abhängig von der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration und variiert zwischen 0,2 und 0,4 (Review: Pape 1996, Gauss & Seifert 2000). Dieser Kanal ist aber nicht für alle Kationen permeabel, so ist er z.B. für  $Li^+$  ( $P_{Li}/P_{Na}$  0,06) undurchlässig. Andererseits werden bivalente Ionen und Anionen transportiert (Pape 1996).
- Die Aktivierung dieses Kanals wird durch zyklische Nukleotide reguliert, welche an der cNMP Bindestelle am C-terminalen Bereich binden. cAMP und cGMP bewirken eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit. Gegenüber cGMP zeigt cAMP eine 10-mal höhere Affinität zu der cNMP-Bindestelle (Ludwig *et al.* 1998, Biel *et al.* 1999). HCN1-4 werden durch cAMP unterschiedlich modelliert. HCN1 wird nur wenig durch cAMP reguliert und die Aktivierungskurve verschiebt sich nur um 2-5 mV zu positiveren Potentialen (Santoro *et al.* 1998, Wainger *et al.* 2001). HCN2 zeigt mit 12-15 mV deutlich bessere Ergebnisse (Ludwig *et al.* 1999, Wainger *et al.* 2001). Für HCN4 werden für unterschiedliche Zellen verschiedene Werte veröffentlicht: 11 mV (Seifert *et al.* 1999), 15 mV (Ludwig *et al.* 1999) und 23 mV (Ishii *et al.* 1999). Für HCN3 wurden über eine lange Zeit keine Werte veröffentlicht und es wurde sogar die Vermutung geäußert, dass HCN3 keine funktionalen homomultimeren Kanäle bildet (Chen *et al.* 2001). Erst 2005 wurde von Mistrik und seinen Mitarbeitern gezeigt, dass HCN3 als einziger die Aktivierungskurve um 5 mV zu negativen Potentialen verschiebt.
- Die vier verschiedenen HCN-Kanäle weisen unterschiedliche Aktivierungsgeschwindigkeiten auf. Für HCN1 variiert die Aktivierungszeitkonstante zwischen 100 und 300 ms (bei -130 bis -100 mV) mit einer halbmaximalen Offenwahrscheinlichkeit ( $V_{1/2}$ ) bei etwa -100 mV (Santoro *et al.* 1998). Für HCN2 liegt die Zeitkonstante zwischen 200 und 500 ms (bei -140 bis -100 mV) mit  $V_{1/2}$  bei etwa -100 mV (Ludwig *et al.* 1999). Die Aktivierungskonstanten für HCN3 (bei -140 mV  $470 \pm 32$  ms) fanden sich in den Bereichen, die für HCN4 beobachtet wurden (Mistrik *et al.* 2005). HCN4 weist Zeitkonstanten von mehreren hundertstel Millisekunden auf ( $659 \pm 49$  ms bei -140



mV) und  $23 \pm 9$  s (bei -110 mV),  $> 20$  s (bei -70 mV) und  $V_{1/2}$  bei -75 mV (Ludwig *et al.* 1999, Seifert *et al.* 1999, Ishii *et al.* 1999).

- Eine charakteristische Eigenschaft des Schrittmacher-Kanals ist die Blockierung seines Einwärtsstromes durch niedrige Konzentrationen von extrazellulären  $\text{Cs}^{2+}$  (0,1-5 mM), während er gegenüber  $\text{Ba}^{2+}$  relativ unempfindlich bleibt.  $\text{Ba}^{2+}$  ist ein Blocker für den einwärtsrektifizierenden  $\text{K}^+$ -Kanal und den hyperpolarisations-aktivierbaren  $\text{Cl}^-$ -Kanal (DiFrancesco 1982, Santoro & Tibbs 1999). Diese Eigenschaften ermöglichen eine Identifizierung der HCN-Kanäle gegenüber anderen Kanälen. Seit 1995 wird zur sicheren Identifizierung des HCN-Kanals in elektrophysiologischen Versuchen zusätzlich eine bradycard wirkende Substanz, *4-(N-ethyl-N-phenylamino)-1,2-dimethyl-6-(methylamino) pyrimidinium chloride* (ZD7288), benutzt, welche den HCN-Kanal spezifisch blockt (Harris & Constanti 1995).
- Die Permeabilität der Kationen wird durch extrazelluläre  $\text{Cl}^-$ -Ionen moduliert (Gauss & Seifert 2000), aber bisher wurde die physiologische Wirkung auf den HCN-Kanal noch nicht verstanden (Frace *et al.* 1992, Biel *et al.* 1999).
- Versuche im ventrobasalen Thalamus haben gezeigt, dass der intrazelluläre pH-Wert einen direkten Einfluss auf den  $I_h$ -Strom besitzt. So verschiebt ein intrazellulär saures Milieu (pH 6,7) die  $V_{1/2}$  um 2-3 mV zu negativeren Potentialen (Munsch & Pape 1999a) und verlangsamt dadurch die Aktivierungsgeschwindigkeit. Acetacolamid, ein Carboanhydrasehemmer, bewirkt einen Anstieg des intrazellulären pH-Wertes in Neuronen. Durch die Wirkung auf den  $I_h$ -Strom könnte in antiepileptischen Therapien verwendetes Acetacolamid seinen Effekt auf die Erkrankung zeigen (Reiss & Oles 1996, Munsch & Pape 1999b). Im Gegensatz dazu wurde veröffentlicht, dass extrazelluläre Protonen die in den Papillae vallatae der Zunge co-exprimierten HCN1- und HCN4-Kanäle aktivieren und dadurch als zusätzliche Rezeptoren der sauren Geschmacksempfindung beitragen (Stevens *et al.* 2001).
- Eine Erhöhung der Temperatur beschleunigt die Aktivierungszeitkonstante und verschiebt die Aktivierungskurve zu positiveren Potentialen (12 mV/10°C, Yanagida *et al.* 2000).

### **1.6 Modulatoren des HCN-Kanals**

Neurotransmitter und Stoffwechselprodukte zeigen signifikante regulatorische Wirkungen auf den HCN-Kanal. So werden die HCN-Kanäle über  $\beta$ -adrenerge (Pape & McCormick 1989), serotonerge (Bobker & Williams 1989, Pape & McCormick 1989) und histaminerge Rezeptoren positiv beeinflusst (Kamondi & Reiner 1991, McCormick & Williamson 1991, Brown *et al.* 2001). Der durch Liganden aktivierte Rezeptor verändert das  $G_s$ -Protein und steuert die Aktivierung der Adenylatcyclase. Letztendlich wird eine Erhöhung des cAMP und dadurch eine positive Verlagerung der Aktivierungskurve (bis zu +10 mV) erreicht, wobei der verantwortliche Serotoninrezeptor 1996 noch nicht spezifiziert wurde (Pape 1996). Heute weiß man aber, dass der 5-HT<sub>7</sub> Rezeptor in Zellen des Nucleus anteriodorsales thalami den HCN-Kanal modulieren kann (Chapin & Andrade 2001). Der 5-HT<sub>4</sub> Rezeptor zeigt hingegen in Hippocampus CA1 Pyramidenzellen keinen Einfluss auf den HCN-Kanal (Chapin *et al.* 2002).

Andere Hormone und Neurotransmitter wie z.B. Acetylcholin erniedrigen den intrazellulären cAMP-Spiegel, dadurch wird die Frequenz und der Umfang, zu welchen  $I_f$ -Kanäle nach einem Aktionspotential geöffnet werden, gehemmt. Infolgedessen wird die Feuerungsfrequenz der Schrittmacherpotentiale verringert (DiFrancesco *et al.* 1989). Rezeptoren, welche eine negative Verbindung zur Adenylatcyclase haben und dadurch eine Senkung des cAMP bewirken, sind die Adenosin<sub>1</sub>- (Pape 1992) und die  $\mu$ -Opioiden-Rezeptoren (Svoboda & Lupica 1998). Sie führen über die Aktivierung der G-Proteine  $G_o$  und  $G_i$  zur Hemmung der Adenylatcyclase.

Mehrere Studien deuten darauf hin, dass cAMP die  $I_f$ -Kanäle auch über die cAMP-abhängige Proteinkinase A vermittelte Phosphorylierung stimuliert (Chang *et al.* 1991, Abi-Gerges *et al.* 2000, Biel *et al.* 2002).

Stickstoffmonoxid (NO) stimuliert den  $I_h$ -Kanal. Intrazellulär lösliche Guanylatcyclasen werden durch Stickstoffmonoxid aktiviert und führen zu einem Anstieg des zyklischen Guanosinmonophosphates (cGMP) (Pape & Mager 1992, Erdemli & Crunelli 2000).

### **1.7 Funktionen des HCN-Kanals**

In den Schrittmacherzellen des Herzens sind mindestens vier Arten von Ionenkanälen ( $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal vom T-Typ und L-Typ,  $\text{K}^+$ -Kanal und HCN-Kanal) an der Generierung von rhythmischer Aktivität beteiligt. Durch das Öffnen der T-Typ - und dann der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, wird eine Depolarisation der Zelle verursacht. Anschließend wird die Zelle durch das Öffnen der  $\text{K}^+$ -Kanäle repolarisiert. Am Ende eines jeden Aktionspotentials nähert sich das Membranpotential dem  $\text{K}^+$ -Gleichgewichtspotential (-80 mV). Durch die Hyperpolarisation der Membran werden die HCN-Kanäle geöffnet und ein  $\text{Na}^+$ -Einwärtsstrom setzt ein. Dies führt zur langsamen Depolarisation der Plasmamembran, bis das Schwellenpotential für ein neues Aktionspotential erreicht wird. Diese langsame Depolarisation dient als Schrittmacher und sie bestimmt dadurch die Zeit, welche zwischen aufeinander folgenden Aktionspotentialen verstreicht. Deshalb sind HCN-Kanäle verantwortlich für die Einleitung von rhythmischer Aktivität und an der Kontrolle der Frequenz beteiligt. Stimulierung der Herzzellen durch  $\beta$ -adrenerge Agonisten führt durch die Aktivierung einer Adenylzyklase zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP. Dieses bindet über die cNMP-Bindestelle direkt an den HCN-Kanal und führt durch die Modellierung des Kanals zur Erhöhung seiner Aktivität (DiFrancesco & Tortora 1991). Dadurch wird die durch den HCN-Kanal erzeugte Depolarisation beschleunigt, was zu einer Verkürzung der Zeitintervalle zwischen den Herzschlägen und dadurch wiederum zu einer Erhöhung der Herzfrequenz führt (Gauss & Seifert 2000).

Zusätzlich zum Herzen ist der  $I_h$ -Strom beteiligt an der Generierung von rhythmischen Aktivitäten im zentralen Nervensystem, so z.B. in Neuronen des thalamischen Relais und Neuronen der Oliva inferior (McCormick & Pape 1990, Pape 1996, Lüthi & McCormick 1998). In vielen Neuronen, die keine rhythmische Aktivität besitzen, sind die HCN-Kanäle an der Regulierung des Ruhemembranpotentials beteiligt (Pape 1996, Lamas 1998) und stellen unter anderen den Zellen einen Mechanismus zur Verfügung, welcher Hyperpolarisationsströme limitieren kann (Solomon *et al.* 1993, Bayliss *et al.* 1994, Ludwig *et al.* 1998). So wirkt die Regulierung des Ruhemembranpotentials effektiv Polarisationschwankungen der Membran entgegen, die infolge störender Einflüsse, wie z.B. Akkumulation von extrazellulären  $\text{K}^+$ -Ionen oder pH-Wert- und Temperatur-Abweichungen, entstehen können (Edman *et al.* 1992, Pape 1996). Die Steuerung des Membranpotentials spielt zusätzlich eine wichtige Rolle in der Integration synaptischer Signale (Pape 1996, Kaupp & Seifert 2001). So beeinflussen dendritische  $I_h$ -Ströme die Leitungseigenschaften von Dendriten und formen die Zeitintervalle von exzitatorischen postsynaptischen Potentialen

(EPSP, Magee 1999). In anderen Neuronen werden die Antworten auf Hyperpolarisation, die beispielsweise durch inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSP) ausgelöst werden, kontrolliert (Pape 1996, Lüthi & McCormick 1998). In Photorezeptoren wird die Dauer einer Hyperpolarisation, welche durch einen Lichtreiz eingeleitet wird, verkürzt (Attwell & Wilson 1980, Gauss & Seifert 2000). Man vermutet, dass präsynaptische  $I_h$  Ströme direkt an der Kontrolle der synaptischen Transmission über die Serotonin induzierte Änderung der cAMP Konzentration beteiligt ist (Beaumont & Zucker 2000).

Zusammenfassend werden den HCN-Kanälen die folgenden Funktionen zugeschrieben:

- **Generierung rhythmischer Schrittmacheraktivität**
- **Regulierung des Ruhemembranpotentials**
- **Einschränkung der exzessiven Hyperpolarisation**
- **Modulierung von IPSP und EPSP**
- **Beeinflussung des Entladungsmusters**
- **Synchronisation von neuronalen Aktivitäten**
- **Kontrolle der synaptischen Transmission**

### 1.8 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung einer detaillierten *Verteilungscharakteristik des HCN4-Kanalproteins im Rattengehirn* mittels Immunhistochemie. Zunächst war die Durchführung einer *Antikörper-Charakterisierung* notwendig. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Spezifität verschiedener Antikörper für HCN4 untersucht. Dazu dienten die Epitop-Charakterisierung, die Aminosäuresequenz-Homologiesuche, die Optimierung und Validierung eines immunhistochemischen Protokolls und der Vergleich der immunhistochemischen Versuche der einzelnen Antikörper untereinander, sowohl in der Ratte als auch in anderen Nagetieren (Maus, Hamster, Meerschweinchen).

## 2.1 Materialien

### 2.1.1 Chemikalien

Die nachfolgend aufgelisteten Chemikalien wurden bei den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), SIGMA (Deisenhofen) und Merck (Darmstadt) erworben.

#### **Firma Fluka:**

Acrolein  
Ammonium-Nickelsulfat  
DePex  
Isopentan  
Terpineol

#### **Firma SIGMA:**

3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)  
Glycin-Hydrochlorid  
Natrium-Borohydrid  
Natrium-Cacodylate  
o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid  
Rinderserumalbumin (BSA)  
Saponin  
Thimerosal  
TritonX 100  
TRIZMA<sup>®</sup> PRE-SET CRYSTALS  
Tween 20  
Wasserstoffperoxid

#### **Firma Merck:**

Aluminiumchlorid  
Chrom (III)- Kaliumsulfat- Dodecahydrat  
Dimethylsulfoxid (DMSO)  
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat  
Gelatine  
Glutardialdehyd  
Natrium-Acetat-Trihydrat  
Natriumazid  
Natriumcarbonat  
Natriumchlorid  
*tri*-Natriumcitrat Dihydrat  
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat  
Natriumdodecylsulfat  
Natriumhydrogencarbonat  
Natriumlauge  
Paraformaldehyd  
Pentobarbital  
Picrinsäure  
Saccharose  
Salzsäure  
Xylol

Das Milchpulver (entfettet), ein normaler Kaffeweißer, wurde in einem Supermarkt gekauft.

### 2.1.2 Immunochemikalien

Die Firma Vector (Burlingame, USA) lieferte Normal Goat Serum (NGS), biotinylierte Anti-Kaninchen IgG und biotinylierte Anti-Ratte IgG Antikörper (alle in Ziege immunisiert), Avidin-Biotin-Komplex (ABC) und ABC-Elite-Complex. Von der Firma Chemicon (Harrow, UK) wurde Chemiblocker bezogen.

### 2.1.3 Primärantikörper

Die mono- und polyklonalen Antikörper (AK) gegen die Region 1048 - 1083 des humanen HCN4-Proteins wurden gemeinsam von Prof. Dr. Kaupp (Institut für Biologische Informationsverarbeitung, Forschungszentrum Jülich GmbH) und Frau Dr. Kremmer (Institut für Molekulare Immunologie, München) hergestellt. Zur Herstellung der AK gegen das hHCN4-Protein wurde ein 35 Aminosäuren langes Peptid - von uns *SHG-Peptid* genannt -

synthetisiert (***SHGSLLLPASSPPPPQVPQRRGTPPLTPGRLTQDL***). Die nun synthetisierten Peptide wurden über den 3-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester (MBS) an Trägerproteine (Napfschnecken-Hämocyanin, keyhole limpet hemocyanin, KLH) gekoppelt. Vor der Immunisierung wurden die KLH gekoppelten Peptide durch Chromatographie gereinigt. Zur Herstellung von AK wurden Ratten und Kaninchen mit dem KLH-HCN4-Peptid immunisiert. Der weiteren Charakterisierung dienten zuletzt vier monoklonale (Ratte) und vier polyklonale (Kaninchen) Antikörper (Tabelle 2.1).

Von der Firma Alomone (Jerusalem, Israel) wurde ein durch Affinitätschromatographie gereinigter polyklonaler AK (APC-052) gekauft. Gegenüber den vier monoklonalen und den vier polyklonalen hergestellten AK, welche sich gegen den C-Terminus richten, ist der APC-052 AK gegen den N-Terminus des HCN4-Proteins gerichtet. Die Charakterisierung dieses AK erfolgte durch die Firma Alomone selbst. Dieser Antikörper war erst später käuflich erhältlich und diente der Kontrolle.

Name des AK	Immunisiertes Tier	Ig Charakter	AK gegen	Getestet mit WB an HEK Zellen	Getestet mit WB an Hirngewebe
<b>PPc64K</b>	Kaninchen	Polyklonal	C-Terminus	hHCN4	ND
<b>PPc73K</b>	Kaninchen	Polyklonal	C-Terminus	hHCN4	rRetina
<b>PPc74K</b>	Kaninchen	Polyklonal	C-Terminus	hHCN4	ND
<b>PPc76K</b>	Kaninchen	Polyklonal	C-Terminus	hHCN4	ND
<b>SHG-1E5</b>	Ratte	M, IgG 1	C-Terminus	hHCN4	rRetina, r/m Gehirn
<b>SHG-1E7</b>	Ratte	M, IgG 1	C-Terminus	hHCN4	rRetina
<b>SHG-2B12</b>	Ratte	M, IgG 1	C-Terminus	hHCN4	ND
<b>SHG-4A8</b>	Ratte	M, IgG 1	C-Terminus	hHCN4	ND
<b>APC-052</b>	Kaninchen	Polyklonal	N-Terminus		rGehirn

**Tab. 2.1:** Auflistung der immunhistochemisch (IHC) verwendeten Antikörper. Die Spezifität der AK gegen den C-Terminus des hHCN4-Proteins wurden an HEK 293 Zellen mit Hilfe des Western Blots (WB) getestet. An Hirngewebe (Ratte-r, Maus-m) durchgeführten WB erfolgten mit den AK PPc73K, SHG-1E5 und SHG-1E7. Mit den AK PPc64K, PPc74K, PPc76K, SHG-2B12 und SHG-4A8 wurden WB nicht durchgeführt (ND).

Zur Darstellung des immunhistochemischen Expressionsmusters des HCN-Kanals im Nagergehirn wurden für alle vier Untereinheiten 38 verschiedene HCN-AK getestet.

#### **2.1.4 Sekundärantikörper**

Von der Firma Jackson-Dianova (Hamburg) wurden Anti-Kaninchen IgG, Anti-Ratte IgG, und Anti-Ratte IgA/IgG/IgM (alle in Ziege immunisiert) biotinylierte AK erworben. Die

Firma Vector (Burlingame, USA) lieferte biotinylierte Anti-Kaninchen IgG und biotinylierte Anti-Ratte IgG (beide in Ziege immunisiert) AK.

Die verwendeten Sekundärantikörper richten sich gegen die Tierart, in welcher die Primärantikörper immunisiert wurden. Ziege-Anti-Kaninchen IgG gegen den polyklonalen AK und Ziege-Anti-Ratte IgG/IgM gegen die in Ratte immunisierten monoklonalen AK.

### **2.1.5 Utensilien**

Zur Anfertigung der Gehirnschnitte wurde sowohl ein Schlittenmikrotom mit Frigomobil (Hn 40) der Firma Reichert-Jung, als auch ein Vibratom (VT 1000S) der Firma Leica benutzt. Zur Fixierung der Gehirne auf dem Objektisch des Schlittenmikrotoms wurde Tissue Freezing Medium von der Firma Jung (Nussloch) und für den Vibratomobjektisch Plastic Bonding Adhesive von der Firma Permabond (Englewood) verwendet. Die pH-Werte wurden mit einem Messgerät der Firma Multical<sup>®</sup> gemessen. Objektträger wurden von den Firmen Engelbrecht und Star Frost (Adhäsiv-Objektträger), die Deckgläser von der Firma Menzel-Glaser (Braunschweig) bezogen. Digitale Fotos sind mit dem Axioplan 2 Mikroskop der Fa. Zeiss und einer Cool Snap Kamera der Fa. Roper Scientific (Ottobrun) gemacht worden.

### **2.1.6 Versuchstiere**

Für die vorliegende Arbeit wurde das Gehirngewebe von vier verschiedenen Nagetierarten untersucht (Ratten, Mäuse, Hamster und Meerschweinchen, Tabelle 2.2), wobei die drei letzt genannten Nagetierarten der Antikörpercharakterisierung dienten. Die Nagetiere wurden von der Tierversuchsanlage (TVA) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und aus dem Institut für Biologische Informationsverarbeitung, Forschungszentrum Jülich GmbH bezogen. Die Haltung der Nagetiere erfolgte unter Einhaltung der ethischen Richtlinien und der Direktiven des europäischen Gemeinschaftsrates (86/609/ECC). In der TVA wurden die Tiere in den dazu geeigneten Käfigen, bei gleich bleibender Temperatur (22°C), 50% Luftfeuchtigkeit und mit einem 12 Stunden Tag-/Nachtrhythmus gehalten. Den Tieren wurde Futter von der Firma Altromin (Lage) und Wasser ad libitum angeboten.

<b>Nagetier</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Stamm</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Gewicht (g)</b>	<b>Alter</b>
<b>Ratte</b>	50	Wistar	männlich	250-350	adult
<b>Maus</b>	15	Balb/c	männlich	26-32	adult
<b>Hamster</b>	10	AURA	männlich	40-50	adult
<b>Meerschweinchen</b>	4	PGW	männlich	400-500	adult

**Tab. 2.2:** Überblick über die verwendeten Nagetiere

## 2.2 Materialgewinnung

### 2.2.1 Präparation der Gehirne

Alle Tiere wurden vor der Perfusion mit Pentobarbital i. p. (50mg/kg KG Tier) in eine tiefe Narkose versetzt. Nach Eröffnung des Bauch- und Thoraxraumes wurde durch den linken Ventrikel eine stumpfe Kanüle in der Aorta ascendens mittels einer Klemme fixiert. Damit keine Luftblasen in das Gefäßsystem gelangten, wurde die Perfusionslösung bereits vor dem Einführen der Kanüle in den linken Ventrikel gestartet. Um den Abfluss der perfundierten Lösung zu garantieren, wurde anschließend das rechte Herzohr angeschnitten. Um den entsprechenden hydrostatischen Druck (100 - 115 mmHg) der perfundierten Tierart zu erlangen, wurde die Höhe des Perfusionsbestecks zwischen 130 und 150 cm variiert. Das Blutgefäßsystem wurde mittels der PBS Lösung (siehe unten) von Blutzellen freigespült. Direkt im Anschluss erfolgte die Fixierung des Gehirns mit verschiedenen Fixierungslösungen (siehe Kapitel 2.2.2). Die Verfärbungen der gering- bis nichtpigmentierten Nase, Augen und Pfoten dienten zur Kontrolle der Erfassung des gesamten Blutgefäßsystems. Alle Nagetiere wurden mit unterschiedlichen Mengen an PBS und Fixierungslösung (30 Minuten) perfundiert (Tabelle 2.3).

Nach erfolgter Perfusion wurden die Nagetiere dekapitiert. Mittels eines Schnittes von occipital nach frontal wurde die Kopfhaut eingeschnitten und die Schädeldecke freigelegt. Von der Medulla spinalis bis zum Bulbus olfactorius erfolgten zwei laterale Schnitte, die zur Freilegung des Gehirns führten, ohne dieses zu beschädigen.

Nagetierart	Perfusionsgeschwindigkeit (ml/min)	PBS (ml)	Fixierungslösung (ml)
<b>Maus</b>	2,5	10	70
<b>Hamster</b>	5	20	150
<b>Ratte</b>	15	60	450
<b>Meerschweinchen</b>	30	120	900

**Tab. 2.3:** Menge der verschiedenen Lösungen für die unterschiedlichen Nagetieren.

*PBS Lösung (phosphate-buffer-salin), pH-Wert 7,4:*

- 0,01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Puffer
- 0,15 M NaCl

Alle weiterhin verwendeten PBS Lösungen entsprechen dieser Zusammensetzung.



### 2.2.2 Fixierungslösungen

Zur optimalen Erhaltung der Antigen-Struktur wurden unterschiedliche Fixierungslösungen für die verschiedenen AK benötigt (siehe unten). Jede Fixierungslösung wurde am Tag der Präparation hergestellt und nach der pH-Wert Einstellung filtriert. Nach der Fixierung der Gehirne mittels der Perfusion wurden die Gehirne zumeist nachfixiert (siehe jeweiliges Protokoll). Die freipräparierten Gehirne wurden in der entsprechenden Fixierungslösung über Nacht (ü.N.) bei 4°C nachfixiert.

Die Perfusionsdauer der 1. Fixierungslösung wurde ohne Nachfixierung variiert (10, 20 und 30 min).

#### **1. Mod. Zamboni Fixierungslösung nach**

##### **Somogyi & Takagi (1982):**

- 40 g Paraformaldehyd (PFA)
- 500 ml Aqua dest. (70°C)
- 3 Tropfen 10 M NaOH
- 150 ml Picrinsäure
- 250 ml 0,4 M PB, pH-Wert 7,4
- Aqua dest. ergänzen bis 1000 ml
- pH messen und falls notwendig mit NaOH (10%) oder HCl (cc) auf pH-Wert 7,4 einstellen.

Nachfixierung mit Fixierungslösung Nr. 1.

#### **2. Mod. Zamboni Fixierungslösung nach**

##### **Görcs:**

- 40 g PFA
- 500 ml Aqua dest. (70°C)
- 3 Tropfen 10 M NaOH
- 150 ml Picrinsäure
- 6,6 g Cacodylsäure Natriumsalz
- 7,2 g NaCl
- Aqua dest. Ergänzen bis 1000 ml
- pH-Wert messen und falls notwendig mit NaOH (10%) oder HCl (cc) auf pH-Wert 7,4 einstellen.

Nachfixierung mit Fixierungslösung Nr. 2.

*PB Lösung (phosphate buffer), pH-Wert 7,4:*

- *Lösung A:* 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- *Lösung B:* 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
- Durch Titrierung von *Lösung A* und *Lösung B* wurde die Endlösung auf pH-Wert 7,4 eingestellt.

**3. Fixierungslösung Nr.1 mit 0,05%****Glutardialdehyd:**

- 40 g PFA
- 500 ml Aqua dest. (70°C)
- 3 Tropfen 10 M NaOH
- 150 ml gesättigte Picrinsäure
- 250 ml 0,4 M PB, pH-Wert 7,4
- 2,5 ml 25% Glutardialdehyd
- Aqua dest. Ergänzen bis 1000 ml
- pH-Wert messen und falls notwendig mit NaOH (10%) oder HCl (cc) auf pH 7,4-Wert einstellen

Nachfixierung mit Fixierungslösung Nr. 1.

**4. Fixierungslösung Nr.1 mit 0,5%****Glutardialdehyd:**

- 40 g PFA
- 500 ml Aqua dest. (70°C)
- 3 Tropfen 10 M NaOH
- 150 ml gesättigte Picrinsäure
- 250 ml 0,4 M PB, pH-Wert 7,4
- 25 ml 25% Glutardialdehyd
- Aqua dest. Ergänzen bis 1000 ml
- pH-Wert messen und falls notwendig mit NaOH (10%) oder HCl (cc) auf pH-Wert 7,4 einstellen

Keine Nachfixierung.

**5. Acrolein Fixierungslösung (Geyer & Feustel 1966)**

- 51 ml Acroleine (95%)
- 150 ml gesättigte Picrinsäure
- 7,2 g Natriumchlorid
- 6,6 g Cacodylsäure Natriumsalz
- Aqua dest. Ergänzen bis 1000 ml
- pH-Wert messen und falls notwendig mit NaOH (10%) oder HCl (cc) auf pH-Wert 7,4 einstellen

Keine Nachfixierung.

**6. Fixierung durch zwei Lösungen mit verschiedenen pH-Werten (Berod *et al.* 1981)***Fixierungslösung A:*

- 2 g PFA
- 50 ml 0,24 M Natriumacetat (70°C)
- Nach Abkühlung pH-Wert auf pH 6,5 einstellen mit 10% Essigsäure

*Fixierungslösung B:*

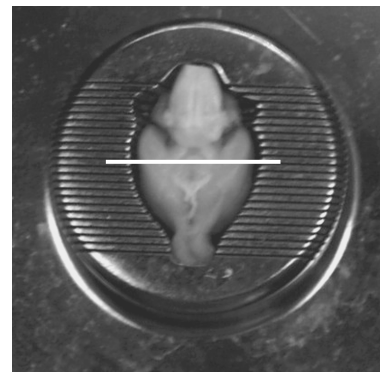
- 18 g PFA
- 450 ml 0,16 M Natriumhydrogencarbonat (70°C)
- Nach Abkühlung pH-Wert auf 9,5 einstellen

### **2.2.3 Histologische Präparation**

Zur Optimierung der Qualität der Schnitte wurden einige Gehirne in eine Eigelbmasse eingebettet. Das Eigelb wurde mit Formalindämpfen (35% Formalinlösung) über Nacht (bei Raumtemperatur, RT) fixiert (Adoff 1981).

Anschließend wurden die einzeln durch Eigelbmasse geschützten Gehirne, sowie alle anderen Gehirne entsprechend dem Protokoll zur Kryoprotektion behandelt. Hierfür wurden die Gehirne für jeweils einen Tag mit 10%, 20% bzw. 30% Saccharose mit 0,15 M NaCl in Aqua dest. bei 4°C belassen.

Die Gehirne wurden in eine Matrix gelegt und mit einer Rasierklinge im Bereich zwischen Bregma -3,5 und -5,5 coronal geschnitten (Abbildung 2.1). Die antero-posteriore Position des Orientierungsschnittes wurde kontinuierlich variiert, um nicht immer die gleiche Ebene zu treffen. Die Orientierungsebene für die Sagittalschnitte war ein Parasagittalschnitt 1,5 bis 3 mm lateral der Mittellinie. Für eine horizontale Schnittebene wurden die Gehirne direkt auf der ventralen Seite auf dem Objektisch des Schneideapparates fixiert.



**Abb. 2.1:** Rattengehirn in Matrix mit Markierungslinie in Schnittebene.

Die lückenlosen Schnittserien erfolgten am Schlitten-Gefriermikrotom bei -16 bis -20°C mit einem ungekühlten Messer oder am Vibratom bei RT. In beiden Fällen betrug die Schnittstärke der flottierenden Schnitte 70 µm. Das für das Gefriermikrotom verwendete Gewebe wurde in, auf -45 bis -50°C vorgekühltem Isopentan für 5 min eingefroren. Das zu schneidende Gewebe wurde mit Hilfe eines Klebers (Tissue Freezing Medium für das Schlitten-Gefriermikrotom bzw. Plastic Bonding Adhesive für das Vibratom) auf dem Objektisch befestigt. Mit Hilfe eines Pinsels wurden die Schnitte in mit PBS gefüllten Multiwell-Platten befördert und dort bis zur weiteren Behandlung belassen.

## 2.3 Immunhistochemie

### **2.3.1 Immunhistochemisches Protokoll**

Jeder der folgenden Schritte erfolgte auf einem Schüttler. Wenn nicht extra erwähnt erfolgten die einzelnen Schritte bei RT.

#### **1. Vorbehandlung der Schnitte**

- 3 x 30 min mit PBS waschen.
- Anschließend ü.N. in der Kühlkammer bei 4°C aufbewahren.

*Zur Lagerung der Schnitte (bei 4°C) können diese für diesen Behandlungsschritt mit 0,2% NaN<sub>3</sub> (Schutz vor Pilz- oder Bakterienbefall) behandelt werden.*

#### **2. Reduktion der freien Aldehydgruppen** (Für Fixierungslösung Nr. 3, Nr. 4 und Nr. 5)

- 2 x 2 min in Aqua dest. Waschen.

*Um das starke Schäumen im nachfolgenden Schritt zu reduzieren.*

- 20 min in Aqua dest. mit 1% NaBH<sub>4</sub> inkubieren.
- 3 x 1 min in Aqua dest. waschen (um das starke Schäumen zu stoppen).
- 3 x 20 min in PBS waschen.

#### **3. Blockierung der endogenen Peroxidase Aktivität**

- 30 min in einer PBS Lösung mit 1-2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubieren.
- 3 x 20 min in PBS waschen.

*Wie bei Punkt 1 ist auch hier eine Lagerung wie oben beschrieben möglich.*

#### **4. Permeabilitätserhöhung**

- Inkubation für 3 h bis ü.N. (RT) mit 0,4% Tween 20 / mit 0,4% Tween 20 und 0,2% Saponin / mit 0,4% Triton X 100 jeweils in PBS.
- 3 x 30 min in PBS waschen.

#### **5. Blockierung von unspezifischen Proteinbindungen**

- Inkubation für 30 min mit 10% NGS in PBS.

*Als Alternative wurden zusätzlich verschiedene Proteine (entfettetes Milchpulver, BSA oder Chemiblocker zwischen 1 und 6%) verwendet, mit dem Ziel den Hintergrund weiter zu reduzieren.*

#### **6. Inkubation mit dem Primärantikörper**

- Inkubation für 72 h bei 4°C mit dem Primärantikörper (Verdünnungen: 1:40 für SHG-1E5, 1:1500 für APC-052 und 1:3000 für PPc73K) in 1% NGS mit 5% DMSO, 0,2% Tween 20 und 0,1% NaN<sub>3</sub> in PB, pH 7,4.

*Es wurden mind. 3 und max. 5 Verdünnungen in Abhängigkeit des jeweiligen Antikörpers untersucht.*

**7. Inkubation mit dem Sekundärantikörper**

- 4 x 30 min in PBS waschen.
- Inkubation ü.N. (4°C) mit dem Sekundärantikörper Ziege-Anti-Ratte IgG/IgM für monoklonale Primärantikörper und mit Ziege-Anti-Kaninchen IgG für polyklonale Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 in 1% NGS mit 5% DMSO, 0,2% Tween 20 und 0,1% NaN<sub>3</sub> in PB, pH-Wert 7,4.

**8. Inkubation mit ABC Lösung**

- 4 x 30 min in PBS waschen.

*Parallel zu diesem Vorgang ABC Lösung ansetzen. Zuerst 20 µl Lösung A zu 10 ml PBS zugeben dann 20 µl Lösung B und 30 min verrühren.*

- Inkubation ü.N. (4°C) in ABC Lösung.

**9. Entwicklung**

- 4 x 30 min in PBS waschen.
- 1 x 30 min in 0,05 M Tris Puffer, pH-Wert 7,2 waschen.
- Entwicklung der Schnitte mit DAB Lösung für 30 bis 60 min unter kontinuierlicher Kontrolle am Mikroskop.

*Die Entwicklungslösung (20 mg DAB / 100 ml Tris Puffer) wurde erst eine halbe Stunde vor der Verwendung zubereitet. Zum Starten der Entwicklungslösung wurde unmittelbar vor der Entwicklung 500µl 0,3%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> der DAB Lösung hinzugefügt. Alternativ können Verstärkungsverfahren durch Anlagerung von Nickelammoniumsulfat (200mg/100ml) am chromogenen DAB zur Verstärkung des Reaktionsproduktes angewendet werden (Adams 1981).*

- Abstoppen der Reaktion durch 2 x waschen in Tris Puffer, pH-Wert 7,2.
- Aufbewahrung der Schnitte in PBS mit 0,2% NaN<sub>3</sub>.

**10. Aufziehen der Schnitte**

- Vor dem Aufziehen der Schnitte in 0,05 M Tris Puffer, pH-Wert 7,2 überführen.
- Aufziehen der Schnitte aus Chromalaungelatine auf Objektträger.
- Trocknen der Schnitte für mind. 24 h.

**11. Eindeckeln der Schnitte**

- 3 x je 30 min in Xylol.
- Eindeckeln der Schnitte mit DePex.

### **2.3.2 Negativkontrolle**

Um unspezifische Reaktionen des Sekundärantikörpers mit dem Gewebe zu identifizieren wurden Negativkontrollen durchgeführt. Hierfür wurde das immunhistochemische Protokoll (2.3.1) angewendet, unter Auslassung der Inkubation mit dem Primärantikörper. Blieben die Gewebeschnitte ungefärbt, konnte eine unspezifische Reaktion des Sekundärantikörpers ausgeschlossen und die spezifische immunhistochemische Reaktion des Primärantikörpers bekräftigt werden.

### **2.3.3 Absorptionskontrolle**

Die Spezifität des Primärantikörpers wurde des Weiteren durch Präinkubation der Primärantikörper-Lösung (1 ml) unter Zugabe von 10 µg des SHG-Peptides (ü.N., 4°C) verifiziert. Eine spezifische Bindung des Primärantikörpers an dem SHG-Peptid würde alle Primärantikörper verbrauchen und unter Anwendung des immunhistochemischen Protokolls keine positive immunhistochemische Reaktion aufweisen.

## **2.4. Antikörper-Charakterisierung**

### **2.4.1 Epitop-Charakterisierung**

Das *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) Nachweisverfahren diente der weiteren Spezifizierung der hergestellten AK. 14 AS lange Peptide (mit 10 AS Überlappung, siehe unten) wurden aus dem SHG-Peptid unter Verwendung eines multiplen Peptid-Synthetisierers (SYRO MultiSynTech GmbH, Witten) synthetisiert (Geysen *et al.* 1987). Die Reinheit der Peptide wurde mit Hilfe eines Mass-Spektrometers [matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)] bestimmt (Kaufmann *et al.* 1996).

SHGSLLLPPASSPPPPQVPQRRGTPPLTPGRLTQDL	SHG-Peptid
SHGSLLLPPASSPP	Peptid 1
LLLPPASSPPPPQV	Peptid 2
PASSPPPPQVPQRR	Peptid 3
PPPPQVPQRRGTPP	Peptid 4
QVPQRRGTPPLTPG	Peptid 5
QRRGTPPLTPGRLT	Peptid 6
GTPPLTPGRLTQDL	Peptid 7

**ELISA Protokoll** (Harlow & Lane 1988)

1. Inkubation des Peptides mit 100 µl Peptidlösung/Loch (10 µg Peptid/ml Aqua dest.) und Austrocknung ü.N. (37°C).
2. 5 x waschen mit Aqua dest.
3. Inkubation für 30 min bei 37°C mit 100 µl Blockierungslösung/Loch (2% BSA in PBS) zur Blockierung der freien Proteinbindungsstellen der Platte.
4. 5 x waschen mit 0,05% Tween 20 in PBS.
5. Inkubation für 30 min bei 37°C mit 100 µl Primärantikörper-Lösung/Loch (0,2% BSA und 0,05% Tween 20 in PBS).
6. 5 x waschen mit 0,05% Tween 20 in PBS.
7. Inkubation für 30 min bei 37°C mit 100 µl Sekundärantikörper-Lösung/Loch (0,2% BSA und 0,05% Tween 20 in PBS, 1:5000 Jackson Anti-Ratte IgG/IgM Peroxidase gekoppelt für monoklonale AK und Anti-Kaninchen IgG Peroxidase gekoppelt für polyklonale AK).
8. 5 x waschen mit 0,05% Tween 20 in PBS.
9. Inkubation für 30 min bei RT mit 100 µl der OPD-Lösung zur chromogenen Reaktion.
10. 50 µl der Stopplösung/Loch (2,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).
11. Jede Platte wurde direkt im Anschluss mit dem Elisa-Photometer bei 492 nm und 620 nm vermessen. Die Messung der optischen Dichte (OD) bei 620 nm diente als Referenzwellenlänge. Endwert = OD bei 492 nm - OD bei 620 nm.

***OPD-Lösung***

- 40 mg o-Phenylenediammin dihydrochlorid in *Phosphat-Citrat Puffer*, pH-Wert 5,1
- 40 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

***Phosphat-Citrat Puffer:***

- 24.3 ml Zitronensäure (19.2 g/ 1000ml)
- 25.7 ml 0.2 M Phosphat (28.4 g Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>/1000 ml)

Jeder AK wurde mit dem SHG-Peptid in einer Verdünnungsserie von 12 Verdünnungen von 1:50 bis 1:102400 getestet. Um eine OD zwischen 1,6 und 2,0 für die Epitop-Charakterisierung der sieben Peptide erreichen zu können, wurden die Primärantikörper in verschiedenen Verdünnungen verwendet (1:300, 1:900 und 1:2700). Für die monoklonalen Antikörper wurden anschließend neue Verdünnungen angewendet, um die passende OD erreichen zu können (Tabelle 2.4).

<b>Name des AK</b>	<b>Verwendete Verdünnungen</b>
<b>PPc64K</b>	<b>1:2700</b>
<b>PPc73K</b>	<b>1:2700</b>
<b>PPc73K *</b>	<b>1:300</b>
<b>PPc74K</b>	<b>1:900</b>
<b>PPc76K</b>	<b>1:300</b>
<b>SHG-1E5</b>	<b>1:200</b>
<b>SHG-1E7</b>	<b>1:200</b>
<b>SHG-2B12</b>	<b>1:600</b>
<b>SHG-4A8</b>	<b>1:400</b>

**Tab. 2.4:** Endkonzentrationen der AK-Verdünnungen für eine OD zwischen 1.6 und 2.0.A. g: \* Dieser AK wurde mit Hilfe der Affinitätschromatographie gereinigt.

### ***Kontrollverfahren***

Um unspezifische Reaktionen zu identifizieren, wurden in Anlehnung an das ELISA-Protokoll Negativkontrollen durchgeführt, wobei als Kontrollarten entweder die Inkubation mit dem Peptid oder die Inkubation mit dem Primärantikörper ausgelassen wurde (mind. 10 Löcher/Kontrollart/Platte).

Zur Kontrolle der spezifischen Reaktion wurde jeweils ein vierfacher Parallelansatz pro Peptid mit demselben Primärantikörper inkubiert und ausgewertet. Von dem errechneten Mittelwert der optischen Dichte wurde der Mittelwert der jeweiligen Negativkontrolle subtrahiert. Diese Werte wurden mit Hilfe des EXCEL Programms graphisch dargestellt.



### 2.4.2 Homologiesuche

Mit der Methode der Epitop-Charakterisierung wurde für den jeweiligen AK eine spezifische Epitop-Region, ein 14-mer langes Peptid, aus dem 35-mer langen *SHG-Peptid* bestimmt. Diese Verkleinerung der Epitop-Region macht man sich in der Homologiesuche zunutze, denn durch eine verkürzte AS-Sequenz erhöht sich die Anzahl der möglichen Homologe. Wenn die Anzahl der Proteine mit homologen AS-Sequenz-Regionen niedrig ist, spricht das für eine sehr hohe Spezifität des AK gegenüber dem HCN4-Protein und erniedrigt die Anzahl der möglichen kreuzreagierenden Proteine.

Diese Software gleicht in zehn Protein-Datenbanken (Einschließlich Swissprot, TrEMBL, Ensembl und RefSeq) alle vertretenen Proteine mit der eingegebenen AS-Sequenz des zu untersuchenden Proteins ab. Anschließend erstellt das Programm eine Liste, beginnend mit denjenigen Proteinen, die die höchste AS-Sequenz Homologie zu der angegebenen AS-Sequenz aufweisen, zusammen [FASTA3-Programm Version 3.3t09 vom 18 Mai 2001 und 3.4t23 vom 18 März 2004 (Pearson & Lipman 1988): [www.expasy.org](http://www.expasy.org) Similarity searches, FASTA, European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute]. Auf Grund der höchsten Anzahl an Sequenz-Homologien wurde das FASTA3-Programm im Vergleich mit anderen Programmen verwendet ([www.expasy.org](http://www.expasy.org), BLAST, WU/BLAST; DeCypher, FDF und Scanps). Die Proteindatenbanken, die benutzt wurden, enthielten 921652 Proteinsequenzen (29.10.2002).

Folgende Parameter wurden in das FASTA3-Programm eingegeben:

**Database:** swiss-prot

**Gap penalties:** open: - 12, residue: -2

**Scores:** 100

**Align:** 100

**KTUP:** 2

**Histogramm:** No

**Matrix:** BLOSUM62

**Expectation upper:** 50

**Expectation lower:** default

**Sequence range:** Start-End

**Database range:** Start-End

**Molecule type:** Protein



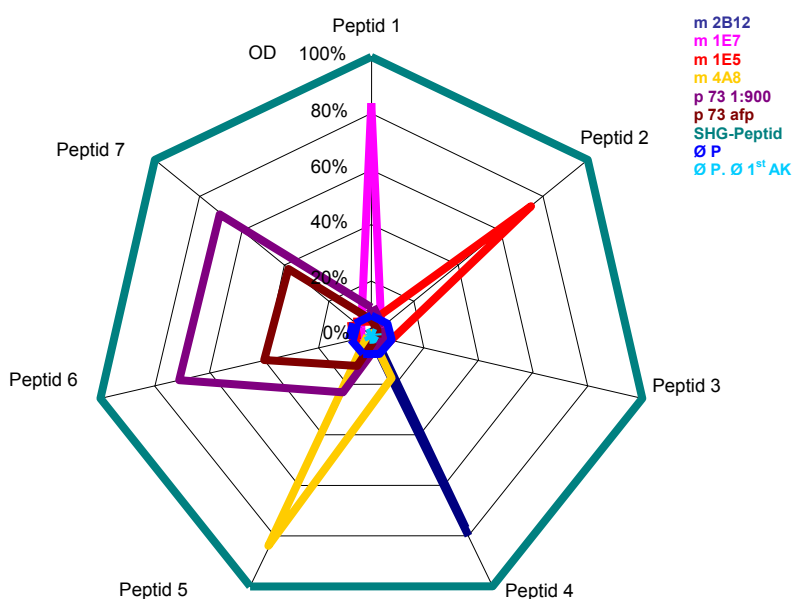
### 3.1 Antikörper-Charakterisierung

#### 3.1.1 Epitop-Charakterisierung

Zur Herstellung der acht HCN4-Antikörper diente das SHG-Peptid als Antigen. Aus diesem 35-mer langen Peptid wurden 7 Peptide synthetisiert, mit je einer Länge von 14 AS und einer Überlappung von 10 AS (siehe Kapitel 2.4.1). Durch diese Unterteilung des SHG-Peptides und der damit verbundenen AS-Sequenzverkleinerung konnte mit Hilfe des ELISA-Nachweisverfahrens die jeweilige spezifische Epitop-Region der monoklonalen Antikörper (SHG-1E5, SHG-1E7, SHG-2B12, SHG-4A8) und des polyklonalen PPc73K AK untersucht werden. Von den polyklonalen AK PPc64K, PPc73K, PPc74K und PPc76K erwies sich bei den IHC-Versuchen zur Antikörper-Charakterisierung der PPc73K AK als bester polyklonaler Antikörper (Ergebnisse sind nicht dargestellt), so dass nur dieser der Epitop Charakterisierung diente. Zusätzlich wurde dieser polyklonale AK weiter affinitätschromatographisch gereinigt.

Die Epitop-Charakterisierung ergab, dass der SHG-1E5 AK seine höchste Affinität gegenüber der Aminosäuresequenz LLLPPASSPPPPQV (Peptid Nr. 2) aufweist. Für den monoklonalen SHG-1E7 AK zeigte die AS-Sequenz des Peptides Nr. 1 seine höchste Affinität. Die AK SHG-2B12 und SHG-4A8 hatten ihre spezifischen Epitope an der AS-Sequenz des Peptides Nr. 4 bzw. Peptid Nr. 5. (Diag. 3.1). Im Falle des PPc73K AK bestand die höchste Affinität gegenüber Peptid Nr. 7 und 6 und einem Teilbereich des Peptides Nr. 5.

Das Kontrollverfahren durch Negativkontrollen zur Identifizierung von unspezifischen Reaktionen fiel negativ aus [Diagramm 3.1, kein Peptid ( $\emptyset$  P) - 10% OD; kein Peptid und kein Erstantikörper ( $\emptyset$  P,  $\emptyset$  1<sup>st</sup> AK) - 0% OD]. Als weitere Kontrolle wurde das ELISA-Nachweisverfahren mit dem ganzen SHG-Peptid durchgeführt (OD 100%).



**Diagramm 3.1:** Diagramm zur Darstellung der Epitop-Charakterisierung. m: monoklonal; p: polyklonal; 1:900: Polyklonaler Ak befand sich in einer Verdünnung von 1 zu 900; afp: affinitäts-purifiziert; SHG-Peptid: siehe 2.4.1;  $\emptyset$  P: ELISA-Verfahren wurde ohne das Peptid durchgeführt;  $\emptyset$  P,  $\emptyset$  1<sup>st</sup> AK: ELISA-Verfahren wurde ohne das Peptid durchgeführt und ohne den Primärantikörper; OD: optische Dichte.

### 3.1.2 Homologiesuche

Die Homologiesuche ergab für das 35-mer lange SHG-Peptid 100 Homologe. Hiervon wiesen nur vier Homologe einen E-Wert kleiner als 0,001 auf. Die restlichen Proteine hatten einen E-Wert größer als 2,8. Der E-Wert (Erwartungswert/ Expectation value) beschreibt die statistische Signifikanz für den gefundenen Treffer bei Datenbanksuchen. Je niedriger der jeweilige E-Wert ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich nicht um einen zufälligen Treffer handelt. Demnach deuten hohe Werte an, dass das *Alignment* wahrscheinlich nur ein Zufallstreffer ist und die beiden angepassten Sequenzen nichts miteinander zu tun haben. Man kann also davon ausgehen, dass die ersten vier Proteine der hundert gefundenen Homologen eine tatsächliche, biologische Verwandtschaft zu dem eingegebenen Peptid besitzen. Überprüft man die Herkunft dieser ersten vier Homologen, so findet man heraus, dass es sich dabei um die AS-Sequenzen der HCN-Kanalproteine von Maus, Ratte, Mensch und Kaninchen handelt. Von den hundert Homologen werden hier nur zehn ausschnittsweise aufgeführt (Ergebnisfenster 3.1 und 3.2).

Alignment	DB.ID	Source	Length	Identity%	Unmapped%	Overlap	E <sub>0</sub>
1 ✓	<a href="#">SW:HCN4_MOUSE</a>	Potassium/sodium hyperpolarizatio	1186	100.000	100.000	36	2.1e-12
2 ✓	<a href="#">SW:HCN4_RAT</a>	Potassium/sodium hyperpolarization-	1198	100.000	100.000	36	2.1e-12
3 ✓	<a href="#">SW:HCN4_HUMAN</a>	Potassium/sodium hyperpolarizatio	1203	100.000	100.000	36	2.1e-12
4 ✓	<a href="#">SW:HCN4_RABIT</a>	Potassium/sodium hyperpolarizatio	1175	79.487	86.111	39	3.6e-08
5 ✓	<a href="#">SW:ACSA2_ACEXY</a>	Cellulose synthase 2 [Includes:	1596	54.545	54.545	22	2.8
6 ✓	<a href="#">SW:WASL_MOUSE</a>	Neural Wiskott-Aldrich syndrome p	501	54.167	54.167	24	4.2
7 ✓	<a href="#">SW:WASL_RAT</a>	Neural Wiskott-Aldrich syndrome pro	501	54.167	54.167	24	4.2
8 ✓	<a href="#">SW:WASL_BOVIN</a>	Neural Wiskott-Aldrich syndrome p	505	54.167	54.167	24	4.2
9 ✓	<a href="#">SW:ASF1_HELAN</a>	Anther-specific protein SF18 prec	161	45.833	45.833	24	5.1
10 ✓	<a href="#">SW:LBD11_ARATH</a>	LOB domain protein 11.	229	57.895	57.895	19	5.4

**Ergebnisfenster 3.1:** Ergebnisse der Homologiesuche für die AS-Sequenz des SHG-Peptides.

Das zweite Ergebnisfenster soll die sehr hohe AS-Sequenzidentität der ersten vier Homologen zum SHG-Peptid verdeutlichen. Vor allem soll es aber zeigen, dass ab dem fünften Protein die Übereinstimmung nur noch gering war und weiter abnahm. Damit ist eine spezifische Bindung einer der verwendeten AK mit einem E-Wert von 2.8 oder größer sehr unwahrscheinlich, so dass Kreuzreaktionen nahezu ausgeschlossen werden können.

Query	1:36	SHGSILLPPASSPPPQVPORRGTPPLTPGRLTQDL
1 SW:HCN4_MOUSE	1:36 1003:1122	SHGSILLPPASSPPPQVPORRGTPPLTPGRLTQDL
2 SW:HCN4_RAT	1:36 1016:1135	SHGSILLPPASSPPPQVPORRGTPPLTPGRLTQDL
3 SW:HCN4_HUMAN	1:36 1018:1137	SHGSILLPPASSPPPQVPORRGTPPLTPGRLTQDL
4 SW:HCN4_RABIT	1:36 999:1118	SHGSILLPPASSPPPpaPQRRATPPLAPGRLSODL
5 SW:ACSA2_ACEXY	1:36 756:875	GATPVEPPPVNA PPPPSLPQPPGTLPTPPIAPASA
6 SW:WASL_MOUSE	1:36 260:379	GPPPPPPPHSSGPPPPPARGRGAPPPPPSRAPTAA
7 SW:WASL_RAT	1:36 260:379	GPPPPPPPHSSGPPPPPARGRGAPPPPPSRAPTAA
8 SW:WASL_BOVIN	1:36 263:382	GPPPPPPPHSSGPPPPPARGRGAPPPPPSRAPTAA
9 SW:ASF1_HELAN	1:36 37:156	FCYFDCDPQKNPGPPPGAPGTPGTPPAPPKGEGDA
10 SW:LBD11_ARATH	1:36 1:120	TTPVNSPSTSSPPPPSPQPPQPPVWLSPCAACK
consensus/100%		.....
consensus/90%		.....ss..ssP...s...ss.....
consensus/80%		.....Ps.s.PPPP.P...s.PP.s.....
consensus/70%		.....PPsssPPPP.sP...ssPP.sss...s.....

**Ergebnisfenster 3.2:** Zeigt die Übereinstimmung der AS-Sequenz der gefundenen Homologen.

Die Epitop-Charakterisierung hat für die Primärantikörper die jeweils spezifische Epitop-Region bestimmt. Diese Verkleinerung der AS-Sequenz machte man sich zusätzlich in der Homologiesuche zunutze, denn mit einer verkürzten AS-Sequenz erhöht sich theoretisch die Anzahl der möglichen Homologen. Würde auch hier die Anzahl der Proteine mit homologen AS-Sequenz-Regionen weiterhin niedrig bleiben, deutet dies auf eine sehr hohe Spezifität des AK gegenüber des HCN4-Proteins und erniedrigt die damit verbundene Anzahl der theoretisch-möglichen kreuzreagierenden Proteine. So wurden mit den im Kapitel 2.4.1 gezeigten Peptiden weitere Homologiesuchen durchgeführt. Exemplarisch werden im Anhang (siehe Kapitel 6.4) die Ergebnisse der Homologiesuche für das Peptid Nr. 2 gezeigt. Das Alignment für die 14-mer lange AS-Sequenz, der Epitop-Region des SHG-1E5 Antikörpers, ergab 16 Homologen. Die ersten vier Homologen sind dieselben wie diejenigen der Homologiesuche mit dem SHG-Peptid. Der kleinere E-Wert ist dadurch zu erklären, dass eine viel kürzere Sequenz verwendet wurde und somit die Wahrscheinlichkeit größer ist, dass nur die Sequenzen übereinstimmen, es sich aber um keine tatsächlichen Homologen handelt. Die Homologiesuche lieferte für die anderen sechs Peptide sehr ähnliche Ergebnisse (Daten sind nicht dargestellt).

### **3.1.3 Vergleich der immunhistochemischen Darstellung**

Die Epitop-Charakterisierung zeigte, dass sowohl die monoklonalen als auch die polyklonalen AK spezifisch an den verschiedenen Epitopen des SHG-Peptides binden. Zusätzlich zeigte die Homologiesuche, dass diese AK spezifisch für HCN4 sind. So stellte sich anschließend die Frage, ob die verschiedenen Primärantikörper unterschiedliche immunhistochemische Ergebnisse erbringen würden. IHC-Versuche wurden anhand des im Kapitel 2.3.1 aufgeführten Protokolls mit den monoklonalen (SHG-1E5, SHG-1E7, SHG-2B12, SHG-4A8) und den polyklonalen (PPc64K, PPc73K, PPc74K, PPc76K) Primärantikörpern durchgeführt. Während der experimentellen Erprobung der von Prof. Dr. Kaupp und Frau Dr. Kremmer gemeinsam hergestellten AK erschien von der Firma Alomone ein käuflicher AK gegen HCN4 (APC-052). Um weitere Vergleichsmöglichkeiten zu erhalten, wurde der polyklonale APC-052 AK in die Antikörper-Charakterisierung aufgenommen.

Exemplarisch werden anhand des Ncl. oculomotorius (III) die immunhistologischen Ergebnisse des monoklonalen AK SHG-1E5, des polyklonalen AK PPc73K und APC-052 gezeigt. Wie in den Abbildungen 3.1 A (SHG-1E5), B (PPc73K) und C (APC-052) zu sehen ist, zeigten alle drei AK positive immunhistochemische Reaktionen (IR). Mit diesen AK wurden HCN4-positive Motoneuronen, mit ähnlicher Form und Größe, gefärbt (siehe Insets A-C). Der SHG-1E5 AK zeigte dabei die stärkste und der PPc73K AK die schwächste Immunreaktion. Erkenntnisse aus allen Versuchsreihen, die hier nicht dargestellt werden, führten zu der Entscheidung, die Lokalisation des HCN4-Kanals im Rattengehirn mit Hilfe des SHG-1E5 AK durchzuführen.

Im manchen Bereichen war der Hintergrund erhöht, es kam zu Kreuzreaktionen mit Gefäßen. Die Benutzung von in der Ratte hergestelltem Primärantikörper und Sekundärantikörper gegen Ratten IgG, erforderte die zusätzliche Überprüfung der Spezifität des SHG-1E5 AK anhand von IHC-Versuchen an verschiedenen Nagetieren (Maus, Hamster und Meerschweinchen). Des Weiteren wurden die IHC-Versuche an den oben genannten Nagetierarten auch mit dem Antikörper APC-052 durchgeführt. Bei vergleichbaren Ergebnissen sollte dies die Spezifität des SHG-1E5 AK weiter validieren. Exemplarisch werden vier Regionen gezeigt: Ncl. reticularis thalami (Abb. 3.1 D-G), das Corpus geniculatum laterale (H-K), die Ncll. lemnisci lateralis (L-P) und der Oliva superior Komplex (Q-S). In den Bereichen, wo der SHG-1E5 AK in der Ratte eine positive Immunreaktion zeigte, fand man auch in den anderen Nagetieren und auch mit dem AK APC-052 zum größten Teil ähnliche Ergebnisse. Der Hintergrund war in den verschiedenen Nagetieren unterschiedlich stark ausgeprägt. So war dieser in der Maus am stärksten und in Hamster und Meerschweinchen am schwächsten. Zusätzlich war zu beobachten, dass mit dem AK APC-052 im Meerschweinchen die immunpositiven (IP) Dendriten über eine deutlich längere Ausdehnung als mit dem AK SHG-1E5 verfolgt werden konnten (Inset S). In manchen Bereichen wurde sogar ein weit verzweigtes IP-Dendritengeflecht über einer Länge von 100-200 µm gefunden (Daten sind nicht dargestellt). Es wurden zudem keine Unterschiede gefunden in den Bereichen, die für den SHG-1E5 AK in der Ratte immunnegativ waren (Daten sind nicht dargestellt).

**Abb. 3. 1:** A-S : Photomikroskopische Aufnahmen aus Frontalhirnschnitten.

**A-C:** Ncl. Oculomotorius, Versuchstier: Ratte (Ra). AK: A→SHG-1E5; B→PPc73K; C→APC-052.

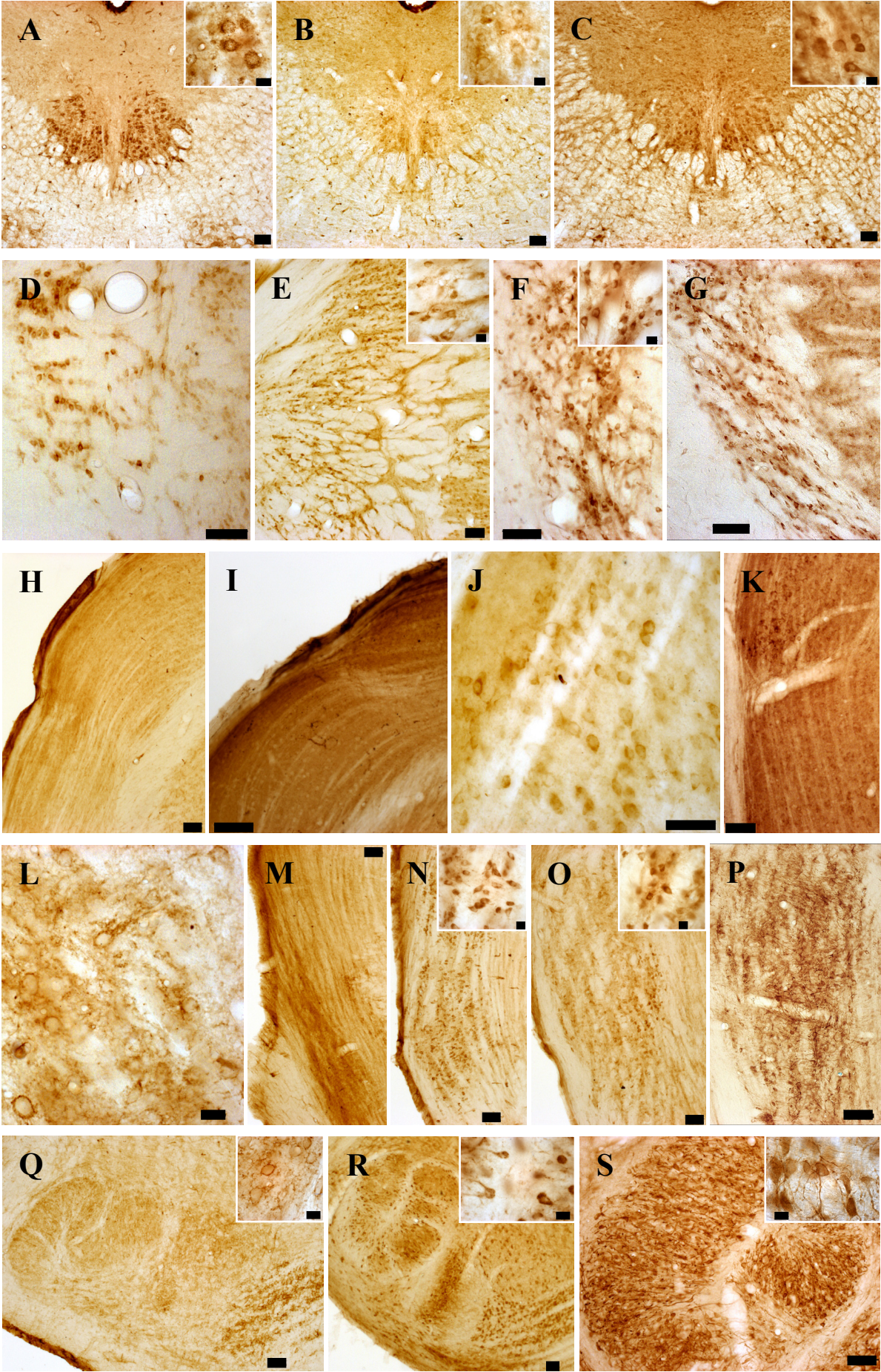
**D-G:** Ncl. reticularis thalami. AK: D, E→SHG-1E5; F, G→ APC-052, Versuchstier: D→Ra; E, F→Meerschweinchen (Mee); G→Hamster (Ha).

**H-K:** Corpus geniculatum laterale, AK: SHG-1E5. Versuchstier: H→Ra; I→Maus (Ma); J→Ha, K→Mee.

**L-P:** Ncll. lemnisci laterales. AK: L-O→SHG-1E5; P→APC-052. Versuchstier: L→Ra; M→Ma; N→Ha; O, P→Mee.

**Q-S:** Oliva superior Komplex. AK: Q, R→SHG-1E5; S→APC-052. Versuchstier: Q→Ra; R, S, P→Mee.

Balken entspricht in den Abb. A-I, K, M-S: 100 µm; in J: 50 µm; in L: 25 µm und in allen Inset's 20 µm

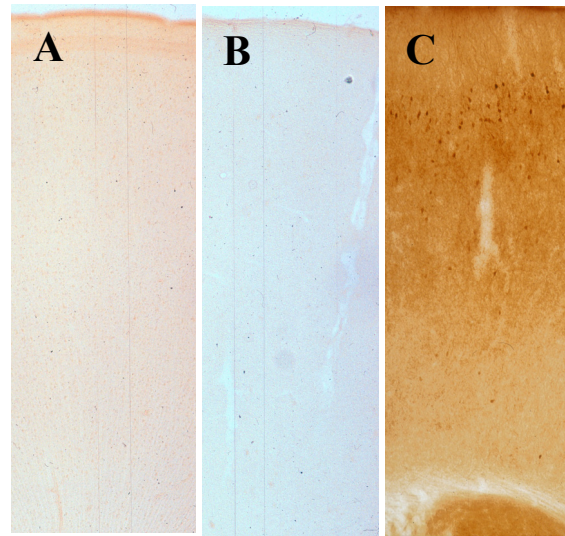


### 3.1.4 Negativkontrollen und Absorptionskontrollen

Zur Qualitätssicherung des immunhistochemischen Protokolls wurden Negativkontrollen und Absorptionskontrollen durchgeführt. Damit wurde zusätzlich die Spezifität des Primärantikörpers belegt.

Für die Negativkontrollen wurde das IHC-Protokoll unter Auslassung der Inkubation mit dem Primärantikörper angewendet. Die Präparate zeigten keine positive immunhistochemische Reaktion (Abbildung 3.2 A).

Durch die Bildung der SHG-Peptid-Primärantikörper-Komplexe zeigten die Absorptionskontrollen im weiteren IHC-Versuch keine positive IHC-Reaktion (Abbildung 3.2 B).



**Abb. 3.2 A-C:** Photomikroskopische Aufnahme des Cortex einer Ratte im Frontalschnitt. **A:** Negativkontrolle, **B:** Absorptionskontrolle, **C:** Immunpositiver Cortex unter Anwendung des regelrechten IHC-Protokolls.

## 3.2 Verteilungscharakteristik des HCN4-Kanalproteins im Rattengehirn

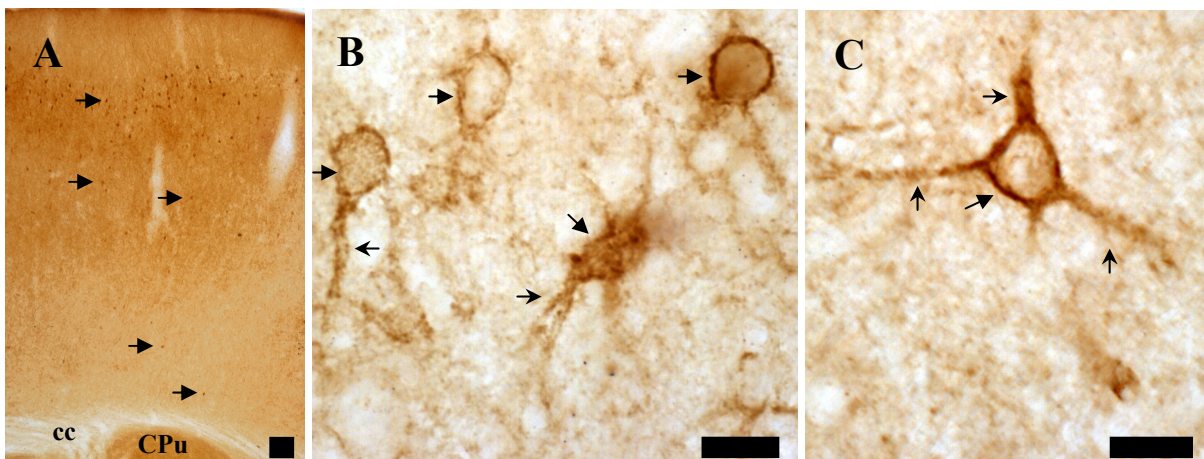
Im folgenden Kapitel wird die spezifische Verteilungscharakteristik des HCN4-Kanals auf der zellulären Ebene exemplarisch anhand von detaillierten Darstellungen und lichtmikroskopischen Aufnahmen einiger Gehirnregionen beschrieben. Die immunhistochemischen Versuche wurden mittels des im Kapitel 2.3.1 gezeigten Protokolls durchgeführt. Der in Zusammenarbeit von Prof. Dr. Kaupp (Institut für Biologische Informationsverarbeitung, Forschungszentrum Jülich GmbH) und Frau Dr. Kremmer (Institut für Molekulare Immunologie, München) hergestellte monoklonale SHG-1E5 AK diente als Primärantikörper. Die digitalen Fotografien wurden mit dem Axioplan 2 Mikroskop der Fa. Zeiss und einer Cool Snap Kamera der Fa. Roper Scientific (Ottobrun) erzielt. Hinsichtlich des Zuschneidens, der Optimierung der Helligkeit und des Kontrastes wurden die Aufnahmen mit dem Adobe PhotoShop 7.0 weiter bearbeitet. Im Kapitel 3.3 folgt anschließend eine tabellarische Zusammenfassung über die Intensität der IR des HCN4-Kanalproteins in den Regionen des Rattengehirns. Die Intensität der Immunreaktion für HCN4 wurde mit „stark intensiv“ (4), „intensiv“ (3), „moderat“ (2), „schwach“ (1) und „keine Immunreaktion“ (0) ausgewertet. Die verwendeten Abkürzungen für die Gehirnregionen entsprechen größtenteils denjenigen Abkürzungen aus dem Atlas "The rat brain in stereotaxic coordinates" (Paxinos & Watson 1998).



### 3.2.1 Isocortex

Die Oberfläche des Telencephalons wird von einer grauen, nervenzellreichen Rinde bedeckt, dem Cortex cerebialis. Im Isocortex werden auf Grund der Art ihrer Nervenzellen und ihrer Anordnung sechs Schichten (Laminae) unterschieden. - Lamina molecularis (Lamina 1; nervenzellarm, aber faserreich), - Lamina granularis externa (Lamina 2; nervenzellreich, Körnerzellen), - Lamina pyramidalis externa (Lamina 3; kleinere und mittlere Pyramidenzellen), - Lamina granularis interna (Lamina 4, sehr nervenzellreich), - Lamina pyramidalis interna (Lamina 5; große Pyramidenzellen), - Lamina multiformis (Lamina 6, vielgestaltige Nervenzellen).

Im Vergleich zu seinem Zellreichtum wurden im Isocortex nur wenige HCN4 IP-Neuronen gefunden, wobei diese in den Laminae 1-6 ein unterschiedliches Expressionsmuster zeigten (Abbildung 3.3 A). Die äußere Körnerschicht und die äußere Pyramidenzellschicht (Lamina 2 und 3) waren, bezogen auf die Schichten des Isocortex, am stärksten ausgeprägt. Deutlich weniger wie die innere Körnerschicht und die polymorphe Zellschicht (Lamina 4 und 6) IP-Neuronen auf. Die Expressionsstärke der inneren Pyramidenzellschicht (Lamina 5) lag dazwischen. Die immunpositiven Neuronen hatten ein rundes bis ovales Soma. Dabei wurden die Plasmamembranen stark und das Cytoplasma nur schwach bis gar nicht angefärbt. Die IP-Neuronen hatten einen Durchmesser von ca. 15  $\mu\text{m}$ . Bei den Pyramidenzellen, sowohl der äußeren als auch inneren Schicht, konnte der proximale Anteil der Primärdendriten über einer Länge bis zu 25  $\mu\text{m}$  beobachtet werden (Abbildung 3.3 B und C).

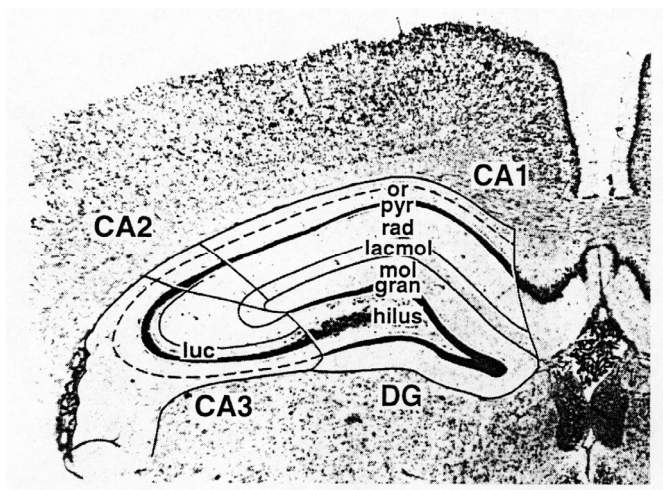


**Abb. 3.3:** A, B und C: Photomikroskopische Aufnahmen aus Frontalhirnschnitten. Versuchstier: Ratte; Verwendeter AK: SHG-1E5. **A:** Isocortex. **B:** Ausschnittsvergrößerung aus der Lamina pyramidalis externa. **C:** Ausschnittsvergrößerung mit einem IP-Neuron aus der Lamina pyramidalis interna. cc: Corpus callosum, CPu: Ncl. Caudatus - Putamen.  $\rightarrow$ : HCN4 IP-Neuronen,  $\rightarrow$ : IP-Dendriten. Balken entspricht in der Abb. 3.3 A: 100  $\mu\text{m}$ , B und C: 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.2 Hippocampus

Dorsal vom Corpus callosum und nach ventral vom Corpus amygdaloideum wird der Hippocampus retrocommisuralis begrenzt. Dieser wird in Subiculum, Cornu ammonis (CA) und Fascia/Gyrus dentatus (DG) unterteilt. Aufgrund unterschiedlicher Zellgrößen, Farbintensitäten und Packungsdichten der Nervenzellen werden cytoarchitektonisch verschiedene Sektoren (CA1, CA2 und CA3) innerhalb des CA unterschieden.

Sowohl im CA als auch im DG des Hippocampus retrocommisuralis wurden auf HCN4 positive IR gefunden. Die stärkste Intensität der IHC-Reaktion für HCN4-Kanalproteine innerhalb des Hippocampus (Hc) war im Stratum pyramidale des CA und im Stratum granulosum des DG zu sehen (Abbildung 3.4 A). Bei stärkerer Vergrößerung des Stratum pyramidale wurden IP-Pyramidenzellen in allen drei Sektoren des CA sichtbar (Abbildung 3.4 C für CA1 und 3.4 B für CA3). Mit Ausnahme des Zellkerns färbten sich das Cytoplasma, die Plasmamembran und die Dendriten gleichmäßig positiv. Die Pyramidenzellen hatten in CA1 einen Durchmesser von 12  $\mu\text{m}$  und in CA3 einen Durchmesser von 15  $\mu\text{m}$ . Pyramidenzellen besitzen apikale (reichen in das Stratum moleculare hinein, ca. 300-450  $\mu\text{m}$  lang) und basale Dendriten (verbleiben im Stratum pyramidale, wo sie einen dichten Plexus bilden). HCN4-IR war an den apikalen Dendriten bis in einer Länge von 160  $\mu\text{m}$  (Abbildung 3.4 B mit schwarzen, spitzen Pfeilen markiert) und an den basalen Dendriten bis in einer Länge von 40  $\mu\text{m}$  (mit weißen, spitzen Pfeilen markiert) zu beobachten. Zusätzlich fand man IP-Körnerzellen im Stratum granulosum des DG. Deutlich weniger wurden HCN4 IP-Neuronen im Stratum plexiforme und gelegentlich IP-Neuronen im Stratum oriens und Stratum radiatum beobachtet. Links unten ist in der Abbildung 3.4 A zusätzlich die positive Immunreaktion des Ncl. habenulae medialis zu sehen.



**Skizze 3.1:** Schematische Darstellung des Hc. Skizze wurde aus Paxinos 1995 übernommen.

**Abb. 3.4:** Photomikroskopische Aufnahmen aus Frontalhirsnschnitten. Versuchstier: Ratte; Verwendeter AK: SHG-1E5. **A:** Übersichtsaufnahme des Hc. **B:** Ausschnittsvergrößerung des Stratum (Str.) pyramidale des CA3. **C:** Ausschnittsvergrößerung des Str. pyramidale des CA1. **D:** Aufnahme des Ncl. reticularis thalami. Cx: Cortex, cc: Corpus callosum, Or: Str. oriens, Py: Str. pyramidale, Rad: Str. radiatum, LMol: Str. lacunosum moleculare, PoDG: Str. plexiforme des Gyrus dentatus, GrDG: Str. granulosum des Gyrus dentatus, DG: Gyrus dentatus, IBI: Innere Oberfläche des DG, OBI: Äußere Oberfläche des DG, MHb: Ncl. habenulae medialis, LP: Ncl. parabrachialis

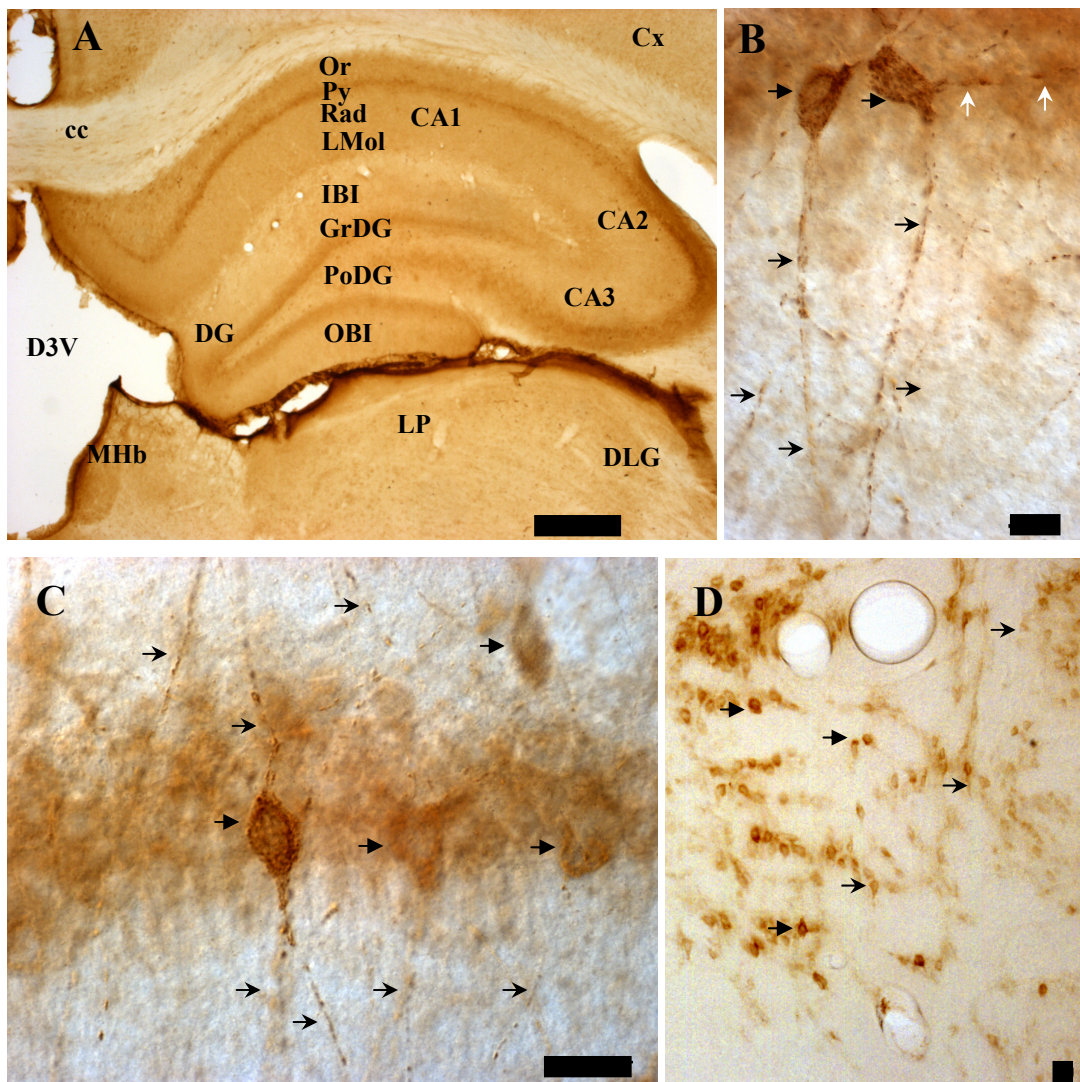
lateralis, DLG: Ncl. geniculatum laterale dorsale, D3V: Dorsaler Anteil des 3ten Ventrikel.  $\blacktriangleright$ : HCN4 IP-Neuronen,  $\blacktriangleright$ : IP-Dendriten. Balken entspricht in der Abb. 3.4 A: 500  $\mu\text{m}$ , B und C: 20  $\mu\text{m}$ , und D: 25  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.3 Thalamus

#### *Ncl. reticularis*

Der Ncl. reticularis thalami (Rt) ist in die „Gitterschicht“ des Thalamus zwischen Lamina medullaris externa und Capsula interna eingebettet und erstreckt sich über die gesamte rostrokaudale Ausdehnung des Thalamus.

Der Rt zeigte eine deutliche IR auf den HCN4-Antikörper. Kleine Neuronen (Durchmesser ca. 10 bis 15  $\mu\text{m}$ ) mit spindelförmigen Perikaryen waren zu finden. Bei diesen IP-Neuronen reagierte die Plasmamembran mit dem Cytoplasma positiv, unter Aussparung des Nucleus. Gelegentlich konnte der proximale Anteil der Primärdendriten in einer Länge von ca. 15  $\mu\text{m}$  verfolgt werden. Die Verteilung von IP-Neuronen folgte einem laminaren Muster, begrenzt von der weißen Substanz, welche keine IP-Zellen enthielt.



### **3.2.4 Metathalamus**

#### ***Corpus geniculatum laterale***

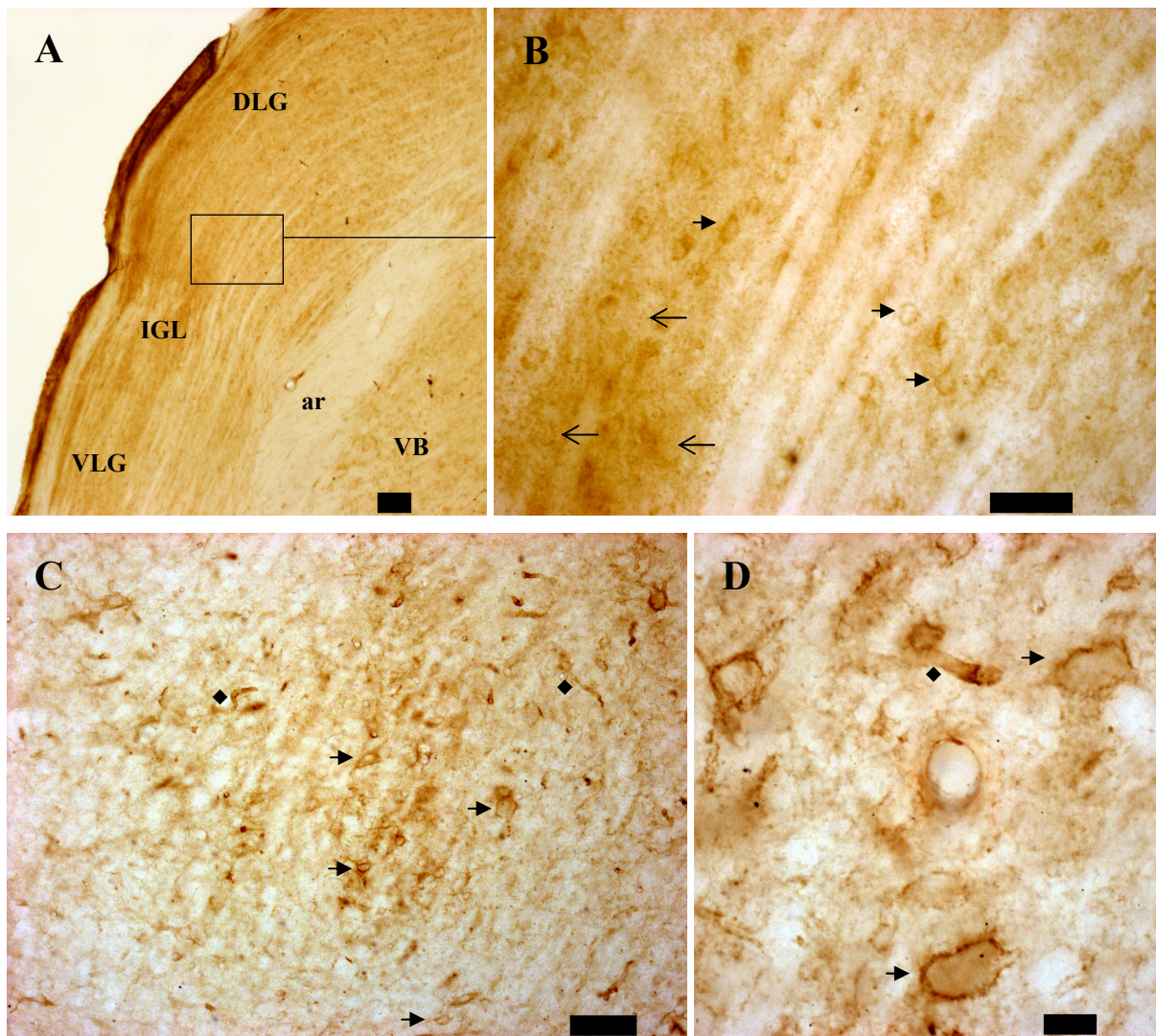
Das Corpus geniculatum laterale (CGL) befindet sich im dorsolateralen Bereich des posterioren Thalamus.

Der HCN4-AK zeigte in allen Unterbereichen des Corpus geniculatum laterale eine moderate bis intensive IR. Diese Immunreaktion war im Ncl. geniculatum laterale dorsale (DLG) etwas stärker als im Ncl. geniculatum laterale ventrale (VLG) und im Intergeniculatum-Flügel (IGL). Das Verteilungsmuster des HCN4-Kanalproteins war hingegen in allen drei Unterbereichen des CGL gleichmäßig (Abbildung 3.5 A). Die Verteilung von immunpositiven Neuronen folgte einem laminären Muster, begrenzt von der weißen Substanz, welche keine IP-Zellen enthielt. Mit dem SHG-1E5 AK wurden Neuronen mit runden bis ovalen Perikaryon und einem Durchmesser von 15 - 20 µm gefärbt (Exemplarisch sind einige Perikarya in der Ausschnittsvergrößerung mit dicken Pfeilen in der Abbildung 3.5 B markiert). Primärdendriten und das Cytoplasma der IP-Neuronen ließen sich nicht darstellen, hingegen reagierte das Neuropil positiv auf den HCN4-AK (Ausschnittsvergrößerung mit dünnem Pfeil in der Abbildung 3.5 B markiert).

#### ***Corpus geniculatum mediale***

Das Corpus geniculatum mediale (CGM) befindet sich im anterioren, lateralen Bereich des Mittelhirnes. Dieser Kern wird in drei Unterbereiche differenziert: Nucleus ventralis (MGV), Ncl. dorsalis (MGD) und Ncl. medialis (MGM). Der MGV wird noch weiter in eine lateralen (LV) und einem ovoide Nucleus (OV) unterteilt.

Im CGM ließ sich nur eine geringe Anzahl von IP-Neuronen finden. Gegenüber den IP-Neuronen des CGL, waren die HCN4 positiven multipolaren Neuronen des CGM mit einem Durchmesser von ca. 25 bis 30 µm größer. Die Plasmamembran der Neuronen reagierte positiv, wobei diese im Vergleich zum CGL stärker angefärbt wurde. In der Ausschnittsvergrößerung (Abbildung 3.5 D) ist zu sehen, dass die IR der Plasmamembran ungleichmäßig verteilt war. Der unspezifische Background und die Anfärbung von kleinen Gefäßen sind dadurch zu erklären, dass wir einen in Ratte hergestellten monoklonalen Primärantikörper benutzten. So kam es durch den gegen Ratten IgG gerichteten Sekundärantikörper zu unspezifischen Kreuzreaktionen des Zweitantikörpers mit dem verwendeten Tiergewebe.



**Abb. 3.5:** Photomikroskopische Aufnahmen aus Rattenhirnfrontalschnitten. Immunhistochemische Reaktion durch den SHG-1E5 AK. **A:** Übersichtsaufnahme des CGL. **B:** Ausschnittsvergrößerung aus dem DLG. **C:** Übersichtsaufnahme des CGM. **D:** Ausschnittsvergrößerung des CGM aus demselben Frontalschnitt, Aufnahme nur in einer anderen Ebene aufgenommen. DLG: Ncl. geniculatum laterale dorsale, VLG: Ncl. geniculatum laterale ventrale, IGL: Intergeniculatum Flügel, ar: Radiatio acustica, VB: Ncl. ventrobasalis thalami. ►: HCN4 IP-Neuronen, ➤: Neuropil, ◆: Gefäße. Balken entspricht in der Abb. 3.5 A, C: 100  $\mu$ m, B: 50  $\mu$ m und D: 20  $\mu$ m.

### **3.2.5 Hypothalamus**

#### ***Ncl. praeopticus medialis***

Der Ncl. praeopticus medialis (MPO) gehört zu den Kerngebieten der medialen Zone des Hypothalamus. Er verläuft parallel zur Wand des dritten Ventrikels (3V) und wird in folgende drei Unterbereiche unterteilt: einem lateralen Teil (MPOL) mit spärlich verteilten Zellen, einem medialen Teil mit dichten Zellpopulationen (MPOM) und einem zentralen Unterbereich, kompakt mit sehr dicht aneinander liegenden Zellen (MPOC), welcher im MPOM eingebettet ist.

Im Ncl. praeopticus medialis befanden sich IP-Neuronen (Durchmesser ca. 15  $\mu\text{m}$ ), die eine deutliche IR mit dem monoklonalen SHG-1E5 Antikörper zeigten. HCN4-positive punktförmige Verdichtungen füllten das Perikaryon mit Ausnahme des Nucleus auf. Nur gelegentlich wurden immunpositive primäre Dendriten in einer Länge von ca. 20  $\mu\text{m}$  beobachtet. Bei höherer Vergrößerung wurde sichtbar, dass diese punktförmigen Verdichtungen vor allem in der Plasmamembran und nur wenige im Cytoplasma zu finden waren. Die lockere, spärliche Verteilung der Neuronen in der Abbildung 3.6 A deutet auf den lateralen Unterbereich (MPOL) des Ncl. praeopticus medialis.

#### ***Ncl. supraopticus***

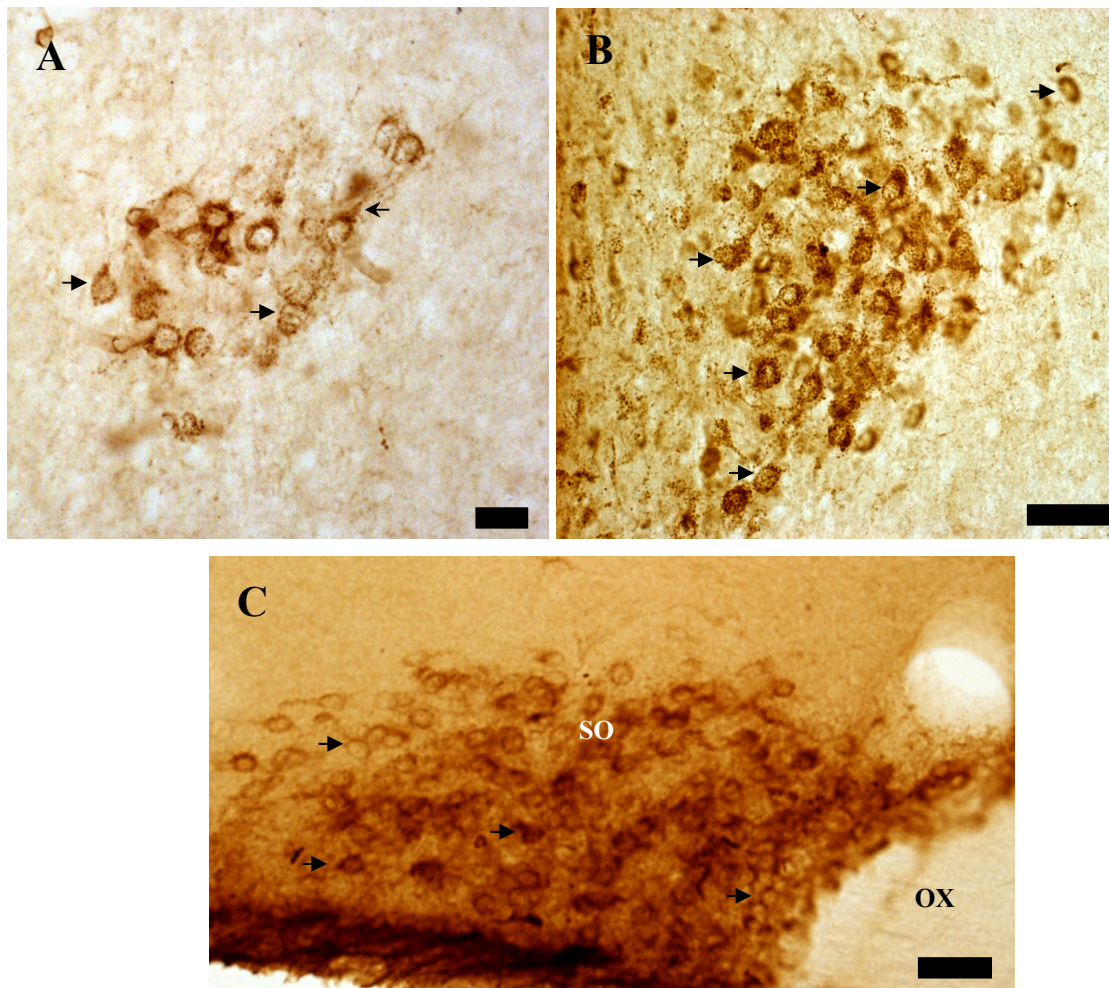
Der Ncl. supraopticus gehört zu den Kerngebieten des Hypothalamus und befindet sich dort im ventralen, anterioren Bereich, anliegend an das Chiasma opticum und dem Tractus opticus. Der Tractus opticus trennt einen kleineren Bereich, den retrochiasmatischen Teil (SOR), vom Hauptpol (SO).

Die Mehrheit der Neuronen des Ncl. supraopticus zeigte eine stark intensiv positive Reaktion auf den HCN4-AK (Abbildung 3.6 C). Hierbei handelte es sich höchstwahrscheinlich um magnocelluläre, neurosekretorische Zellen, welche immunpositiv reagierten. Diese Neuronen hatten ein rundes bis ovales Soma mit einem Durchmesser von ca. 10 bis 15  $\mu\text{m}$ . Der proximale Anteil der primären Dendriten ließ sich nicht immunpositiv darstellen.

***Ncl. paraventricularis***

Der Ncl. paraventricularis liegt beidseitig parallel der Ventrikelwand des dritten Ventrikels an und gehört zu den hypothalamischen Kerngebieten.

Im Ncl. paraventricularis zeigte sich ebenfalls eine starke IR der Perikarya. Das Perikaryon wurde, mit Ausnahme des Nucleus, mit HCN4-positiven punktförmigen Verdichtungen ausgefüllt. Ähnlich wie in den IP-Neuronen des MPO wies die Plasmamembran deutlich mehr punktförmige Verdichtungen auf als das Cytoplasma. Die multipolaren Neuronen hatten ein Soma mit einem Durchmesser von ca. 15  $\mu\text{m}$ . Zusätzlich zur IP-Zellmembran ließen sich gelegentlich primäre Dendriten in einer Länge von 20  $\mu\text{m}$  verfolgen. Bei dem unten in der Abbildung 3.6 B gezeigten Ausschnitt handelte es sich um Neuronen des anterioren parvocellulären Bereiches.



**Abb. 3.6:** Photomikroskopische Aufnahmen aus Frontalhirnschnitten. Versuchstier: Ratte; Verwendeter AK: SHG-1E5. **A:** Lateraler Anteil des Ncl. praeopticus medialis, MPOL. **B:** Ncl. paraventricularis, anteriorer parvocellulärer Bereich (PaAP) **C:** Übersichtsaufnahme des Ncl. supraopticus (SO). OX: Chiasma opticum.  $\blacktriangleright$ : HCN4 IP-Neuronen,  $\blacktriangleright$ : Proximaler Anteil von Primärdendriten. Balken entspricht in der Abb. 3.6 A: 25  $\mu\text{m}$ , B und C: 50  $\mu\text{m}$ .

### **3.2.6 Tegmentum mesencephali**

#### ***Ncl. ruber***

Der Ncl. ruber hat seinen Namen auf Grund der rötlichen Färbung (hoher Gehalt der Perikarya an kolloidalem Eisen) und seiner großen rundlichen dichten Struktur im frischen humanen Hirngewebe. Er befindet sich bilateral inmitten des Tegmentums des Mittelhirns und wird in einen Pars parvocellularis und einen Pars magnocellularis unterteilt. Im Gegensatz zum Ncl. ruber des Menschen ist bei den meisten anderen Säugetieren der Pars parvocellularis eher unterentwickelt.

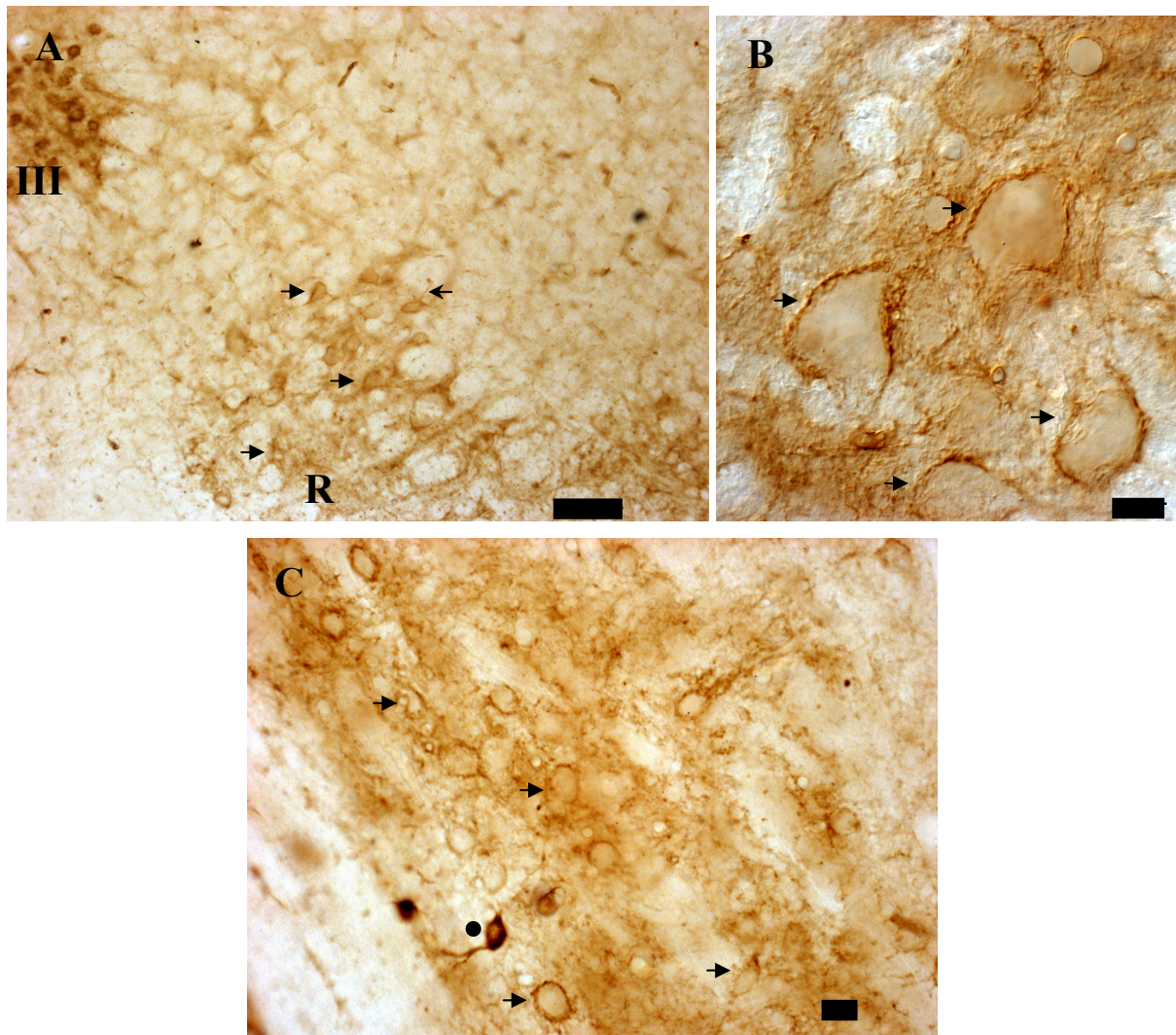
Die IHC-Darstellung des HCN4-Proteins zeigte im Ncl. ruber eine positive Reaktion. Die IP-Neuronen des Ncl. ruber hatten ein multipolares, spindelförmiges Soma mit einer Größe von ca. 40 µm. Wie in der Ausschnittsvergrößerung unten zu sehen (Abbildung 3.7 B) wiesen die IP-Neuronen eine intensive Immunreaktivität der Zellmembran mit einer ungleichmäßigen Verteilung der IR innerhalb der Plasmamembran auf. Das Cytoplasma reagierte nur schwach immunhistochemisch. Gelegentlich ließen sich proximale Anteile von den Dendriten mit ähnlichen Muster darstellen (Abbildung 3.7 A).

#### ***Ncl. lemnisci lateralis***

Die Ncl. lemnisci lateralis (LL) sind paarig angelegte Kerne, welche sich im anterioren Bereich des Pons befinden, ventral des Colliculus inferior. Sie werden in einem ventralen (VLL), einen intermediären (ILL) und einen dorsalen (DLL) Unterbereich unterteilt.

Die LL zeigten eine deutliche IR auf den HCN4-Antikörper. Größtenteils handelte es sich um mittelgroße Neuronen (Durchmesser ca. 20 µm) mit einem runden bis ovalen Perikaryon. Bei diesen immunpositiven Neuronen reagierte nur die Oberfläche der Plasmamembran positiv, unter Aussparung des Cytoplasma und des Nucleus. Die Verteilung von IP-Neuronen folgte einem laminären Muster, begrenzt von der weißen Substanz, welche keine immunpositiven Zellen enthielt. Neben diesen Neuronen wurden sehr wenige HCN4-positive bipolare Neuronen gefunden. Bei diesen bipolaren Neuronen (Durchmesser ca. 10 bis 15 µm) zeigte das Cytoplasma, mit Ausnahme des Zellkerns, eine ausgeprägtere Immunreaktion (siehe ● in der Abbildung 3.7 C). Primäre Dendriten mit Verzweigungen konnten über einer Länge von 30 µm verfolgt werden. Zusätzlich ist eine positive Reaktion des Neuropils im LL zu finden.





**Abb. 3.7:** Photomikroskopische Aufnahmen aus Frontalhirnschnitten. Versuchstier: Ratte; Verwendeter AK: SHG-1E5. **A:** Übersichtsaufnahme des Ncl. ruber (R). **B:** Ausschnittsvergrößerung vom Ncl. ruber aus demselben Frontalschnitt, Aufnahme nur in einer anderen Ebene aufgenommen. **C:** Ventraler Bereich der Ncll. lemnisci lateralis (VLL). III: Ncl. oculomotorius. ➔ HCN4 IP-Neuronen, ➔ Proximaler Anteil von Dendriten, ●: Positive bipolare Neuronen. Balken entspricht in der Abb. 3.7 A: 100  $\mu$ m, B: 20  $\mu$ m und C: 50  $\mu$ m.

### **3.2.7 Tectum mesencephali**

#### ***Colliculus superior (craniales)***

Der Colliculus superior ist im Mittelhirndach (Tectum mesencephali) zu finden. Der Kern weist eine horizontale Schichtengliederung aus abwechselnd grauer und weißer Substanz auf. Von ventral nach kaudal ergeben sich die folgenden Schichten: - Stratum zonale (ZO), - Stratum griseum superficiale (SuG), - Stratum opticum (Op), - Stratum griseum medium (intermedium, InG), - Stratum medullare medium (album intermedium, InWh), - Stratum griseum profundum (DpG), - Stratum medullare (album) profundum (DpWh).

Mit Hilfe der Immunhistochemie, unter Verwendung des SHG-1E5 AK, ließ sich eine geringe Anzahl von immunpositiven HCN4 Neuronen im Stratum griseum profundum darstellen (Abbildung 3.8 A). In allen anderen Schichten des Colliculus superior waren für HCN4 keine positiven Neuronen zu finden. Das Perikaryon dieser positiven Neuronen hatte eine runde bis leicht ovoide Form mit einer durchschnittliche Größe von ca. 15 bis 20 µm. Hierbei handelte es sich um multipolare Neuronen.

#### ***Colliculus inferior***

Der Colliculus inferior befindet sich im dorsalen Anteil des Mittelhirnes. Dieser Kern wird in drei Bereiche unterteilt: einen zentralen (CIC), einen äußeren, corticalen (ECIC) und einen dorsal, corticalen (DCIC) Bereich.

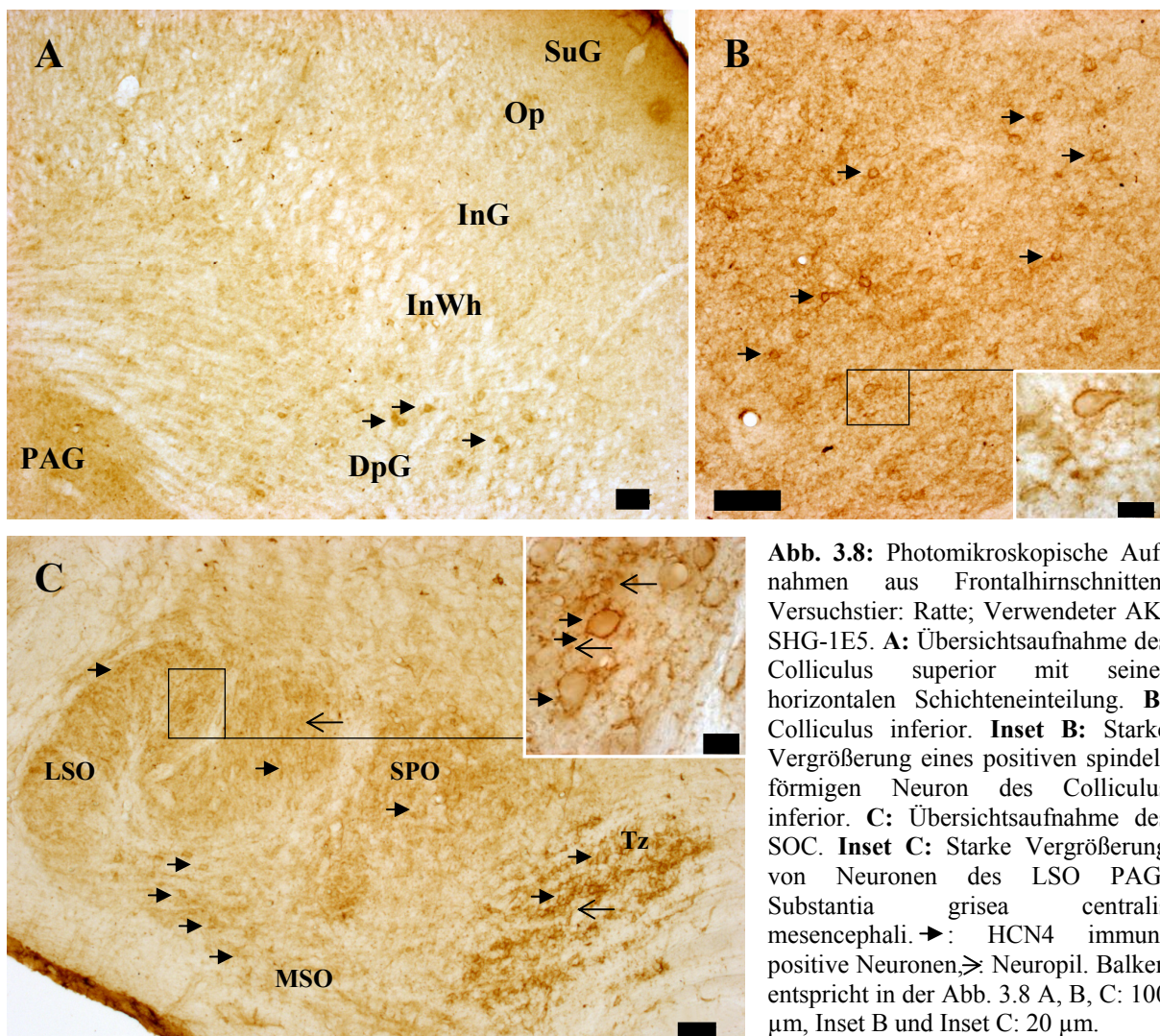
Betrachtet man die Verteilung der HCN4-positiven Neuronen im Colliculus inferior, so fiel keine spezifische Verteilungscharakteristik auf. Im Gegensatz zum Colliculus superior waren die positiven Neuronen im ganzen Colliculus inferior gleichmäßig verteilt. Allein durch ein IHC-Verfahren ließ sich weder für CIC noch für DCIC oder ECIC eine Schichtung darstellen. Somit ließ sich eine auf den HCN4-Kanal verbundene tonotopische Organisation nicht feststellen. Hierfür sind noch weitere Untersuchungen erforderlich. HCN4-positive Neuronen haben ein spindelförmiges Perikaryon mit einem Durchmesser von ca. 15-20 µm (Inset Abbildung 3.8 B). Bei höherer Vergrößerung war zu beobachten, dass die der Plasmamembran zugehörige IR eine ungleichmäßige Verteilung besaß.

### 3.2.8 Andere Hirnstammregionen

#### *Oliva superior et Ncl. corporis trapezoidei*

Der Oliva superior Komplex (SOC) besteht aus einer Gruppe von Kernen, welche sich in der ventralen Region der caudalen Pons befinden. Hierzu gehören Oliva superior medialis (MSO), Ncl. paraolivarius superior (SPO), Oliva superior lateralis (LSO), Ncl. corporis trapezoidei (Tz) und der Ncl. periolivarius ventralis (VPO).

In den meisten Kerngruppen des SOC (MSO, SPO, LSO und VPO) wurde für HCN4 eine intensive IR gefunden. Sowohl die Perikarya als auch das Neuropil zeigten sich immunpositiv für den SHG-1E5 AK. Im Tz wurde eine stärkere Antwort bezüglich der Expressierung des HCN4-Kanalproteins sichtbar als in den übrigen Kerngruppen des SOC. Auch hier findet sich eine positive Immunreaktion der Perikarya und des Neuropils. Wie im Inset der Abbildung 3.8 C zu sehen ist, wurden im LSO spindelförmige IP-Neuronen (Durchmesser ca. 20  $\mu\text{m}$ ) gefunden.



**Abb. 3.8:** Photomikroskopische Aufnahmen aus Frontalhirnschnitten. Versuchstier: Ratte; Verwendeter AK: SHG-1E5. **A:** Übersichtsaufnahme des Colliculus superior mit seiner horizontalen Schichteneinteilung. **B:** Colliculus inferior. **Inset B:** Starke Vergrößerung eines positiven spindelförmigen Neuron des Colliculus inferior. **C:** Übersichtsaufnahme des SOC. **Inset C:** Starke Vergrößerung von Neuronen des LSO. PAG: Substantia grisea centralis mesencephali.  $\blacktriangleright$ : HCN4 immunpositive Neuronen,  $\blacktriangleright$ : Neuropil. Balken entspricht in der Abb. 3.8 A, B, C: 100  $\mu\text{m}$ , Inset B und Inset C: 20  $\mu\text{m}$ .

### **3.2.9. Viszeromotorische Kerne**

#### ***Ncl. dorsalis n. vagi (X)***

Der Ncl. dorsalis n. vagi (X) ist ein paariges Kerngebiet, welches sich im dorso - caudalen Bereich der Medulla oblongata, unterhalb des vierten Ventrikels, befindet.

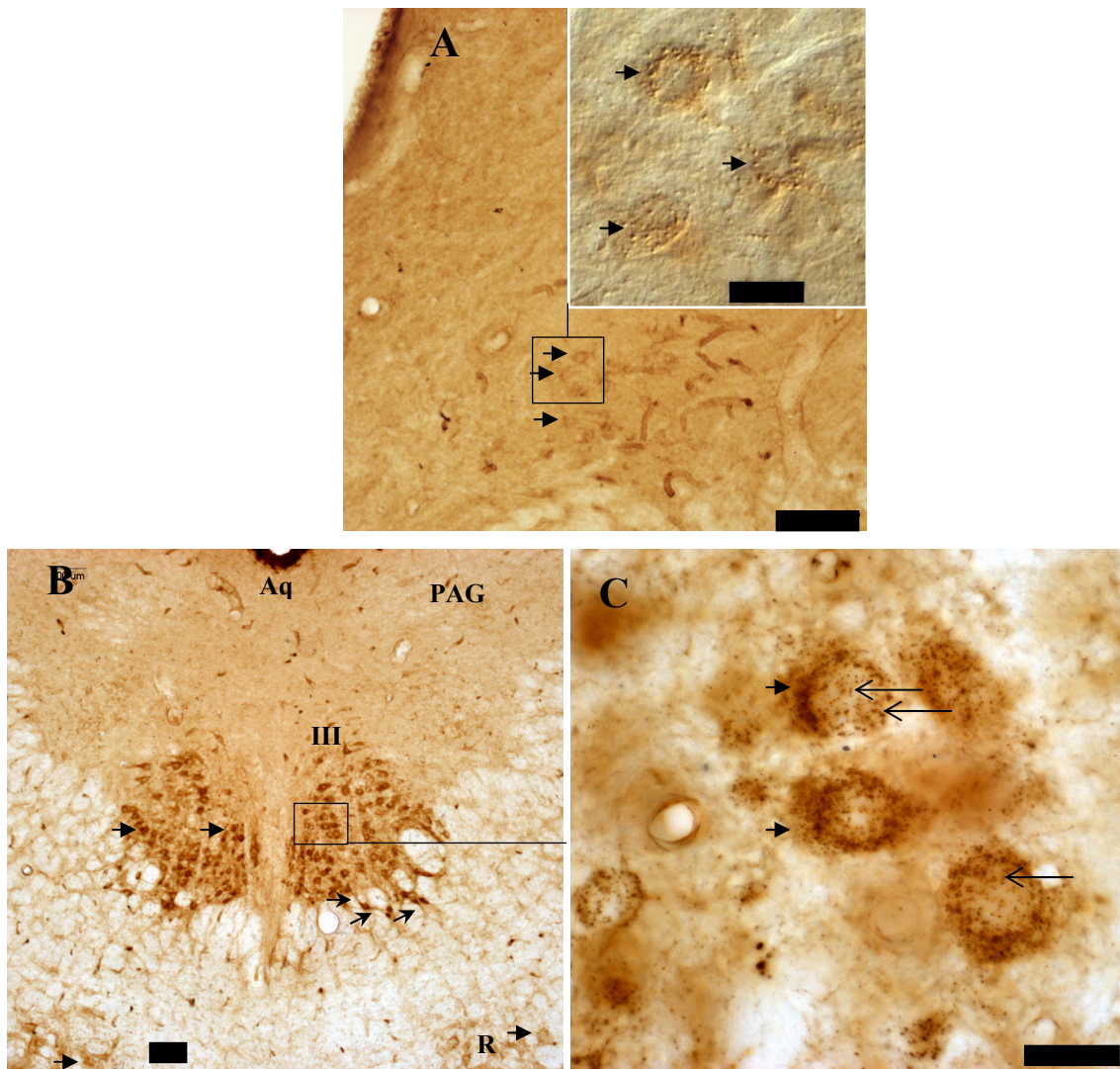
Im Ncl. dorsalis n. vagi fand man eine sehr schwache Immunreaktion des HCN4-AK (Abbildung 3.9 A). Erst bei einer hohen Vergrößerung stellten sich schwach die Perikarya von wenigen Neuronen dar. Diese positiven Neuronen hatten ein rundes Soma mit einem Durchmesser von ca. 15 - 20  $\mu\text{m}$ . Positive Dendriten waren nicht zu finden. In dieser Ebene waren kleinere Gefäße zu finden, welche auf den HCN4-AK positiv reagierten.

### **3.2.10 Somatomotorische Kerne**

#### ***Ncl. n. oculomotorius (III)***

Der Ncl. n. oculomotorius (III) ist ein paarig angelegtes Kerngebiet, das sich im Mittelhirn ventral vom Aquaeductus mesencephali befindet.

Die Motoneuronen des Ncl. III zeigten eine sehr starke HCN4-Immunreaktion. Überall in diesem Kerngebiet reagierten die Perikarya der Motoneuronen positiv und waren gleichmäßig verteilt. Punktähnliche Verdichtungen wurden bei stärkerer Vergrößerung sowohl an der Plasmamembran als auch im Cytoplasma beobachtet (Abbildung 3.9 C). Lediglich der Zellkern wurde ausgespart. Die Motoneuronen hatten ein rundes Soma mit einem Durchmesser von ca. 20  $\mu\text{m}$ . Gelegentlich konnte man bei einigen Neuronen den proximalen Anteil der Dendriten verfolgen (Abbildung 3.9 B).



**Abb. 3.9:** Photomikroskopische Aufnahmen aus Frontalhirnschnitten. Versuchstier: Ratte; Verwendeter AK: SHG-1E5. **A:** Übersichtsaufnahme des Ncl. dorsalis X. **Inset A:** Ausschnittsvergrößerung. **B:** Übersichtsaufnahme des Ncl. III. **C:** Ausschnittsvergrößerung des Ncl. III. R: Ncl. ruber, Aq: Aquaeductus, PAG: Substantia grisea centralis mesencephali. ➔: HCN4 IP-Neuronen, ⤵: Punktähnliche Versammlungen, ➔: Proximaler Anteil von Dendriten. Balken entspricht in der Abb. 3.9. A, B: 100 µm, C und Inset A: 20 µm.

***Ncl. motorius n. trigemini***

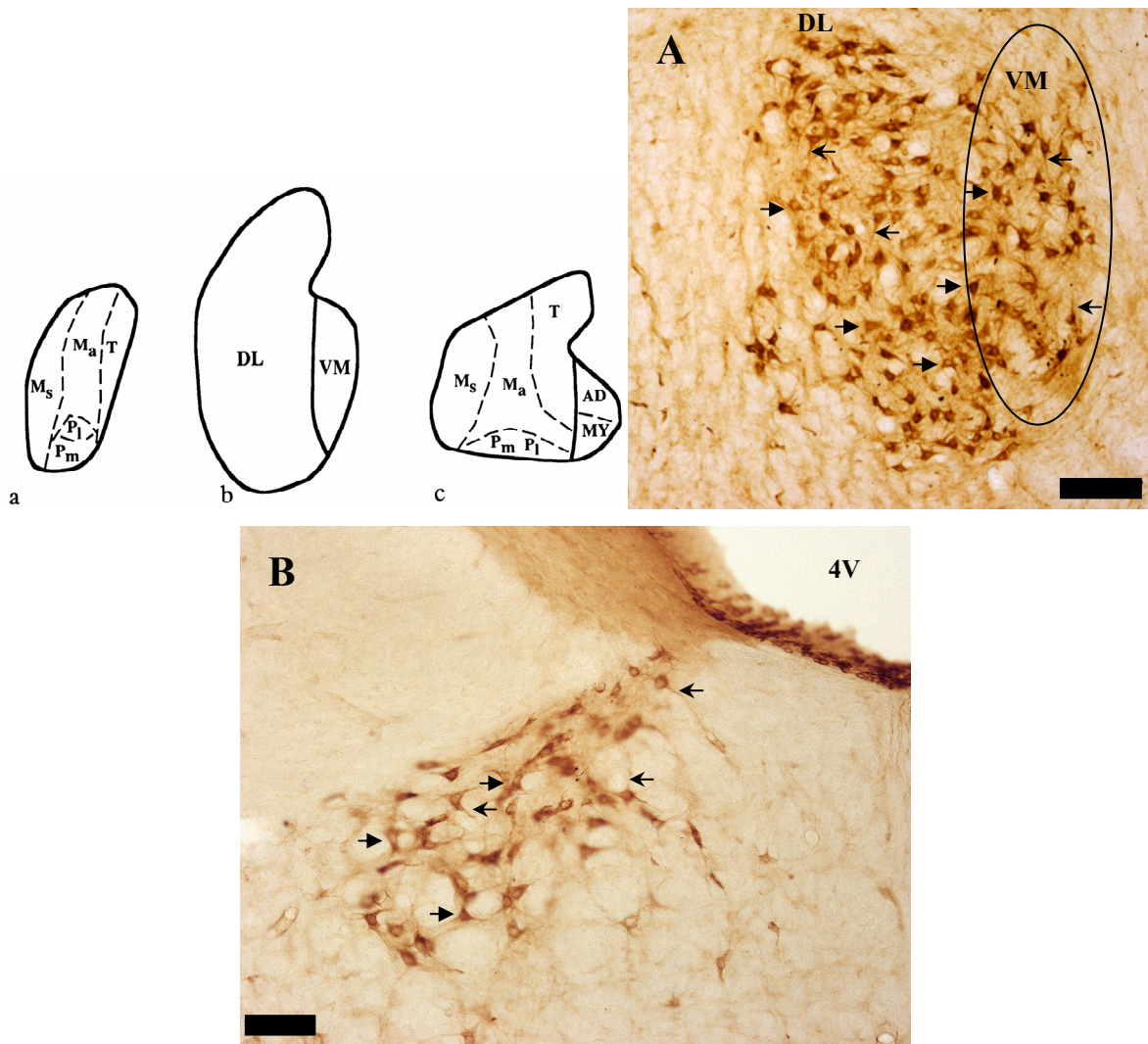
Der Ncl. motorius n. trigemini (Mo5) ist im cranialen Bereich des Pons zu finden. Der Mo5 wird in einem größeren, dorsolateralen (DL) und einen kleineren, ventromedialen im unteren 2/3 gelegenen Bereich (VM) unterteilt (Skizze 3.2 b). Die Skizzen 3.2 a und c zeigen die myotopische Organisation des Mo5. Die Muskeln für den Kieferschluss (M. masseter [ $M_s$ : superficiellen Anteil,  $M_a$ : anterioren, tiefer Anteil], M. pterygoideus medialis [ $P_m$ ], M. temporalis [T]) werden von Motoneuronen des DL innerviert. Die Muskeln, welche die Öffnung des Kiefers ermöglichen (M. digastricus [AD], M. mylohyoideus [MY]) werden von Motoneuronen des VM innerviert. Zu den Muskeln, die den Kiefer öffnen, gehört der M. pterygoideus lateralis [ $P_l$ ]. Seine Motoneuronen befinden sich aber im DL, zusammen mit den Motoneuronen für den Kieferschluss.

Die Motoneuronen des Mo5 zeigten eine starke positive Reaktion auf den HCN4-AK. Betrachtet man das Verteilungsmuster HCN4 IP-Neuronen des Mo5, so fiel auf, dass sowohl im DL als auch im VM keine spezifische Verteilungscharakteristik bezüglich der vorhin erwähnten myotopischen Organisation des Kernes festzustellen war (Abbildung 3.10 A). Diese IP-Motoneuronen waren im DL und im VM gleichmäßig verteilt. Die positiven Neuronen waren multipolar, wiesen mehr als drei primäre Dendriten auf, hatten ein elliptisches Soma und einen Durchmesser von ca. 10 - 15  $\mu\text{m}$ . Zusätzlich zum Perikaryon der Motoneuronen, welches sich deutlich positiv darstellen ließ, waren auch die proximalen Anteile der Dendriten positiv.

***Ncl. n. abducentis (VI)***

Der Ncl. n. abducentis (VI) gehört zu den caudalen Kerngebieten des Pons. Es ist ein paariges Kerngebiet, welches durch den Fasciculus longitudinalis medialis von einander getrennt wird und ventral des IV. Ventrikels (4V) verläuft.

Eine deutliche immunologische Antwort bezüglich des SHG-1E5 AK war in den Motoneuronen des Ncl. VI zu finden. Diese waren gleichmäßig im gesamten Kerngebiet verteilt. Die IP-Motoneuronen wiesen ein spindelförmiges Soma mit einem Durchmesser von ca. 20  $\mu\text{m}$  auf. Punktähnliche Verdichtungen waren bei stärkerer Vergrößerung in der Zellmembran, im Cytoplasma (mit Ausnahme des Zellkerns) und in den proximalen Anteilen der Primärdendriten zu sehen. Fast bei jedem IP-Motoneuron waren mindestens zwei Primärdendriten sichtbar (Abbildung 3.10 B). Der proximale Anteil dieser Dendriten war in einer Länge bis zu 40  $\mu\text{m}$  zu verfolgen.



**Skizze 3.2:** Schematische Darstellung des Ncl. Motorius n. trigemini. Die Skizzen a und c geben die myotopische Organisation des Kernes dar. Die Skizze b zeigt die Unterteilung des Mo5 in DL und VM. Skizze wurde aus Paxinos 1995 übernommen.

**Abb. 3.10:** Photomikroskopische Aufnahmen aus Frontalhirnschnitten. Versuchstier: Ratte; Verwendeter AK: SHG-1E5. **A:** Aufnahme des Mo5. **B:** Übersichtsaufnahme des Ncl. VI. 4V: Vierter Ventrikel. → HCN4 IP-Neuronen, → Proximaler Anteil von Dendriten. Balken entspricht in der Abb. 3.10 A und B: 100 µm.

### *Ncl. n. facialis (VII)*

Der Ncl. n. facialis (VII) befindet sich im cranioventralen Anteil der Medulla oblongata. Durch die weiße Substanz wird der Ncl. n. facialis in mehrere Untereinheiten unterteilt: Laterale, dorsolaterale, intermediale und mediale Untereinheiten, welche aber keine cytoarchitektonischen Unterschiede zeigen.

Eine starke positive IR war auch im Ncl. VII zu finden. Die HCN4 IP-Motoneuronen waren gleichmäßig in allen Untereinheiten des Ncl. VII zu finden, so dass keine Unterschiede in der topographischen Organisation der HCN4-Kanäle bezüglich der Innervation einzelner Muskeln zu finden waren (Abbildung 3.11 A). Diese IP-Motoneuronen waren multipolar und hatten ein ovales bis rundes Soma. Mit einem Durchmesser von ca. 20 - 25 µm waren sie etwas größer

als diejenigen Motoneuronen des Ncl. VI. Punktähnliche Verdichtungen waren an der Zellmembran, unter Aussparung des Zellkerns im Cytoplasma und an den Primärdendriten zu finden. Über einer Länge von bis zu 40  $\mu\text{m}$  konnte man den proximalen Anteil der Dendriten bei der Mehrzahl der Motoneuronen erkennen. Dadurch, dass nur der proximale Anteil der Primärdendriten und nur sehr wenige sekundäre Dendriten IP reagierten, zeigte hingegen das Neuropil eine sehr schwache HCN4-IR auf (siehe Sternchen in der Abbildung 3.11 B).

### ***Ncl. ambiguus***

Der Ncl. ambiguus ist ein kleines Kerngebiet der Medulla oblongata, das sich von caudal des inferioren Pol des Ncl. facialis zum Obex ausbreitet.

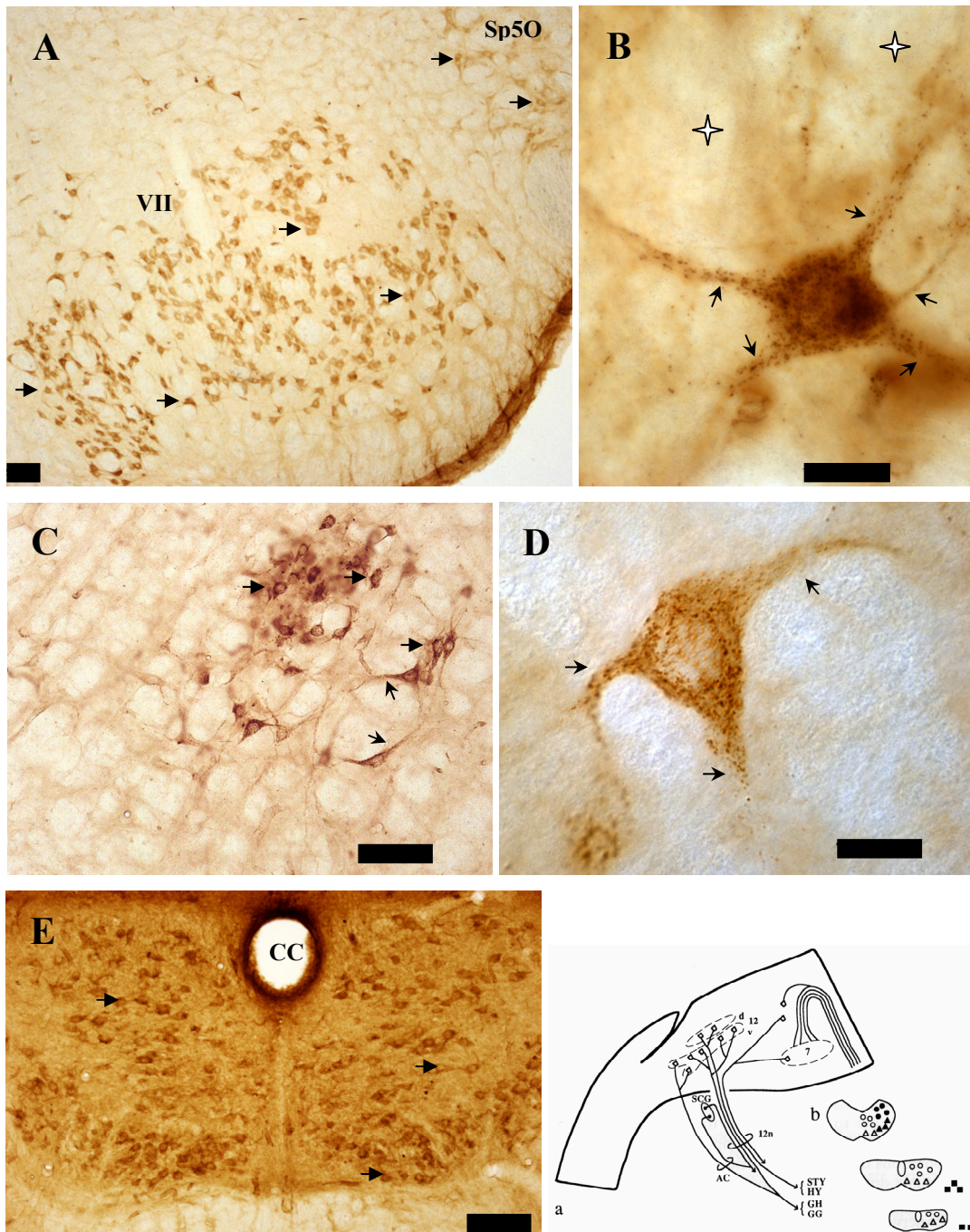
Auch der Ncl. ambiguus zeigte eine starke positive IR auf den HCN4-AK. IP-Motoneuronen waren gleichmäßig im ganzen Kerngebiet verteilt (Abbildung 3.11 C). Diese multipolaren Neuronen wiesen ein spindelförmiges Soma mit einem Durchmesser von ca. 20 - 25  $\mu\text{m}$  auf. Der proximale Anteil der Dendriten ließ sich in einer Länge von bis 60  $\mu\text{m}$  positiv darstellen. Bei stärkerer Vergrößerung ließen sich punktähnliche Verdichtungen wie bei den Motoneuronen des Ncl. VII beobachten (Abbildung 3.11 D).

### ***Ncl. n. hypoglossi (XII)***

Der Ncl. n. hypoglossi befindet sich im Boden des unteren Winkels der Rautengrube und reicht kaudal bis in die ventrale Wand des Zentralkanals.

Mit dem immunhistochemischen Verfahren ließen sich im Ncl. XII positive Motoneuronen für den HCN4-AK nachweisen. Diese Zellen ließen sich in allen Bereichen des Kernes in einem gleichmäßigen Verteilungsmuster nachweisen und zeigten keine Unterschiede bezüglich der myotopischen Organisation. Im rechten Bereich der Abbildung 3.11 E ist zu sehen, dass Motoneuronen sowohl der longitudinalen, als auch der horizontalen und vertikalen Muskeln der Zungenbinnenmuskulatur HCN4-IP sind (Vergleich mit der mittleren Abbildung der Skizze 3.3 b). Das Soma der Motoneuronen wies eine runde bis spindelförmige Form auf, mit einem Durchmesser von ca. 20 - 25  $\mu\text{m}$ , ähnlich der Motoneuronen der anderen bisher beschriebenen somatomotorischen Kerne.





**Abb. 3.11:** Photomikroskopische Aufnahmen aus Frontalhirnschnitten. Versuchstier: Ratte; Verwendeter AK: SHG-1E5. **A:** Übersichtsaufnahme des Ncl. n. facialis. **B:** Sehr starke Vergrößerung eines einzelnen Motoneurons des Ncl. VII aus einem andern Hirnschnitt, aber in etwa aus der gleichen Ebene. **C:** Übersichtsaufnahme des Ncl. ambiguus. **D:** Sehr starke Vergrößerung eines einzelnen Motoneurons des Ncl. ambiguus aus einem anderen Hirnschnitt, aber in etwa aus der gleichen Ebene. **E:** Aufnahme des Ncl. n. hypoglossi. Sp50: Ncl. spinalis n. trigemini, CC: Canalis centralis,  $\blacktriangleright$ : HCN4 IP-Neuronen,  $\blacktriangleright$ : proximaler Anteil der Dendriten. Balken entspricht in der Abb. 3.11 A, C, E: 100  $\mu$ m, B, D: 20  $\mu$ m.

**Skizze 3.3:** **a:** Efferenzen des Ncl. hypoglossi im Sagittalschnitt. d: dorsal, v: ventral, 12: Ncl. n. hypoglossi, 12n: Nervus hypoglossus, 7: Ncl. n. facialis, SCG: Ganglion cervicale superius, AC: Ansa cervicalis, STY: M. styloglossus, HY: M. hyoglossus, GH: M. geniohyoideus, GG: M. genioglossus.

**b:** Myotopische Organisation des Ncl. n. hypoglossi von rostral (erste obere) nach caudal (untere).  $\bullet$ : Motoneuronen für STY und HY,  $\blacktriangle$ : GG,  $\blacksquare$ : GH,  $\circ$ : longitudinale Muskeln der intrinsischen Muskulatur,  $\triangle$ : horizontale und vertikale Muskeln der Zungenbinnenmuskulatur. Skizze wurde aus Paxinos 1995 übernommen.

### **3.2.11 Somatosensible Kerne**

#### ***Ncl. sensorii n. trigemini***

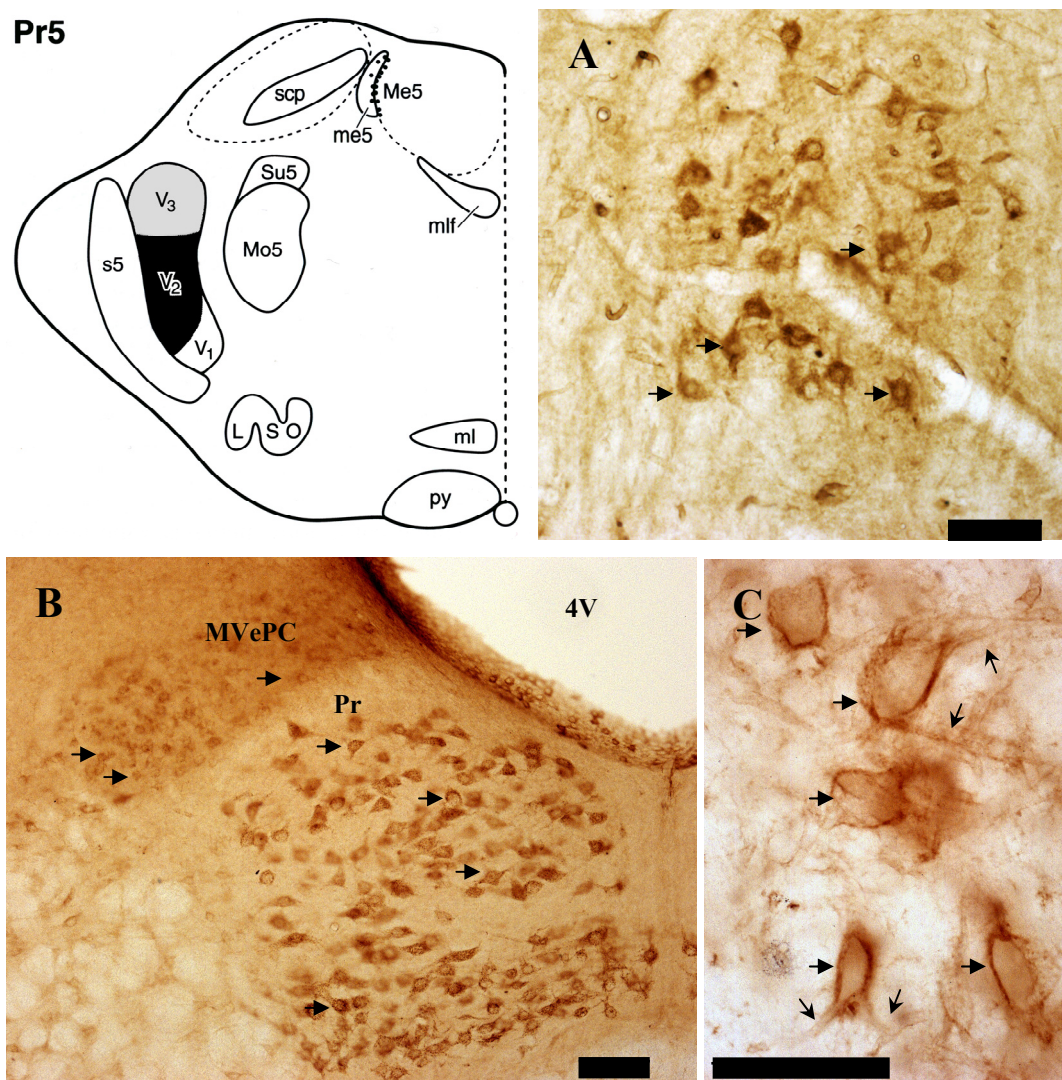
Der Ncl. sensorii n. trigemini principalis (Pr5) bildet zusammen mit dem Ncl. sensorii n. trigemini mesencephalicus (Me5) und dem Ncl. sensorii n. trigemini spinalis (Sp5) die Ncll. sensorii n. trigemini. Sie sind die sensiblen Kerne des N. trigeminus (V). Insgesamt erstrecken sie sich vom Mittelhirn bis zum cervicalen Anteil des Rückenmarkes. Der Pr5 befindet sich im unteren, lateralen Teil der Pons. Skizze 3.4 gibt Aufschluss über die somatotopische Organisation des Ncl. sensorii n. trigemini principalis bezüglich der drei Äste des N. trigeminus.

Im Pr5 wurden HCN4 positive Neuronen gefunden. Bezüglich der somatotopischen Organisation des Pr5 waren nicht in allen Bereichen immunpositive Neuronen zu finden. Neuronen, welche HCN4-Kanalproteine enthielten, stellten sich nur in den Bereichen des V<sub>III</sub> und V<sub>II</sub> dar und zeigten dort eine deutliche IR. Im Bereich des V<sub>I</sub> wurden hingegen keine IP-Neuronen gefunden. Die Abbildung 3.12 A stammt aus einem sehr kranialen Bereich des Kernes Pr5. Der Ncl. sensorii n. trigemini spinalis zeigte im Gegensatz zum Ncl. sensorii n. trigemini principalis bezüglich der somatotopischen Organisation keine Unterschiede im Verteilungsmuster. Dort wurden HCN4 IP-Neuronen in allen drei Bereichen (V<sub>I</sub>, V<sub>II</sub> und V<sub>III</sub>) gefunden. In der Abbildung 3.11 A (Ncl. VII) sind zusätzlich positive Neuronen des Sp5 im V<sub>I</sub> zu sehen. Sowohl im Pr5 als auch im Sp5 hatten die Neuronen ein rundes Soma mit einem Durchmesser von ca. 20 - 25 µm. Der proximale Anteil der Dendriten ließ sich hier ebenfalls darstellen. Die Neuronen des Me5 zeigten auch eine positive Reaktion auf den HCN4-AK. Die Neuronen hatten ein rundes und großes Soma (Durchmesser > 30 µm). Die proximalen Anteile der Dendriten ließen sich nicht darstellen. (Daten sind nicht dargestellt)

#### ***Ncll. vestibulares***

Die Ncll. vestibulares durchziehen fast die gesamte Medulla oblongata. Zu diesen Kernen gehören ein oberes (SuVe - Ncl. Bechterew), ein laterales (LVe - Ncl. Deiter), ein mediales (MVe - Ncl. Schwalbe) und ein caudales/spinales (SpVe - Ncl. Roller) Kerngebiet. Der MVe wird cytoarchitektonisch in einen kleinen kranialen Teil (Ncl. vestibulares mediales parvocellulares - MvePC), einen kaudalen Anteil (MveC) und einen magnozellularen Bereich (MveMC) unterteilt. Zusätzlich werden zu den Ncll. vestibulares kleine Zellgruppen assoziiert (F, X, L, Y und Z).

HCN4 IP-Neuronen lassen sich in den Ncl. vestibulares nur innerhalb des Ncl. vestibulares mediales parvocellulares (MVePC) darstellen. Hier handelt es sich um Neuronen, welche sich in der Nähe des Ncl. praepositus hypoglossi befinden. Die anderen Neuronen des MvePC waren negativ für die HCN4 Immunreaktivität. Auch in den anderen Bereichen der Ncl. vestibulares (SuVe, LVe, MVe, SpVe, MveC, MveMC) wurden keine IP-Neuronen gefunden. Die HCN4 IP-Neuronen hatten ein ovales Soma mit einem Durchmesser von ca. 20 - 30  $\mu\text{m}$ . Nur die Zellmembran reagierte positiv auf den HCN4-AK, nicht hingegen das Cytoplasma. Zahlreiche immunpositive Dendriten waren zu sehen und sie konnten durch die IHC-Reaktion über einer Länge von bis 50  $\mu\text{m}$  verfolgt werden (Abbildung 3.12 C).



**Skizze 3.4:** Schematische Darstellung der Cytoarchitektonik des Ncl. sensorii n. trigemini principalis bezüglich der drei sensorischen Äste des N. Trigemini. Skizze wurde aus Paxinos 1995 übernommen.

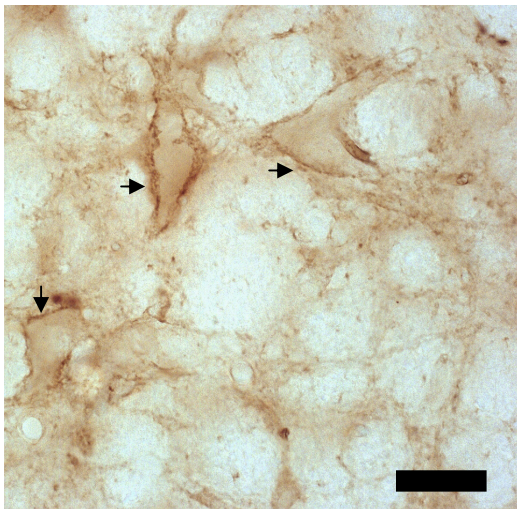
**Abb. 3.12:** Photomikroskopische Aufnahmen aus Frontalhirnschnitten. Versuchstier: Ratte; Verwendeter AK: SHG-1E5. **A:** Aufnahme des Pr5. **B:** Übersichtsaufnahme des Ncl. vestibulares mediales parvocellulares (MVePC) und des Ncl. praepositus hypoglossi (Pr). **C:** Detaillaufnahme des MVePC aus einem anderen Hirnschnitt, aber in etwa der gleichen Ebene. 4V: Vierter Ventrikel;  $\rightarrow$ : HCN4 IP-Neuronen,  $\blacktriangleright$ : proximaler Anteil der Dendriten. Balken entspricht in der Abb. 3.12 A, B und C: 100  $\mu\text{m}$ .

### **3.2.12 Formatio reticularis medialis**

#### ***Ncl. reticularis gigantocellularis***

Der Ncl. reticularis gigantocellularis gehört der Formatio reticularis medialis an und erstreckt sich vom Ncl. praepositus hypoglossi und Ncl. n. hypoglossi als strahlenförmiger Keil nach ventral.

Eine Reihe riesiger multipolarer Neurone mit einem Durchmesser von ca. 40 - 50 µm zeigten im Ncl. reticularis gigantocellularis eine schwach positive Reaktion für den monoklonalen SHG-1E5 Antikörper. Bei höherer Vergrößerung (Abbildung 3.13) wurde sichtbar, dass die der Plasmamembran zugehörige IR eine ungleichmäßige Verteilung besaß. Das Cytoplasma wies eine noch schwächere immunhistochemische Reaktion auf. Ein ähnliches Muster konnte auch in den IP-Dendriten dieser Neuronen beobachtet werden.



**Abb. 3.13:** Photomikroskopische Großaufnahme von HCN4 positiven Riesenzellen im Ncl. reticularis gigantocellularis. Frontalschnitt einer Ratte. Verwendeter AK: SHG-1E5. Pfeile: IP-Riesenzellen des Ncl. reticularis gigantocellularis. Balken entspricht 50 µm.

#### ***Ncl. praepositus hypoglossi***

Der Ncl. praepositus hypoglossi erstreckt sich vom Knie des N. facialis bis zum oberen Pol des Ncl. n. hypoglossi, am Boden des vierten Ventrikels.

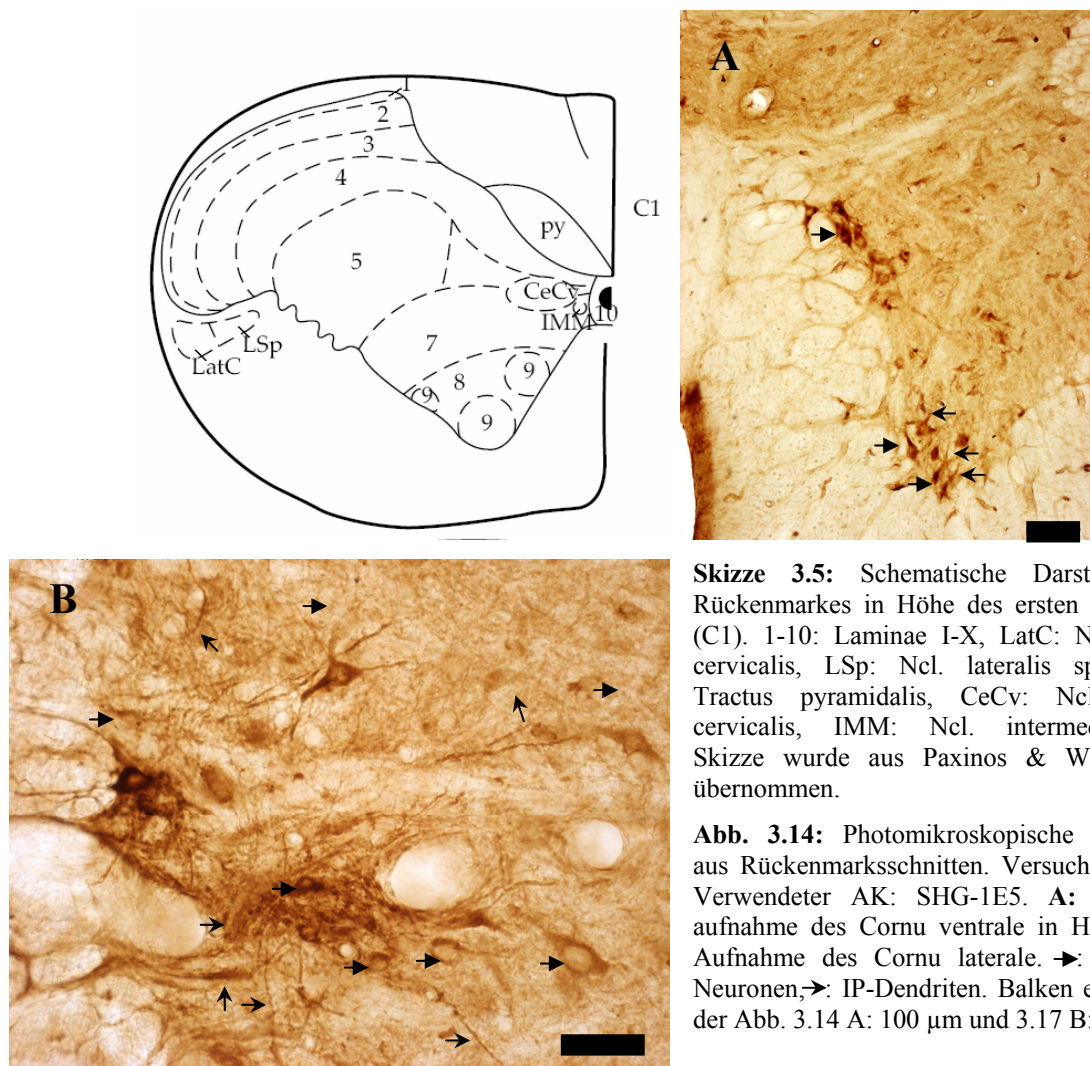
Im Ncl. praepositus hypoglossi waren eine Vielzahl von Neuronen zu finden, welche auf das HCN4-AK deutlich positiv reagierten (Foto siehe Ncl. vestibulares, Abbildung 3.12 B). Die IP-Neuronen waren gleichmäßig im ganzen Kern verteilt. Diese multipolaren, positiven Neuronen hatten ein eher rundes Perikaryon mit einem Durchmesser von ca. 15 - 20 µm. Sowohl an der Zellmembran des Perikaryons, dem Cytoplasma, mit Ausnahme des Zellkerns, und als auch an den proximalen Anteilen der Primärdendriten wurden punktförmige Verdichtungen sichtbar.

### 3.2.13 Medulla spinalis

Die unten gezeigte Skizze gibt einen Aufschluss über die Verteilung der Laminae in der grauen Substanz des gesamten Rückenmarks in Höhe C1 und ermöglicht damit einen besseren Vergleich mit den photomikroskopischen Aufnahmen.

Mit dem HCN4-AK ließ sich im Cornu ventrale eine starke positive Reaktion von Neuronen darstellen. Voraussichtlich handelte es sich hierbei um Motoneuronen der Lamina IX. Diese IP-Motoneuronen waren multipolar mit spindelförmigem Soma. Sie wiesen einen Durchmesser von 15 - 20  $\mu\text{m}$  auf. Zusätzlich zur Zellmembran, dem Cytoplasma unter Aussparung des Zellkerns ließen sich auch die proximalen Anteile der Primärdendriten der Motoneuronen in einer Länge bis zu 40  $\mu\text{m}$  (Abbildung 3.14 A) positiv darstellen.

Im Cornu laterale wurden HCN4 positive Neuronen gefunden, welche unterschiedliche Formen und Größen hatten (siehe Abbildung 3.14 B). Im Gegensatz zum Cornu ventrale wurde hier ein sehr dichtes Geflecht aus Dendriten ohne ihre zugehörigen Perikarya deutlich sichtbar. Die Dendriten waren zum Teil über einer Länge von bis zu 150  $\mu\text{m}$  zu verfolgen.



**Skizze 3.5:** Schematische Darstellung des Rückenmarkes in Höhe des ersten Halswirbels (C1). 1-10: Laminae I-X, LatC: Ncl. lateralis cervicalis, LSp: Ncl. lateralis spinalis, py: Tractus pyramidalis, CeCy: Ncl. centralis cervicalis, IMM: Ncl. intermediomedialis. Skizze wurde aus Paxinos & Watson 1998 übernommen.

**Abb. 3.14:** Photomikroskopische Aufnahmen aus Rückenmarksschnitten. Versuchstier: Ratte; Verwendeter AK: SHG-1E5. **A:** Übersichtsaufnahme des Cornu ventrale in Höhe C1. **B:** Aufnahme des Cornu laterale.  $\rightarrow$ : HCN4 IP-Neuronen,  $\rightarrow$ : IP-Dendriten. Balken entspricht in der Abb. 3.14 A: 100  $\mu\text{m}$  und 3.17 B: 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.3 Tabellarische Zusammenfassung der Lokalisation des HCN4-Kanalproteins im ZNS der Ratte

Telencephalon		Septum und basales Vorderhirn	
<b>Isocortex</b>		<b>Ncl. Septi</b>	
Cortex*		Septum laterale	2
Lamina 1	0	Septum mediale	2
Lamina 2	2	Diagonales Band von Broca	1
Lamina 3	2	Bed ncl. stria terminalis	1
Lamina 4	1	Ncl. basalis Meynert	1
Lamina 5	1-2	Taenia tecta	0
Lamina 6	1		
Corpus callosum	0	<b>Basalganglien</b>	
		Ncl. Caudatus - Putamen	1-2
		Globus pallidus	1-2
		Pallidum ventrale	2
		Ncl. accumbens	0-1
		Clastrum	0
		<b>Archipallium</b>	
		<b>Archicortex</b>	
Hippocampus		<b>Corpus amygdaloideum</b>	
CA1		Ncl. amygdalae centralis	2
Stratum oriens	0-1	Ncl. amygdalae ventralis	2
Stratum pyramidale	2	Ncl. amygdalae basolateralis	2
Str. rad.-lac.-mol.	0-1	Ncl. amygdalae medialis	2
CA2		Ncl. amygdalae basomedialis anterior	2
Stratum oriens	0-1		
Stratum pyramidale	2	<b>Diencephalon</b>	
Str. rad.-lac.-mol.	0-1	<b>Thalamus</b>	
CA3		Ncl. anteriores	2-3
Stratum oriens	0-1	Ncl. intralaminares et medianis	1-2
Stratum pyramidale	2	Ncl. reticularis	3
Stratum lucidum	0	Ncl. paraventricularis	0-1
Str. rad.-lac.-mol.	1	Ncl. ventrobasales	2-3
Gyrus dentatus			
Stratum granulosum	2	<b>Metathalamus</b>	
Stratum plexiforme	2	Corpus geniculatum laterale (Principal relay n.)	2-3
Hilus	1	Corpus geniculatum mediale	2
Subiculum	0		
<b>Periarchicortex</b>			
Cortex cingularis	1-2	<b>Epithalamus</b>	
		Ncl. habenulae medialis	3
<b>Palaeocortex</b>		Ncl. habenulae lateralis	1
Bulbus olfactorius	0-1	<b>Subthalamus</b>	
Str. glomerulosum		Zona incerta	2-3
Str. mitrale		Ncl. subincertalis	2
Str. granulosum internum		Ncl. subthalamicus	1-2
Tuberculum olfactorium	2		
Insula Calleja	1-2		
Cortex piriformis	2-3		

**Hypothalamus**

Ncl. praeopticus medialis	4
Ncl. praeopticus magnocellularis	2
Ncl. suprachiasmaticus	4
Ncl. supraopticus	4
Ncl. paraventricularis	4
Ncl. ventromedialis	0
Ncl. arcuatus	2
Ncl. periventricularis hypothalami	1
Corpus mamillare	2
Ncl. posterior hypothalami	1

**Truncus cerebri****Mesencephalon****Tegmentum mesencephali**

Ncl. tractus opticus	0
Ncl. parabigeminalis	0
Ncl. n. oculomotorii	4
Ncll. accessorii n. oculomotorii (Edinger-Westphal)	4
Ncl. n. trochlearis	4
Ncl. ruber	3
Substantia nigra	
Pars reticularis	2-3
Pars compacta	2-3
Ncll. Tegmenti	
Ncl. Interstitialis (Cajal)	2
Ncl. Darkschewitz	2
Ncl. dorsalis tegmenti	1-2
Ncl. ventralis tegmenti	1-2
Area tegmentalis ventralis	0
Area praetectalis anterior	2
Ncl. interpeduncularis	2
Substantia grisea centralis mesencephali	1-2
Tiefe mesencephalische Kerne	1
Ncl. subbrachialis	1-2
Ncll. lemnisci lateralis	3-4

**Tectum mesencephali**

Colliculus superior (cranialis)	
Stratum griseum superficiale	0
Stratum opticum	0
Str griseum intermedium	0
Str griseum profundum	1-2
Str album profundum (medullare)	0
Colliculus inferior (caudalis)	1-2

**Medulla oblongata und Pons****Area tegmentalis pontis**

Ncl. tegmentalis dorsalis	1
Ncl. tegmentalis posterodorsalis	1
Ncl. tegmentalis dorsalis lateralis	1-2
Ncl. tegmentalis ventralis (Gudden)	1-2
Ncl. tegmentalis microcellularis	0
Ncl. Barrington	1

**Andere Hirnstammregionen**

Ncl. pontis	3
Locus coeruleus	0
Oliva superior	3
Ncl. corporis trapezoidei	3-4
Ncl. supragenualis	0
Ncl. parabrachialis	0
Oliva inferior	2-3

**Visceromotorische Kerne**

Ncll. accessorii n. oculomotorii (Edinger - Westphal)	1
Ncll. salivatorii	1-2
Ncl. dorsalis n. vagi (X)	1

**Viscerosensible Kerne**

Ncl. tractus solitarii	1
------------------------	---

**Somatomotorische Kerne**

Ncl. n. oculomotorius (III)	4
Ncl. n. trochlearis (IV)	4
Ncl. motorius n. trigemini (V)	4
Ncl. n. abducentis (VI)	4
Ncl. n. facialis (VII)	4
Ncl. accessorius n. facialis	4
Ncl. ambiguus	4
Ncl. n. hypoglossi (N XII)	4
Ncl. n. accessorii	4

**Somatosensible Kerne**

Ncl. gracilis	2
Ncl. cuneatus	2
Ncl. cuneatus externus	2
Ncll. sensorii n. trigemini	
mesencephalicus	3
principalis (pontinus)	3
spinalis	3
Ncll. cochlearis	
dorsalis	4
ventralis	4
Ncll. vestibulares	
medialis	2-3
lateralis	0
spinalis	0
superioris	0

**Cerebellum**

Cortex	
Stratum moleculare	2
Stratum ganglionare	3
Stratum granulosum	1
Ncll. Cerebelli	
Ncl. interpositus	3
Ncl. lateralis	3
Ncl. infracerebellaris	3

**Medulla spinalis**

Cornu dorsale	1-2
Cornu ventrale	4
Cornu laterale	2-3

**Formatio reticularis**

Raphekerne	
dorsalis	1-2
magnus	1
medianus	1
interpositus	1
pallidus	1
<b>Formatio reticularis medialis</b>	
Ncl. cuneiformis	1
Ncl. reticularis pontis	1
Ncl. reticularis tegmenti pontis	1
Ncl. reticularis pontis caudalis	1
Ncl. reticularis gigantocellularis	1-2
Ncl. reticularis paragigantocellularis	1
Ncl. praepositus hypoglossi	4
Ncl. reticularis parvocellularis	1
Area reticularis medullaris	0
Ncl. parapyramidalis	0
<b>Formatio reticularis lateralis</b>	
Ncl. tegmentalis pedunculopontinus	2
Ncl. medullae oblongatae centralis	0



#### **4.1 Antikörper-Charakterisierung**

Mittels der Epitop-Charakterisierung wurde der Beweis erbracht, dass sowohl alle monoklonalen als auch der polyklonale AK (PPc73K) spezifisch an ihren jeweiligen Epitop-Regionen des SHG-Peptides binden. Weiterhin ergab die Homologiesuche, dass die AS-Sequenz des SHG-Peptides eine 100%ige AS-Sequenzidentität zu der AS-Sequenz des m(Maus)HCN4-, r(Ratte)HCN4- und h(Mensch)HCN4-Proteins aufweist. Dies entspricht den von Monteggia und seinen Mitarbeitern (2000) veröffentlichten Daten, dass das rHCN4-Gen mit dem hHCN4-Gen identisch ist und mit dem des Kaninchens eine 97%ige Übereinstimmung aufweist. Bei den anderen Homologen zeigte sich hingegen eine sehr niedrige Übereinstimmung in der AS-Sequenz. Die meisten dieser Proteine stammten nicht aus Nagetieren. Weitere Proteine wie z.B. WASL\_MOUSE (Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein), WASIP\_MOUSE (Wiskott-Aldrich syndrome protein interacting protein), VASP\_MOUSE (Vasodilator-stimulated phosphoprotein) etc. kommen nicht im Gehirn von Nagetieren vor, sondern in Muskeln oder anderen Geweben. Dies führte zu der Annahme, dass die theoretische Wahrscheinlichkeit von Kreuzreaktionen der Primärantikörper mit anderen Proteinen im zentralen Nervensystem der Ratte sehr gering ist.

Western Blot-Analysen ergaben, dass alle getesteten Primärantikörper ein Protein mit einem Molekulargewicht von 132 kDa detektieren, welches dem errechneten Molekulargewicht von humanem HCN4 (129 kDa) ungefähr entspricht. Dieser geringe Unterschied lässt sich durch das vermehrte Vorliegen einiger bestimmter Aminosäuren erklären. Zusätzlich konnte anhand von Western Blot-Analysen gezeigt werden, dass mit diesen Primärantikörpern eine zweite schwerere AS-Kette (160 kDa) detektierbar ist. Das Verschwinden der 160 kDa Bande und die Verstärkung der ersten Bande (132 kDa) nach Deglykosylierung bestätigten den Verdacht, dass es sich hierbei um eine glykosylierte Form des HCN4-Proteins handelt, und zwar um eine posttranslationale Modifikation des Proteins durch Anheftung von Kohlenhydraten (Scholten 2001, Müller *et al.* 2003). Versuche an mHCN2 zeigten, dass durch die gezielte Mutation des Asparagins 380 (potenzielle Glykosylierungsstelle) zu Glutamin, mHCN2 nicht mehr zu der Plasmamembran transportiert werden konnte. Transfizierte HEK Zellen mit dem Mutanten mHCN2 konnten keine funktionellen Kanäle mehr ausbilden und keinen HCN-Strom erzeugen. Kam es aber zum Transport des mHNC2 zur Plasmamembran, hatten die Kohlenhydratketten keinen Einfluss mehr auf die Stromeigenschaften der Zelle, womit gezeigt wurde, dass die Glykosylierung eine wichtige Funktion für den Membrantransport der HCN-Kanäle besitzt (Much *et al.* 2003). Des Weiteren wurde eine Signalverstärkung bei den

Western Blots an Membranproteinen aus selektiven Gehirnregionen gegenüber den Western Blot-Analysen an Membranproteinen aus dem gesamten Gehirn von Mäusen und Ratten sichtbar (Scholten 2001). Die Ergebnisse dieser Arbeit als auch die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen zeigten unabhängig von den eingesetzten Methoden (Immunhistochemie, *In situ* Hybridisierung oder Elektrophysiologie), dass HCN4-Kanäle nicht im gesamten Gehirn gleichmäßig verteilt vorkommen (Monteggia *et al.* 2000, Moosmang *et al.* 1999, Santoro *et al.* 2000, Notomi & Shigemoto 2004). Diese ungleichmäßige Verteilung innerhalb des Gehirnes erklärt die Signalverstärkung von Western Blot-Analysen aus selektiv ausgewählten Gehirnregionen, in welchen HCN4-Kanäle zu finden sind, gegenüber den WB aus dem gesamten Gehirn.

Die immunhistochemischen Versuche mit den verschiedenen Primärantikörpern zeigten, dass der monoklonale SHG-1E5 AK die besten immunhistologischen Ergebnisse erzielt. Der Vergleich der Immunreaktion vom Antikörper SHG-1E5 in der Ratte mit der Immunreaktion in anderen Nagetierarten und der Vergleich mit der Immunreaktion des PPc73K AK und den käuflich erhältlichen APC-052 AK lieferten in den gleichen Gehirnregionen positive respektive negative Ergebnisse.

Eine mögliche Erklärung für den niedrigeren Background in dem untersuchten Gehirngewebe von Hamstern und Meerschweinchen ist, dass der Sekundär-AK, welcher sich gegen das IgG des immunisierten Tieres richtet, zu weniger unspezifischen Kreuzreaktionen führt. Dendriten konnten in manchen Regionen mit dem polyklonalen AK APC-052 IR über eine deutliche längere Distanz als mit dem SHG-1E5 Antikörper beobachtet werden. Dies könnte damit im Zusammenhang stehen, dass der APC-052 AK im Gegensatz zum SHG-1E5 Antikörper am N-Terminus des HCN4-Proteins bindet.

Werden die Ergebnisse aus dem ersten Teil dieser Arbeit, der Antikörper-Charakterisierung, zusammengefasst, so zeigen diese die Spezifität des monoklonalen SHG-1E5 Antikörper gegen das HCN4-Kanalprotein auf.

#### **4.2 Lokalisationsanalyse des HCN4-Kanalproteins im zentralen Nervensystem der Ratte**

Erst durch die Klonierung der HCN Gene im Jahr 1998 ist es möglich geworden, einen genaueren Einblick über die Verteilung der HCN-Kanäle zu gewinnen. Verschiedene Methoden wie Western Blot, Northern Blot (NB), *In situ* Hybridisierung (ISH), Immunhistochemie, sind dadurch ermöglicht worden und geben Auskunft über das Verteilungsmuster von DNA, RNA oder Proteinen wieder. Diese verschiedenen Methoden weisen unterschiedliche Zielsetzungen auf und haben ihre jeweiligen Vor- und Nachteile. Die Immunhistochemie gibt eine genaue Verteilung von Proteinen auf zellulärer und subzellulärer Ebene wieder. Nachteil sind mögliche Kreuzreaktionen, welche die Ergebnisse verfälschen könnten. Der Western Blot gibt Aufschluss darüber, ob sich das gesuchte Protein in dem untersuchten Gewebe befindet oder nicht. Dieses Verfahren ist spezifisch, es gibt aber keine Auskunft, in welchen Zellen und an welchem Ort innerhalb der Zelle sich das Protein befindet (keine zelluläre und subzelluläre Lokalisation). Mit der Methode der *In situ* Hybridisierung ist es möglich, Transkripte (mRNA) direkt auf einem Gewebeschnitt zu detektieren. Ein Nachteil der *In situ* Hybridisierung gegenüber der Immunhistochemie ist, dass sich die Transkripte im Cytoplasma der Zellen befinden, während Proteine an verschiedenen subzellulären Orten lokalisiert sein können. Weiterhin können sich die Transkriptionsraten von Translationsraten unterscheiden, welche unterschiedliche Expressionsraten von mRNA und Proteinen erklären. Zusätzlich gibt es noch eine große Anzahl an elektrophysiologischen Versuchen, welche zur Lokalisationsanalyse der HCN-Kanäle hilfreich hinzugezogen werden können. Diese zeigen das Vorkommen von  $I_h$ -Strömen in den untersuchten Zellen bestimmter Regionen auf und können z.T. die Zelltypen spezifizieren, in denen HCN-Kanäle vorkommen oder nicht. Des Weiteren können sie einen Einblick in die subzelluläre Verteilung (Soma, proximaler -, distaler Dendrit oder im Axon) der  $I_h$ -Ströme wiedergeben. Eine Spezifizierung, um welchen der HCN-Kanäle es sich handelt oder handeln könnte, wurde größtenteils nicht gemacht bzw. eine Schlussfolgerung kann daraus nicht gezogen werden. Entweder wurden elektrophysiologische Eigenschaften, welche eine Einteilung zulassen, nicht gemessen bzw. nicht veröffentlicht oder die Werte lagen zwischen denen der einzelnen homooligomeren HCN-Kanäle. Mögliche Erklärungen, warum Werte nativer  $I_h$ -Ströme zwischen den Werten von *in vitro* gemessenen  $I_h$ -Strömen liegen werden im Kapitel 4.3 ausführlich erklärt. Der Grund, dass bis dahin nur unvollständige Angaben über die Lokalisation der HCN-Kanäle, sogar mit z. T. widersprüchlichen Ergebnissen aus WB, NB, ISH und elektrophysiologischen Untersuchungen vorlagen, erforderte eine detaillierte Aussage über die Lokalisation der verschiedenen HCN-Proteine im zentralen Nervensystem (ZNS). Zur Aufklärung der genauen

Lokalisation wurden die IHC-Versuche durchgeführt. Des Weiteren sollte der Vergleich unserer Ergebnisse mit den Daten aus anderen Studien, welche entweder mit anderen AK oder durch andere Methoden erzielt worden sind, einen genaueren Einblick über das Lokalisationsmuster der HCN4-Untereinheit geben (siehe Anhang Kapitel 6.1).

In dieser Arbeit ist mit Hilfe des charakterisierten SHG-1E5 Antikörpers die Lokalisation des HCN4-Kanalproteins im Rattengehirn und erstmals auch im Rückenmark untersucht worden. Sie zeigt, dass HCN4 insgesamt ein weit verbreitetes Verteilungsmuster im Gehirn von Nagetieren aufweist. In der Literatur wird zum Teil davon berichtet, dass HCN4 ein auffallend begrenztes Verteilungsmuster im Gehirn aufweist (Moosmang *et al.* 1999, Santoro *et al.* 2000, Monteggia *et al.* 2000, Chen S *et al.* 2001). Zusätzlich richtet sich das Augenmerk vieler Forschungsgruppen vor allem auf das Telencephalon und Diencephalon, davon insbesondere Cortex, Hippocampus, Thalamus und Epithalamus, denn in diesen Bereichen werden den HCN-Kanälen wichtige Funktionen zugeschrieben (siehe Einleitung 1.7). Diese Arbeit weist darauf hin, dass HCN4-Kanalproteine zusätzlich in Bereichen des Hypothalamus, Mesencephalon, Medulla oblongata, Pons, Cerebellum und Medulla spinalis ein sehr ausgeprägtes Vorkommen haben. Obwohl dieses in den Ergebnissen nicht für alle untersuchten Nagetierarten ausführlich gezeigt werden konnte, wurde in Mäusen, Hamstern und Meerschweinchen ein sehr ähnliches bis gleiches Verteilungsmuster wie in Ratten gefunden.

In einigen Regionen, wie z.B. Ncl. praeopticus medialis, Ncl. paraventricularis, Ncl. n. oculomotorius (III), Ncl. n. abducentis (VI), Ncl. n. facialis (VII), Ncl. ambiguus oder Ncl. praepositus hypoglossi, sind an den Perikaryen der HCN4-positiven Neuronen IP punktähnliche Verdichtungen deutlich sichtbar. Bisher ist es aber noch unklar, ob diese Verdichtungen nur an der Oberfläche der Plasmamembran oder auch im Cytoplasma zu finden sind. Würden sich diese in der Plasmamembran bzw. an deren Oberfläche befinden, so könnte es sich um gruppierte Rezeptorkomplexe handeln. Falls diese Verdichtungen im Cytoplasma lokalisiert sind, könnte es sich einerseits um Transportvesikel handeln, welche nicht bzw. noch nicht funktionierende Rezeptorproteine befördern. Andererseits könnte es sich um multivesikuläre Körperchen handeln, die Rezeptorproteine metabolisieren. Lichtmikroskopische Untersuchungen sind nicht ausreichend, um darüber genaue Aussagen machen zu können. Deswegen wäre es sinnvoll, elektronenmikroskopische Untersuchungen an HCN4-positiven Neuronen der zuvor genannten Regionen durchzuführen.

Verschiedene Forschungsgruppen haben mittels elektrophysiologischer Versuche gezeigt, dass  $I_h$ -Kanäle in einer höheren Dichte in apikalen distalen Dendriten (zum Teil mehr als sechs Mal so viel) als in den Somata von Neuronen vorkommen. Diese Aussagen beruhen auf Erforschungen an Pyramidenzellen des Cortex und Hippocampus (CA1) (Magee 1998, Tsubokawa *et al.* 1999, Stuart & Spruston 1998). Es wurden leider keine Angaben gemacht, um welche HCN-Kanäle es sich handeln könnte bzw. eine Schlussfolgerung konnte aus den veröffentlichten Ergebnissen nicht gezogen werden. HCN4-IR konnte im Cortex in den distalen Dendriten nicht aufgezeigt werden. Hingegen wurde für HCN1 eine sehr ausgeprägte immunopositive Reaktion in den distalen Dendriten von Pyramidenzellen des Cortex sichtbar (noch nicht veröffentlichte Daten unserer Forschungsgruppe, Santoro & Tibbs 1999, Lörincz *et al.* 2002). Pyramidenzellen des Hippocampus (CA1-CA3) zeigten für HCN4-IP Reaktionen in Dendriten in einer Länge bis zu 160  $\mu\text{m}$ . Dagegen wurden die  $I_h$ -Ströme in einer Entfernung von ca. 300  $\mu\text{m}$  gemessen, also fast doppelt so weit entfernt als die HCN4-IP Proteine (Magee 1998, Tsubokawa *et al.* 1999). Zusammenfassende Aussagen wie z.B. von Kitayama und Mitarbeitern (2003) können fälschlicherweise zu verstehen geben, dass alle HCN-Kanäle in einer höheren Dichte in den apikalen Dendriten als in den Somata aller Neuronen vorkommen. Diese Aussage sollte generell genauer untersucht werden, vor allem in Bezug auf die einzelnen Untereinheiten. Denn bisher wurde nur für HCN1 und HCN2 in bestimmten Bereichen (z.B. Cortex) ein bevorzugtes Vorkommen in distalen Dendriten nachgewiesen. Diese Arbeit zeigt, dass HCN4 IP-Reaktionen vor allem im Soma und proximalen Dendriten zu finden sind.

Weiterhin fällt im Truncus cerebri auf, dass HCN4-Kanäle in allen Kerngebieten der somatomotorischen Kerne ein sehr hohes Vorkommen aufweisen. Die verschiedenen somatosensiblen Kerne weisen eine unterschiedliche Intensität der IR auf, welche aber insgesamt schwächer ist als die des somatomotorischen Systems. In den viszeromotorischen und viszerosensiblen Kernen zeigte sich hingegen ein schwaches Vorkommen. Ferner findet man in den somatomotorischen und den somatosensiblen Kernen weitere Unterschiede. Generell weisen somatomotorische Kerne bezüglich ihrer Innervationsgebiete eine myotopische Organisation innerhalb ihrer Kerngebiete auf, wobei es aber keine cytoarchitektonischen Unterschiede gibt. Beispiele des Ncl. n. facialis und Ncl. n. hypoglossi sollen dies verdeutlichen. Die topographische Organisation des Ncl. n. facialis spiegelt sowohl die Ursprungszellen für die spezifischen Äste des N. facialis (Semba & Egger 1986) als auch die Darstellung der einzelnen Gesichtsmuskeln wider (Friauf & Herbert 1985). Diese Unterschiede beruhen auf der Tatsache, dass beim N. facialis sowohl ein einzelner Muskel

durch multiple Innervationen verschiedener Nervenäste als auch die Innervation von verschiedenen Muskeln durch einen einzigen Nervenast versorgt werden (Watson *et al.* 1982). So innervieren die Motoneurone der lateralen Untereinheit den nasalen Bereich, die der intermediären Untereinheit den perioralen und orbitalen Bereich und die der medialen Untereinheit das Ohr und den Hals. Der Ncl. n. hypoglossi besteht in der dorsoventralen Ebene aus mehreren längs gerichteten, aufeinander geschichteten Zell-Säulen (Uemurasumi *et al.* 1988), welche bezüglich der intrinsischen und extrinsischen Muskulatur eine myotopische Aufteilung zeigen. Bezogen auf die HCN4-Kanalproteine wurden in den somatomotorischen Kernen keine myotopischen Unterschiede in der Verteilung gefunden. Die besonders intensive IR der Motoneurone, einschließlich die des Rückenmarkes, deutet auf einen besonderen Einfluss des HCN4-Kanals auf die Funktion einzelner Motoneurone oder des gesamten motorischen Systems hin. Welchen genauen Einfluss sie haben, gilt es näher zu erforschen. Es gilt zusätzlich herauszufinden, warum vorherrschend mRNA von HCN1 und HCN2 Untereinheiten und hingegen nur wenig HCN4 mRNA in Motoneuronen zu finden sind (Monteggia *et al.* 2000, Santoro *et al.* 2000, Sioris *et al.* 2002). Des Weiteren wäre es aufschlussreich herauszufinden, warum HCN4-IP punktähnliche Verdichtungen vor allem in Motoneuronen zu finden sind und ob es aufgrund dieser Verdichtungen der HCN4-Kanalproteine zu funktionellen Konsequenzen in den Motoneuronen kommt.

Dahingegen findet man in den somatosensiblen Kernen, Ncl. sensorii n. trigemini principalis (Pr5) und Ncl. vestibularis, nicht in allen Unterbereichen IP-Neurone. Die Rezeptoren für das sensorische trigeminale System befinden sich in der Gesichtshaut, der Mucosa von Mund und Nase, und im subcutanen Gewebe wie Bindegewebe, Muskeln und Sehnen des Gesichtes. Zusätzlich erhalten Zähne, Zunge, Conjunctiva, Cornea und die Vibrissen eine sensorische trigeminale Innervation. Abhängig von ihrer Lokalisation werden die Rezeptoren von einem der drei Äste des N. trigeminus ( $V_I$  - N. ophthalmicus,  $V_{II}$  - N. maxillaris,  $V_{III}$  - N. mandibularis) innerviert. Die Skizze 3.4 gibt einen Überblick über die somatotope Organisation des Ncl. sensorii n. trigemini principalis bezüglich der drei Äste des N. trigeminus. Im Pr5 im Bereich des N. ophthalmicus wurden keine HCN4-IP Zellen gefunden. Der Pr5 Kern enthält eine hohe Dichte an mittleren und kleinen Neuronen, davon beinhalten viele Parvalbumin (Bennett-Clarke *et al.* 1992) oder GABA (Haring *et al.* 1990). Zusätzlich gibt es wenige große Neuronen, welche vor allem dorsal gelegen sind. Davon zeigen einige eine Immunreaktivität mit Calbindin (Bennett-Clarke *et al.* 1992). Diese cytoarchitektonischen Unterschiede machen es notwendig weitere Untersuchungen durchzuführen, um genau herauszufinden, welche von diesen Zellen HCN4-IP sind und

welche Aufgaben die HCN-Kanäle dort haben. Wichtig ist es zu klären, warum in  $V_1$  keine IP-Neurone zu finden sind. Auch im Ncl. vestibularis wurden z.B. nur in der Pars medialis IP-Neurone gefunden, hingegen wurden in der Pars lateralis, spinalis und superioris keine HCN4-Kanalproteine gefunden. Eine HCN4 mRNA Expression in dieser Region wurde sowohl von Santoro und Mitarbeitern (2000) als auch von Monteggia und Mitarbeitern (2000) mit unterschiedlichen Expressionsraten angegeben (siehe Kapitel 6.1). Abweichungen können durch die verschiedenen Protokolle erklärt werden. Außerdem könnten die Unterschiede durch die subjektive Bewertung der Intensität in den verschiedenen publizierten Arbeiten, wie auch in der vorliegenden Arbeit, auftreten. Notomi und Shigemoto (2004) haben in allen Unterbereichen des Ncl. vestibularis HCN4-Kanalproteine gefunden. Insgesamt können für alle Regionen unterschiedliche Ergebnisse dadurch entstehen, dass verschiedene Methoden durchgeführt wurden. So kann es sein, dass eine Zelle unterschiedliche Transkriptions- (mRNA) und Translationsraten (Proteine) besitzt. Des Weiteren wurden unterschiedliche Antikörper verwendet. So benutzen Notomi und Shigemoto (2004) einen in Meerschweichen hergestellten polyklonalen Antikörper gegen den C-Terminus von rHCN4 (1114-1198). Dadurch, dass der Antikörper gegen eine andere AS-Sequenz gerichtet ist als der von uns verwendete AK (1048 - 1083 des hHCN4-Proteins), könnte dies eine Abweichungen in der Antikörperbindungswirksamkeit darstellen und somit unterschiedliche Ergebnisse liefern. Zusätzlich bewertet Notomi und Shigemoto (2004) die Intensität der IR im Neuropil.

Neuhoff und ihre Mitarbeiter (2002) haben in Calbindin-positiven und Calbindin-negativen dopaminergen Neuronen der Substantia nigra und Area tegmentalis ventralis unterschiedliche  $I_h$ -Strom-Eigenschaften gemessen. Eine mögliche Ursache dafür könnte eine unterschiedliche Verteilung der vier HCN-Untereinheiten in den verschiedenen Zellen sein. Die Funktion von Calbindin in dopaminergen Neuronen ist bisher noch unbekannt, so scheinen aber Calbindin-positive dopaminerge Neurone gegenüber ihrer Degeneration bei der Parkinsonschen Erkrankung weniger gefährdet zu sein.

Um eine genaue Zuordnung und Klassifikation der HCN4-IP Neuronen anfertigen zu können ist eine Einteilung allein basierend auf dem immunhistochemischen Reaktionsmuster mit Form, Größe und dendritischer Verästelung sehr schwer bis unmöglich. Der Vergleich mit deskriptiven Veröffentlichungen ist aber hilfreich, um dies eingrenzen zu können. Elektrophysiologische Untersuchungen, in denen  $I_h$ -Ströme nachgewiesen wurden, lassen meistens leider keine genaue Zuordnung der einzelnen HCN-Untereinheiten zu. Werden diese Daten mit dem Verteilungsmuster des HCN4-Kanalproteins (bzw. den anderen HCN-Untereinheiten) kombiniert, so lassen sich weitere Schlussfolgerungen z. B. über mögliche

Funktionen des HCN4-Kanals in den verschiedenen Zellen, Kerngebieten oder Systemen aufstellen.

Anbei folgen einige solcher Beispiele:

Im Ncl. geniculatum laterale dorsale (DLG) wurden zwei Typen von Neuronen beschrieben. Erstens: Die Klasse A-Neurone mit runden bis ovalen Perikarya ( $\varnothing$  15-25  $\mu$ m) und einer multipolaren dendritischen Verästelung mit drei bis acht Hauptästen mit jeweils zwei oder drei Nebendendriten. Zweitens: Die kleineren Klasse B-Neurone (Golgi Typ II) mit einem ei- oder spindelförmigen Zellkörper ( $\varnothing$  10  $\mu$ m), welche sich meist im lateralen Bereich des DLGs befinden (Gabott *et al.* 1988, Webster & Rowe 1984). Die Form und Größe der HCN4-IP Neuronen lassen die Vermutung zu, dass es sich um die Klasse A-Neurone handelt.

Bei der Mehrheit der Neuronen des Ncl. supraopticus handelt es sich um magnocelluläre, neurosekretorische Zellen, welche entweder Vasopressin oder Oxytocin produzieren. Zusätzlich befindet sich im Ncl. supraopticus eine sehr kleine Population von Interneuronen. Beide Bereiche, SO und SOR, haben Efferenzen zur Neurohypophyse (Hypothalamo-Neurohypophysäres System). Dieses Hypothalamo-Neurohypophysäres System dient der Antwort auf eine Vielzahl von Stimuli, wie die Laktation, Nausea, Dilatation des Magens, Störungen im Wasserhaushalt und dem Blutdruck. Aufgrund der Vielzahl an IP-Neuronen des Ncl. supraopticus liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den positiven Neuronen um höchstwahrscheinlich magnocelluläre, neurosekretorische Zellen handelt und dass der HCN4-Kanal einen möglichen Einfluss auf die zuvor beschriebenen Funktionen haben könnte.

Der Ncl. paraventricularis hypothalami hat eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Blutdrucks und der Körperflüssigkeitshomöostase. Er wird morphologisch in einen parvocellulären und einem magnocellulären Teil unterteilt. Wie im Ncl. supraopticus sind die magnocellulären Neurone verantwortlich für die Hypophysenhinterlappen-Sekretion von Vasopressin oder Oxytocin. Während in Typ I-Neuronen kein  $I_h$ -Strom gemessen wurde, wiesen 59% von Typ II-Neuronen  $I_h$ -Ströme mit langsamen kinetischen Eigenschaften auf, wie sie bei HCN2-, HCN3- oder HCN4-Kanäle zu finden sind (Egli *et al.* 2002).

Die Neurone des Ncl. ruber wurden von Reid und seinen Mitarbeitern (1975a, 1975b) anhand ihrer Größe unterteilt: in Riesenzellen (mit einem Durchmesser der Soma  $>40$   $\mu$ m), große ( $\varnothing$  26 - 40  $\mu$ m), mittlere ( $\varnothing$  20 - 25  $\mu$ m) und kleine Zellen ( $\varnothing <20$   $\mu$ m). Bezogen auf diese rein deskriptive Einteilung der Neuronenpopulationen des Ncl. ruber könnte es sich bei den HCN4-IP Neuronen um die großen Neuronen ( $\varnothing$  26 - 40  $\mu$ m) handeln. Neuere Unterteilungen der Zellpopulationen wurden z.B. anhand der Nisselkörperchen mit Aufteilung in drei



Gruppen durchgeführt: grob- bzw. feinkörnigen Nisselkörperchen oder achromatischen Neuronen (Strominger *et al.* 1987). Andererseits wurden zwei unterschiedliche Neuronenarten anhand der Zellkernposition und des Zellplasma-Zellkern-Verhältnisses unterschieden: *parvocelluläre Neuronen* - relativ kleine, ovale, mit exzentrisch liegendem Nucleus und einem großen Zellplasma-Zellkern-Verhältnis und *magnocelluläre Neuronen* - große, abgerundete mit einem zentral liegenden Zellkern und einem kleinen Zellplasma-Zellkern-Verhältnis (Tucker *et al.* 1989). Diese Unterteilungen lassen ohne weitere Erforschungen keine Zuordnung mehr für HCN4-IP Neuronen zu.

Die HCN4-positiven Neurone im Ncl. dorsalis n. vagi hatten innerhalb des Kerns eine ähnliche Verteilung wie die von Travagli und Gillis (1994) beschriebenen  $I_h$ -positiven Neuronen, gelegen in rostral-caudaler Richtung rostral zum Obex und in medio-lateraler Richtung medial.

Sowohl die Daten aus dieser Arbeit als auch Daten anderer Forschungsgruppen zeigten, dass die mRNA- und Protein Expression von HCN4 und den anderen HCN-Untereinheiten im Ncl. n. hypoglossi zu finden sind (Santoro *et al.* 2000, Monteggia *et al.* 2000, Notomi & Shigemoto 2004). Da altersabhängige Unterschiede der elektrophysiologischen Eigenschaften von  $I_h$ -Strömen in den Motoneuronen des Ncl. XII aufgezeigt worden sind (Bayliss *et al.* 1994), sollten mögliche Änderungen in der Verteilung der einzelnen HCN-Untereinheiten während der Entwicklung untersucht werden. Des Weiteren bleibt die Frage offen, welche Funktion der  $I_h$ -Strom im Ncl. n. hypoglossi besitzt, da die Schlussfolgerung gezogen wurde, dass der  $I_h$ -Strom zur Erzeugung des respiratorischen Rhythmus nicht beiträgt (Mironov *et al.* 2000).

Richtet man seinen Blick nicht nur auf die Lokalisation der HCN4-Kanäle in der zellulären Ebene, sondern auf die Systeme, so fällt auf, dass HCN4 im motorischen System sehr stark vertreten ist (siehe oben). Darüber hinaus wurden HCN4-Kanalproteine in allen Kerngebieten des akustischen System gefunden, zu welchem die Ncll. cochlearis, die Oliva superior, der Ncl. corporis trapezoidei, die Ncll. lemnisci lateralis, der Colliculus inferior, das Corpus geniculatum mediale und der akustische Cortex gehören.

Durch elektrophysiologische Versuche am Corpus geniculatum mediale wurden  $I_h$ -Ströme in Neuronen des MGV gemessen. Es wird angenommen, dass  $I_h$  zuständig für die Umwandlung von akustischen Input-Signalen auf dem Weg vom Colliculus inferior zum akustischen Cortex ist (Tennigkeit *et al.* 1999) bzw. verantwortlich für die Kodierung akustischer Signale durch verschiedene Sequenzen von Aktionspotentialen (Tennigkeit *et al.* 1996) ist.

Im dorsalen Unterbereich der Ncll. lemnisci lateralis (DLL) werden von Bajo und seinen Mitarbeitern (1993) vier Typen von Neuronen beschrieben. Typ-I-Neurone sind groß, multipolar, haben reichlich Cytoplasma und weisen nach Nissl-Färbung eine dunkel gefärbte Nissel-Substanz auf. Typ-II-Neurone sind große, bipolare Zellen mit dunkel gefärbter Nissel-Substanz. Typ-III-Neurone sind mittelgroß und haben ein rundes bis ovales Soma. Typ-IV-Neurone sind klein und haben kaum Cytoplasma. Ein Großteil der HCN4-IP Neuronen im DLL sind vermutlich Typ-III-Neuronen, während die wenigen bipolaren HCN4-positiven Neuronen höchstwahrscheinlich zu der Klasse der Typ-II-Neuronen gehören. Es wird vermutet, dass der DLL eine wichtige Rolle in der binauralen Verarbeitung und in der Lokalisation von Geräuschen spielt (Aitkin *et al.* 1970, Brugge *et al.* 1970, Fu *et al.* 1997), so dass auch hier die Vermutung nahe liegt, dass HCN4 einen möglichen Einfluss auf diese Funktionen hat.

Aufgrund der Form und der Größe könnte es sich bei den IP-Neuronen der Oliva superior lateralis (LSO) um die von Adam und seinen Mitarbeitern (1999) beschriebenen „Chopper“ Neurone handeln. Die „Chopper“ Neurone sind große, spindelförmige Neurone mit einer bipolaren dendritischen Aufteilung/Verteilung, welche sich senkrecht zur Krümmung des LSO orientiert. In diesen Neuronen wurde ein  $I_h$ -Strom gemessen. Der superiore Oliva-Komplex (SOC) verarbeitet binaurale Informationen, welche wichtig für die Lokalisation von Geräuschen sind (Banks *et al.* 1993), wobei die Neurone des MSO sensitiv für Signale mit niedriger Frequenz und die Neuronen des LSO sensitiv für akustische Signale mit hoher Frequenz sind.

### **4.3 Co-Lokalisation der HCN-Kanäle**

Bei der Identifikation und Klonierung des HCN-Gens wurden in Säugetieren vier verschiedene Isoformen entdeckt (siehe Kapitel 1.2). Unter heterologer Expression wurden homooligomere Kanäle mit unterschiedlichen elektrophysiologischen Eigenschaften gebildet. Dabei zeigten diese einzelnen Kanäle unterschiedliche Aktivierungsgeschwindigkeiten und unterschiedliche Modulationen durch cAMP (siehe Kapitel 1.6). Eine große Anzahl an Patch-Clamp Untersuchungen zeigten in den verschiedenen Regionen des Gehirnes und anderen Geweben native  $I_h$ -Ströme mit unterschiedlichen Eigenschaften auf. Es sollte jedoch festgehalten werden, dass die Aktivierungszeitkonstanten durch experimentelle Parameter, wie Membranpotential, ionisches Milieu, Impulsdauer, cAMP Konzentration, pH-Wert oder Temperatur stark beeinflusst werden (siehe Kapitel 1.5). Diese intrinsische Sensitivität könnte einerseits die Variabilität an Aktivierungszeitkonstanten der verschiedenen Forschungslaboratorien erklären. Da die Ströme in der Vergangenheit unter signifikant verschiedenen Konditionen erforscht worden sind, ist es sehr schwierig einen genauen Vergleich zwischen den geklonten und den nativen Kanälen durchzuführen.

Zum Teil sind elektrophysiologische Unterschiede weiterhin damit zu erklären, dass die HCN1-4 Isoformen ein unterschiedliches Verteilungsmuster zeigen, wie RT-PCR, *In situ* Hybridisierung, Western Blots und immunologische Lokalisation gezeigt haben (Santoro *et al.* 2000, Moosmang *et al.* 1999, Monteggia *et al.* 2000, Notomi & Shigemoto 2004, Koch *et al.* 2004, Franz *et al.* 2000 und die HCN1-4 Daten unserer Forschungsgruppe). So wurden bei WB-Analysen in der Rattenretina alle vier HCN-Isoformen detektiert. Die anschließenden immunologischen Untersuchungen zeigten auf zellulärer Ebene, dass die verschiedenen HCN1-4 Kanäle in unterschiedlichen Zelltypen vorkommen. Die jeweiligen nativen  $I_h$ -Ströme zeigten mit denen in HEK 293 Zellen entsprechende homooligomere exprimierten Kanäle keine signifikanten Unterschiede. Nur in Typ 5 bipolaren Zellen kam es zu einer Überlagerung von HCN4 und HCN1. Diese bildeten dort unabhängig von einander homooligomere Kanalpopulationen (80% HCN1 und 20% HCN4), denn der HCN-Strom dieser Zellen konnte durch die Bildung der algebraischen Summe reproduziert werden. Diese ganzen Beobachtungen legten den Verdacht nahe, dass keine heterooligomeren Kanäle in der Retina von Ratten und Mäusen existieren (Müller *et al.* 2003).

Einzelzell-RT-mPCR zeigten, dass die mRNA von HCN2-4 zusammen in dopaminergen SNR-, thalamocorticalen Relay Neuronen, neocorticalen Schicht V- und hippocampalen CA1 Pyramidenzellen vorkommen. Die mRNA von HCN1 kommt hingegen nur in neocorticalen Schicht V- und hippocampalen CA1-Pyramidenzellen vor. Durch den Vergleich der elektrophysiologischen Daten dieser Zellen untereinander konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass es eine Korrelation zwischen HCN1 mRNA und einem Phänotyp mit schnellerer Aktivierungsgeschwindigkeit und die Abwesenheit vom HCN1-Signal mit einem Phänotyp mit langsamerer Aktivierungsgeschwindigkeit gibt (Franz et al 2000).

Andererseits zeigte sich in anderen Regionen keine Übereinstimmung bezüglich der elektrophysiologischen Eigenschaften von gemessenen nativen  $I_h$ -Strömen und rekombinanten Kanälen (Santoro *et al.* 2000, Moroni *et al.* 2001). Aus der Analogie zu den  $K^+$ -Kanälen vom Shaker-typ und CNG-Kanälen wird vermutet, dass vier Untereinheiten einen Kanal bilden (Biel *et al.* 1999, Kaupp & Seifert 2001). Weiterhin gilt für die  $K^+$ -Kanäle, dass aus verschiedenen Untereinheiten heterooligomere Kanäle gebildet werden können (Yellen 2002). So liegt die Vermutung nahe, dass auch die HCN-Kanäle zum Teil heterooligomer vorkommen. Die Bildung heterooligomerer Kanäle durch die verschiedenen HCN-Isoformen könnte eine weitere Erklärung für die Variabilität der Eigenschaften von nativen  $I_h$ -Strömen sein. So wurde durch die Co-Expression von HCN1 und HCN2 in *Xenopus*-Oozyten gezeigt, dass heterooligomere HCN-Kanäle *in vitro* gebildet werden können. Diese neuen, heterooligomeren HCN-Kanäle generierten einen  $I_h$ -Strom mit neuen kinetischen und ionischen Eigenschaften, welche mathematisch nicht zu erklären waren. So befanden sich die neuen Aktivierungsgeschwindigkeiten zwischen denen der HCN1 und HCN2 homooligomeren Kanäle (Chen S. *et al.* 2001). Sehr ähnliche, aber nicht gleiche Ergebnisse lieferte die Expression von Tandem-Heterodimeren von HCN1-HCN2 in *Xenopus*-Oozyten (Ulens & Tytgat 2001). Durch die künstliche, vorgegebene Verknüpfung der COOH- und NH<sub>2</sub>-Termini verschiedener Untereinheiten wurden die Tandem-Dimere zur Co-Assemblierung forciert und Kanäle mit geänderten Eigenschaften erzeugt. Andererseits kann die eigenständige Co-Expression von verschiedenen Untereinheiten die Stöchiometrie jedoch nicht erzwingen, folglich können multiple Populationen von Kanälen entstehen. In einer weiteren Studie wurden drei verschiedene  $I_h$ -Ströme aus HEK 293 Zellen verglichen mit nativen  $I_h$ -Strömen aus dem Sinusknoten, welcher HCN1 und HCN4 co-exprimiert. Die HEK 293 Zellen wurden entweder mit einzelnen HCN4+HCN1 Untereinheiten co-transfiziert oder mit verknüpften HCN4-HCN1 (4-1)- oder HCN1-HCN4 (1-4)-Tandems transfiziert. Die Aktivierungsgeschwindigkeit des „4-1 Tandem“-Kanals war signifikant höher als diejenige

vom co-transfizierten HCN1+HCN4-Kanal, jedoch immer noch geringer als diejenige von nativen  $I_h$ -Kanälen aus dem Sinusknoten. Andererseits ähnelte die Modulation durch cAMP des co-transfizierten „HCN1+HCN4“-Kanals und „1-4 Tandem“-Kanals dem nativen  $I_h$ -Kanal mehr als die des „4-1 Tandem“-Kanals. Insgesamt befanden sich diese kinetischen Eigenschaften zwischen den ermittelten Eigenschaften von homomeren HCN1- und HCN4-Kanälen (Altomare *et al.* 2003). Des Weiteren wurde gezeigt, dass mit Ausnahme von HCN2/HCN3 dimerische Kombinationen von HCN-Kanal-Isoformen in der Plasmamembran von HEK 293 Zellen zu finden sind (Much *et al.* 2003).

Die HCN-Kanäle könnten andererseits zu ihrer Bildung zusätzlich andere Untereinheiten miteinbeziehen. Die Co-Expression von MIRP1 (MinK Related Peptide1) mit HCN1 oder HCN2 zeigten Veränderungen in der Aktivierungs- / Deaktivierungskinetik, so dass die Gegenwart dieser  $\beta$ -Untereinheit zur Kinetikvielfalt von HCN-Kanälen beiträgt (Yu *et al.* 2001). Die Co-Expression von MIRP1 sowohl mit HCN4 als auch mit HCN4-HCN1-Tandem zeigten hingegen keine substantiellen Effekte auf die kinetischen Eigenschaften der Kanäle (Altomare *et al.* 2003). Des Weiteren zeigte auch die Co-Expression von MIRP1 (=KCNE2) mit HCN4 in *Xenopus*-Oozyten und in chinesischen Hamstereizellen eine Erhöhung der Stromamplitude, eine Verlangsamung der Aktivierungsgeschwindigkeit. Diese verlagerte die Spannung für die halb-maximale Offenwahrscheinlichkeit ( $V_{1/2}$ ) zur negativeren Spannung. Auch hier unterschied sich  $V_{1/2 \text{ act.}}$  von heteromeren HCN4/KCNE2-Strömen immer noch von nativen  $I_h$ -Strömen (Decher *et al.* 2003). Für diese beobachteten Unterschiede gibt es bisher noch keine Erklärungen. Es könnte sein, dass die Co-Expression von anderen, noch unbekanntem Untereinheiten oder Proteinen eine weitere Rolle spielt. So tragen Verbände aus Gerüstproteinen zu Verteilung, Transport und Anhäufung von Ionenkanälen bei, ebenso wie die Kopplung von Ionenkanälen zu intrazellulären Signalkaskaden (Garner *et al.* 2000, Sheng & Sala 2001, Kimura *et al.* 2004)

Des Weiteren können Neuromodulatoren die HCN-Kanalaktivität durch cAMP- oder cGMP Signalwege modellieren. So könnte z.B. wie die von Müller und seinen Mitarbeitern (2003) gezeigte Colokalisation von Dopamin-D1-Rezeptor mit HCN4 in manchen, aber nicht allen bipolaren Zelltypen zur Kinetikvielfalt beitragen.

#### **4.4 Channelopathien**

Ein Ausfall oder Fehlfunktionen unterschiedlicher Ionenkanäle rufen eine Reihe von Krankheiten (so genannte Channelopathien) hervor oder werden dadurch beeinflusst (siehe z.B. Review von Fontaine *et al.* 1997 oder Lehmann-Horn & Jurkat-Rott 1999). Die HCN-Ionenkanäle sind an der Regulierung des Ruhemembranpotentials beteiligt, haben eine wichtige Funktion in der Generierung rhythmischer Schrittmacher-Aktivität, in der Integration synaptischer Signale, Beeinflussung des Entladungsmusters etc. (siehe Kapitel 1.7). So liegt die Frage nahe, ob auch die HCN-Kanäle eine Rolle in der Bildung oder Beeinflussung von Krankheiten spielen wie z.B. Herzrhythmusstörungen, Epilepsie oder anderen Erkrankungen (Parkinson, Schizophrenie, Ataxien, Inkontinenz etc.).

Während der embryonalen und postnatalen Entwicklung finden tiefgreifende Veränderungen in der Erregbarkeit von Zellen statt, einschließlich der Modifikation in der Verteilung, Eigenschaft, Dichte und Art zahlreicher Ionenkanäle, einschließlich der HCN-Kanäle (Bender *et al.* 2001, Qu & Robinson 2004, Russier *et al.* 2003, Bayliss *et al.* 1994, Robinson *et al.* 1997, Zhou & Hablitz 1996, Sciancalepore & Constanti 1998, Chevaleyre *et al.* 2001). Diese Veränderungen in der Entwicklung lassen vermuten, dass es auch unter manchen Erkrankungen zu den zuvor genannten Modifikationen kommen könnte.

Bei der kongestiven (dilatativen) Herzinsuffizienz (CHF) vermindern sich die HCN-Expression von mRNA- und der Proteinspiegel im Sinusknoten signifikant (HCN2 bis zu 78% und 82%; HCN4 42% und 77%). Im rechten Vorhof (RA) hingegen bleibt die HCN2-Expression unverändert, aber für HCN4 kommt es durch die CHF zu einer signifikanten Up-Regulation (bis zu 209%). Die HCN Down-Regulation im Sinusknoten könnte zu den Sinusknotendysfunktionen führen und die Up-Regulation im RA eine wahrscheinliche Prädisposition für die Bildung von ektopischen Impulsen beinhalten (Zicha *et al.* 2005). Weitere Studien haben gezeigt, dass es unter Herzinsuffizienz, Hypertrophie und Vorhofflimmern zu einer Erhöhung der  $I_h$ -Strom Dichte und/oder des mRNA-Spiegels kommt (Hoppe *et al.* 1998, Cerbai E *et al.* 1997, Cerbai E *et al.* 2001). Des Weiteren wurden bei zwei Patienten mit Sinusknotendysfunktion unterschiedliche Mutationen auf dem HCN4-Gen gefunden. Ein Gendefekt führte zu einer Schädigung der Transportfunktion des HCN4-Kanals, welche zu einer Verminderung der Plasmamembran-Expression, assoziiert mit einem Abfall des  $I_h$ -Stroms, führte (Ueda *et al.* 2004). Bei der anderen Genmutation blieb die intrazelluläre Transportfunktion erhalten, dafür blieb der Kanal insensitive für erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel (Schulze-Bahr *et al.* 2003).

Die HCN-Kanäle haben eine Schlüsselfunktion in der Steuerung neuronaler Erregung und Hemmung auf der Ebene einzelner Zellen oder eines gesamten Netzwerksystems. Eine Erkrankung, welche auf eine gestörte Balance zwischen Erregung und Hemmung der Nervenzellen im Gehirn zurückgeht, ist die Epilepsie. Neue Hinweise deuten darauf hin, dass  $I_h$  im Zusammenhang mit mehreren Abläufen steht, welche zum hypererregbaren Zustand beitragen können (Chen K. *et al.* 2001, Luthi & McCormick 1999, Mellor *et al.* 2002) und damit die Möglichkeit erhöhen, dass spezifische HCN-Kanal-Modulatoren epileptische Anfälle steuern könnten (Chen K. *et al.* 2002). Es wurden Überexpressionen für Temporallappen-Epilepsien (HCN1) und febrile Anfälle (HCN2) berichtet (Bender *et al.* 2003, Chen K *et al.* 2001, Brewster *et al.* 2002). Andererseits haben Tiermodelle mit Absencen (WAG/Rij Ratten - Wistar Albino Glaxo aus Rijswijk) gezeigt, dass es in neocorticalen und hippocampalen Neuronen zu einer Verringerung des HCN1-Proteins (34%) kommt, dies aber nicht zu einer Verringerung der mRNA-Expression führt. HCN2-4 zeigten hingegen keine Veränderungen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es entweder zu einer post-transkriptionalen oder zu einer post-translationalen Störung kommt, welche die Menge oder Lokalisation des HCN1-Proteins beeinflusst. Knock-out Mäuse für HCN2 entwickelten Absencen und Sinus-Rhythmusstörungen (Ludwig *et al.* 2003).

Vergleicht man weiterhin experimentelle Beeinflussungen, so zeigen Tetanus, Hypoxämie, febrile Anfälle, paroxysmale Entladungen, Stargazer neocortex, inflammatorische und neuropathische Schmerzen eine Steigerung der HCN-Kanal-Aktivität (Chen K. *et al.* 2001, Mellor *et al.* 2002, Erdemli & Crunelli 1998, Dalle *et al.* 2001, Chaplan *et al.* 2003, Kitayama *et al.* 2001, DiPasquale *et al.* 1997). Während andere, wie z.B. Denervation, diabetische Neuropathie, Axotomie, Herpes simplex-Virus-Infektionen sowie Absencen eine Minderung zur Folge haben (Brauer *et al.* 2001, Mayer *et al.* 1986, Abdulla & Smith 2001, Horn *et al.* 1996, Strauss U *et al.* 2004).

Das Interesse an therapeutischen Mitteln, welche einen Einfluss auf die HCN-Kanäle haben oder haben könnten, hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Man erhofft sich neue Möglichkeiten einer Therapie oder zumindest einen besseren Einblick in die Funktion des HCN-Kanals zu bekommen. So wurden Medikamente (detaillierte Auflistung siehe im Anhang 6.2) an unterschiedlichen Zellpopulationen des Gehirns, des Herzens oder anderen Geweben getestet.

Die reziproken Interaktionen zwischen neuronalen Aktivitäten und HCN-Kanälen deuten an, dass diese Ionen-Kanäle ein sehr vielversprechendes Ziel für antiepileptische Therapien sind.

Welche sind aber die Eigenschaften eines idealen HCN-Kanal-Modulators, der rezidivierende epileptische Anfälle verhindern könnte? Sollte der HCN-Kanal während eines epileptischen Anfalls verstärkt oder blockiert werden? Es ist möglich, dass die verschiedenen Arten von Anfällen unterschiedlich auf die Modulation von  $I_h$ -Strömen antworten könnten und über unterschiedliche Wege gestoppt werden. So könnte zum Beispiel einerseits die Steigerung des  $I_h$ -Stroms helfen die Krampfanfall-Aktivität im Thalamus zu beenden, andererseits verhindert ein Anstieg des  $I_h$ -Stroms, dass die niederschweligen  $Ca^{2+}$ -Kanäle krampfanfallähnliche rhythmische Salven-Aktivität erzeugen können (Luthi & McCormick 1999). Sogar innerhalb desselben Netzwerkes gibt es Beispiele für rezidivierende Feuerstöße, welche entweder durch Blockierung oder durch Steigerung des  $I_h$ -Stroms gestoppt wurden (Soltesz *et al.* 1991). Trotzdem scheint die Idee der Entwicklung einer neuen Therapieform durch  $I_h$ -Hemmer in der Behandlung von epileptischen Erkrankungen eine große Hoffnung zu schüren (Kitayama *et al.* 2003, Arias & Bowlby 2005, Gill *et al.* 2006).

Da die epileptische neuronale Hypererregbarkeit den ektopischen Entladungen neuropathischer Schmerzen ähnelt, werden antiepileptische Medikamente auch in der Therapie von neuropathischen Schmerzen angewendet (Attal 2001, Jensen 2002, Tremont-Lukats *et al.* 2000). Bei neuropathischen Schmerzen, sowohl bei der Allodynie als auch beim Spontanschmerz, wurde beobachtet, dass es zu einer Überexpression insbesondere der HCN1-Kanäle in primär afferenten Somata von Ratten kommt. Der spezifische HCN-Blocker ZD7288 kehrte, bei systemischer Verabreichung, die anormale Hypersensitivität gegenüber den leichten Berührungen (Allodynie) um und senkte die Feuerungsfrequenz von ektopischen Entladungen (Chaplan *et al.* 2003), während eine lokale Gabe des ZD7288 in die Haut zu einer kompletten Unterdrückung der Allodynie führte (Luo *et al.* 2007). Bisher ist aber noch nicht eindeutig, ob die Hauptwirkung von ZD7288 prä- oder postsynaptischen Ursprungs ist und ob die Reaktion durch Interneurone oder durch Hauptzellen vermittelt wird, so dass weitere experimentelle Untersuchungen nötig sind.

Weiterhin wäre es aufschlussreich, die Wirkung von  $I_h$ -Strom-Hemmern, solche wie Zatebridin und Ivabradin, auf supraventriculäre Tachyarrhythmien assoziiert mit CHF zu untersuchen. Jedoch sollte erhöhte Vorsicht geboten sein, da die HCN-Down-Regulierung im Sinusknoten das Risiko einer exzessiven bradykarden Antwort beinhaltet.

Neue experimentelle Therapiemethoden in der Kardiologie befassen sich mit der Bildung eines biologischen Schrittmachers durch Gentherapie, sei es über eine direkte Implantation eines Vektors oder über ein Liefersystem durch humane mesenchymale Stammzellen (Qu *et al.* 2003, Plotnikov *et al.* 2004, Potapova *et al.* 2004).



### **5. Zusammenfassung**

Seit der Entdeckung des  $I_h$ -Stromes in den späten 70ern und der Identifizierung und Klonierung vier verschiedener HCN-Gene fast 20 Jahre später hat das Interesse an der Erforschung dieser Ionenkanäle drastisch zugenommen. Die HCN-Kanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Generierung von rhythmisch elektrischer Aktivität, sowohl im Herzen als auch in bestimmten Regionen des zentralen Nervensystems. In anderen Gehirnregionen, die keine rhythmische Aktivität besitzen, weisen diese Kanäle eine Beteiligung an einer Vielfalt anderer wichtiger Funktionen auf, wie z.B. der Regulierung des Ruhemembranpotentials, der Synchronisation neuronaler Aktivitäten oder der Kontrolle der synaptischen Transmission. Die HCN1-4 Kanäle werden im Gehirn und im Herzen in unterschiedlichem Maße exprimiert und zeigen ein jeweils spezifisches Verteilungsmuster auf.

Um das Verteilungsmuster des HCN4-Kanalproteins im zentralen Nervensystem wiedergeben zu können, musste ein spezifischer Antikörper hergestellt und ein für diesen geeignetes immunhistochemisches Versuchsprotokoll entwickelt werden. Vier monoklonale und vier polyklonale Antikörper gegen den C-Terminus des HCN4-Kanalproteins wurden bereitgestellt. Die Epitop-Charakterisierung zeigte für jeden der getesteten Antikörper die jeweils spezifische Epitop-Region auf. Anschließend wurde eine Homologiesuche für die Aminosäure-Sequenz der jeweiligen Epitope durchgeführt. Diese zeigten, dass das jeweils untersuchte Epitop mit Aminosäure-Sequenzen anderer Proteine keine Übereinstimmung besitzt oder dass Proteine mit ähnlichen Aminosäure-Sequenzen nicht im Gehirn von Nagetieren vorkommen. Die immunhistochemischen Reaktionen der verschiedenen Antikörper wurden untereinander verglichen, sowohl in Ratten, als auch in Mäusen, Hamstern und Meerschweinchen. Das Verteilungsmuster der verschiedenen Antikörper war gleich, aber die besten immunhistochemischen Ergebnisse lieferte der SHG-1E5 Antikörper. Ein in der Zwischenzeit käuflich erwerblicher Antikörper der Firma Alomone (APC-052) wurde zur Überprüfung der Spezifität des SHG-1E5 Antikörper hinzugezogen. Insgesamt haben die Versuche aus dem ersten Teil dieser Arbeit - die Antikörper-Charakterisierung - die Spezifität des monoklonalen SHG-1E5 Antikörpers gegen das HCN4-Kanalprotein aufgezeigt. Dadurch konnte die spezifische Verteilungscharakteristik des HCN4-Kanalproteins im Gehirn und Rückenmark von Ratten untersucht werden.

HCN4 kommt in einer Vielzahl von Gehirnregionen vor und weist dort unterschiedliche Intensitäten auf. In Bereichen des Thalamus, Epithalamus, Hypothalamus, Cerebellum, Medulla spinalis und in allen somatomotorischen Kernen besitzen die HCN4-Kanalproteine ein ausgeprägtes bis sehr ausgeprägtes Vorkommen. Des Weiteren sind HCN4-Kanalproteine in allen Kerngebieten des akustischen Systems in unterschiedlicher Intensität zu finden. HCN4 immunopositive Reaktionen sind vor allem im Soma und in proximalen Dendriten zu finden. In einigen Regionen, wie z.B. Ncl. praeopticus medialis, Ncl. paraventricularis, Ncl. n. oculomotorius, Ncl. n. abducentis, Ncl. n. facialis, Ncl. ambiguus oder Ncl. praepositus hypoglossi, sind an den Perikaryen der HCN4 positiven Neuronen immunopositive punktförmige Verdichtungen deutlich sichtbar. Je nach Lokalisation dieser (Plasmamembran oder Cytoplasma) könnte es sich um gruppierte Rezeptorkomplexe oder um Transportvesikel handeln.

**6.1 Vergleich der Ergebnisse mit veröffentlichten Daten****Telencephalon**

Isocortex	IHC		In-Situ-Hybridisierung		
	1	2	3	4	5
Cortex*			2	+/-	+/-
Lamina 1	0	0			
Lamina 2	2	1			
Lamina 3	2	1			
Lamina 4	1	0			
Lamina 5	1-2	0			
Lamina 6	1	0			
Corpus callosum	0		0		

**Archipallium****Archicortex**

Hippocampus					
CA1					
Stratum oriens	1	0			+/-
Stratum pyramidale	3	1	4	1	+/-
Str. rad.-lac.-mol.	1	*0/1			+/-
CA2					
Stratum oriens	1				+/-
Stratum pyramidale	3			1	
Str. rad.-lac.-mol.	1				
CA3					
Stratum oriens	1	1			
Stratum pyramidale	3	2		1	1
Stratum lucidum	0	0			
Str. rad.-lac.-mol.	1	*0/1			
Gyrus dentatus					
Stratum granulosum	3	0	4	1	0
Stratum plexiforme	2	0		0	
Hilus	1	1	2,5		0
Subiculum	0	0	4		

**Periarchicortex**

Cortex cingularis	1-2	1	2		
-------------------	-----	---	---	--	--

**Palaeocortex**

Bulbus olfactorius	0-1		3	2	
Str. glomerulosum		1			2
Str. plexiforme externum		3			2
Str. mitrale		1			4
Str. plexiforme internum		2			0-1
Str. granulosum internum		1			0-1
Tuberculum olfactorium	2	2			
Insula Calleja	1-2	2			
Cortex piriformis	2-3	2-3	4	1	1

**Septum und basales Vorderhirn**

Ncl. Septi					
Septum laterale	2	0	1		
Septum mediale	2	2	2,5		
Diagonales Band von Broca	1	1			1
Bed ncl. stria terminalis	1	0	1		
Ncl. basalis Meynert	1				
Taenia tecta	0	0	2		

Basalganglien					1
Ncl. Caudatus - Putamen	1-2	1	1	+/-	
Globus pallidus	1-2	1-2	1		1
Pallidum ventrale	2	2-3,C	2,5		
Ncl. accumbens	0-1	0	1		
Clastrum	0	0			

Corpus amygdaloideum				1	
Ncl. amygdalae centralis	2	0	1		+/-
Ncl. amygdalae ventralis	2		3		1
Ncl. amygdalae basolateralis	2	2	3		1
Ncl. amygdalae medialis	2	1	3		
Ncl. amygdalae basomedialis anterior	2	0			2

**Diencephalon****Thalamus**

Ncl. anteriores	2-3	2-4*	4		2
Ncl. intralaminares et medianis	1-2	0-4*	2,5	2	
Ncl. reticularis	3	2,C	2		+/-
Ncl. paraventricularis	0-1	1	3		
Ncl. ventrobasales	2-3	4*			

**Metathalamus**

Corpus geniculatum laterale (Principal relay n.)	2-3	1/4	4	2	3
Corpus geniculatum mediale	2	4	3,5		2

**Epithalamus**

Ncl. habenulae medialis	3	2-4	5		4
lateralis	1	1	1		2

**Subthalamus**

Zona incerta	2-3	0			
Ncl. subincertalis	2				
Ncl. subthalamicus	1-2	2	3		+/-

### Hypothalamus

Ncl. praeopticus medialis	4	1	2		2
Ncl. praeopticus magnocellularis	2	2			
Ncl. suprachiasmaticus	4	2-3	1		
Ncl. supraopticus	4	2,C	4		
Ncl. paraventricularis	4	1,C	2,5		
Ncl. ventromedialis	0	0	1,5		+/-
Ncl. arcuatus	2	2-3,C	2		
Ncl. periventricularis hypothalami	1	1			
Corpus mamillare	2	2	3		1
Ncl. posterior hypothalami	1	1			

### Truncus cerebi

#### Mesencephalon

##### Tegmentum mesencephali

Ncl. tractus opticus	0	0			
Ncl. parabigeminalis	0	0	1		
Ncl. n. oculomotorii	4	2	siehe Kerne		
Ncll. accessorii n. oculomotorii (Edinger-Westphal)	4	1	siehe Kerne		
Ncl. n. trochlearis	4	2	siehe Kerne		
Ncl. ruber	3	2,C	3,5		
Substantia nigra					1
Pars reticularis	2-3	2	2		
Pars compacta	2-3	2	3		
Ncll. Tegmenti					
Ncl. Interstitialis (Cajal)	2				
Ncl. Darkschewitz	2				
Ncl. dorsalis tegmenti	1-2				
Ncl. ventralis tegmenti	1-2				
Area tegmentalis ventralis	0	0	2		
Area praetectalis anterior	2	1,C	1		
Ncl. interpeduncularis	2	2	3		
Substantia grisea centralis mesencephali	1-2	0	2		
Tiefe mesencephalische Kerne	1				
Ncl. subbrachialis	1-2				
Ncll. lemnisci lateralis	3-4	4,C			

##### Tectum mesencephali

Colliculus superior (cranialis)			2	+/-	
Str. griseum superficiale	0	1			
Stratum opticum	0	1	2		
Str griseum intermedium	0	1			
Str griseum profundum	1-2				
Str album profundum (medullare)	0	0			
Colliculus inferior (caudalis)	1-2	2,C	3	1	+/-

## Medulla oblongata und Pons

### Area tegmentalis pontis

Ncl. tegmentalis dorsalis	1	1	3		
Ncl. tegmentalis posterodorsalis	1		2		
Ncl. tegmentalis dorsalis lateralis	1-2	1	2		
Ncl. tegmentalis ventralis (Gudden)	1-2	2	2		
Ncl. tegmentalis microcellularis	0	0			
Ncl. Barrington	1	1	1		

### Andere Hirnstammregionen

Ncl. pontis	3	1	4		
Locus coeruleus	0		3		
Oliva superior	3	3,C	4,5		
Ncl. corporis trapezoidei	3-4	2,C	4,5		
Ncl. supragenualis	0		1		
Ncl. parabrachialis	2	0			
Oliva inferior	2-3	1	1		0

### Visceromotorische Kerne

Ncl. accessorii n. oculomotorii (Edinger - Westphal)	1	1	1		
Ncl. salivatorii	1-2				
Ncl. dorsalis n. vagi (X)	1	1,C	1		

### Viscerosensible Kerne

Ncl. tractus solitarii	1	1	1		
------------------------	---	---	---	--	--

### Somatomotorische Kerne

Ncl. n. oculomotorius (III)	4	2	1		
Ncl. n. trochlearis (IV)	4	2	1		
Ncl. motorius n. trigemini (V)	4	0	1		
Ncl. n. abducentis (VI)	4	1	2		
Ncl. n. facialis (VII)	4	1	4		1
Ncl. accessorius n. facialis	4				
Ncl. ambiguus	4	1	1		
Ncl. n. hypoglossi (XII)	4	2	1		1
Ncl. n. accessorii	4				

### Somatosensible Kerne

Ncl. gracilis	2	2	2		
Ncl. cuneatus	2	2	2		
Ncl. cuneatus externus	2	2	2,5		
Ncl. sensorii n. trigemini					
spinalis	3	2	2,5		1
principalis (pontinus)	3	2	3,5		
mesencephalicus	3	1-2	1		
Ncl. cochlearis					1
dorsalis	4	2-3	3		
ventralis	4	4,C	5		
Ncl. vestibulares					1
medialis	2-3	2	3		
lateralis	0	2	3		
spinalis	0	2	3		
superioris	0	2	3		

**Formatio reticularis**

Raphekerne					
dorsalis	1-2	1	3		
magnus	1				
medianus	1	2,C			
interpositus	1				
pallidus	1	1			
<b>Formatio reticularis medialis</b>					
Ncl. cuneiformis	1	1			
Ncl. reticularis pontis	1	0-1	1		
Ncl. reticularis tegmenti pontis	1		2		
Ncl. reticularis pontis caudalis	1				
Ncl. reticularis gigantocellularis	1-2	0-1	3		
Ncl. reticularis paragigantocellularis	1				
Ncl. praepositus hypoglossi	4	1	1,5		
Ncl. reticularis parvocellularis	1		1		
Area reticularis medullaris	0	0-1	1		
Ncl. parapyramidalis	0				
<b>Formatio reticularis lateralis</b>			3		
Ncl. tegmentalis pedunculopontinus	2	3,C			
Ncl. medullae oblongatae centralis	0				

**Cerebellum**

4

Cortex					
Stratum moleculare	2	2		+/-	0
Stratum ganglionare	3	1		+/-	0
Stratum granulosum	1	1		+/-	0
Ncll. Cerebelli					2
Ncl. interpositus	3	3			
Ncl. lateralis	3	3			
Ncl. infracerebellaris	3	2			

**Medulla spinalis**

Cornu dorsale	1-2				+/-
Cornu ventrale	4				+/-
Cornu laterale	2-3				

\* Für die genauen Einteilung und ihre Werte siehe Notomi T. & Shigemoto R. 2004

- 1: Ergebnisse dieser Arbeit; Verfahren: Immunhistochemie; Tier: Ratte; 4: stark intensiv, 3: intensiv, 2: moderat, 1: schwach, 0: keine immunhistochemische Reaktion
- 2: Notomi & Shigemoto. 2004; Verfahren: Immunhistochemie; Tier: Ratte; 4: sehr stark, 3: stark, 2: moderat, 1: schwach, 0: Hintergrundlevel.
- 3: Monteggia *et al.* 2000; Verfahren: *In situ* Hybridisierung; Tier: Ratte; 5: stärkste Expression, 1: niedrigste Expression, 0: kein nachweisbarer Signal.
- 4: Moosmang *et al.* 1999; Verfahren: *In situ* Hybridisierung; Tier: Maus; 3: starkes, 2: moderates, 1: niedriges, 0: kein Signal. (Original war die Einteilung mit +++, ++, +, - wiedergegeben)
- 5: Santoro *et al.* 2000; Verfahren: *In situ* Hybridisierung; Tier: Maus; 4: sehr hohe Expression, 3: hohe Expression, 2: moderate Expression, 1: niedrige Expression, 0-1: kaum über background, 0: kein nachweisbarer Signal. (Original war die Einteilung mit +++++, +++, ++, +, +/-, - wiedergegeben)

## 6.2 Untersuchte Medikamente

Cilobradin	Maccarone <i>et al.</i> 2004, Stieber <i>et al.</i> 2006, Van Bogaert & Pittoors 2003
Ivabradin (S-16257)	Bucchi <i>et al.</i> 2002, 2006 DiFrancesco & Camm 2004, Stieber <i>et al.</i> 2006, Thollon <i>et al.</i> 2007
Zatebradin (UL-FS49)	Maccarone <i>et al.</i> 2004, Pape 1994, Stieber <i>et al.</i> 2006, Van Bogaert & Pittoors 2003
Isoprenalin	Choi <i>et al.</i> 1999
Clonidin	Dalle <i>et al.</i> 2001, Knaus <i>et al.</i> 2007, Parkis & Berger 1997, Shouse <i>et al.</i> 1996
Losartan	Egli <i>et al.</i> 2002
Propafenon	Hoppe & Beuckelmann 1998
Lidocain	Rocchetti <i>et al.</i> 1999, DeToledo 2000
Mepivacain, Bupivacain	Bischoff <i>et al.</i> 2003
Halothan	Sirois <i>et al.</i> 1998, 2002
Propofol	Funahashi <i>et al.</i> 2004, Higuchi <i>et al.</i> 2003, Ying <i>et al.</i> 2006
Acetacolamid	Munsch & Pape 1999, Reiss & Oles 1996
Baclofen	Watts <i>et al.</i> 1996
Capsazepin	Gill <i>et al.</i> 2006, Ray <i>et al.</i> 2003
Lamotrigin	Poolos <i>et al.</i> 2002



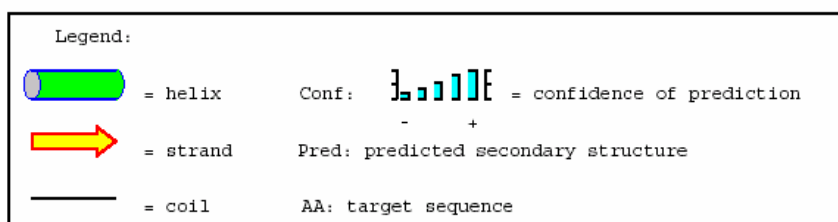
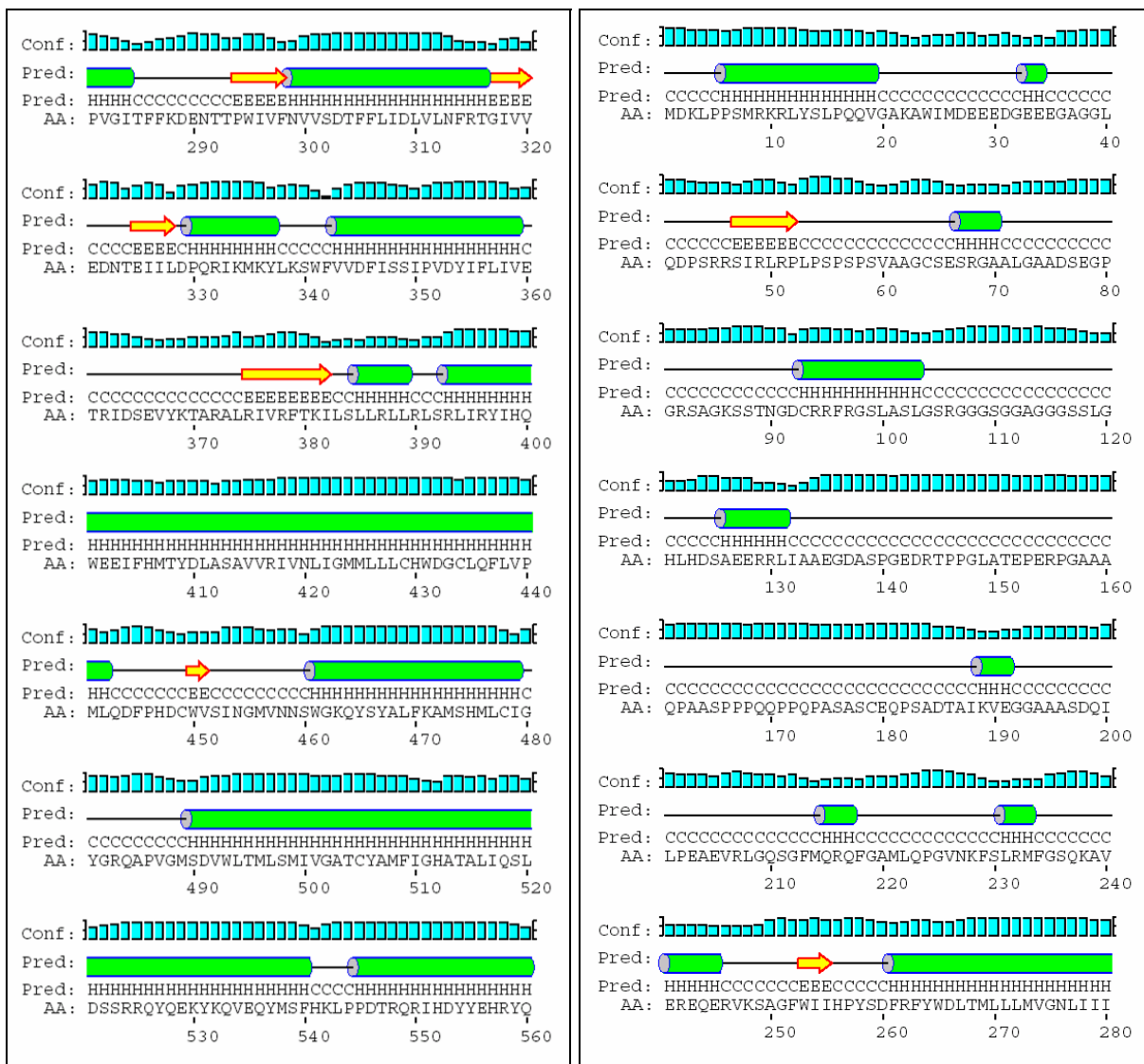
Neurotransmitter wie

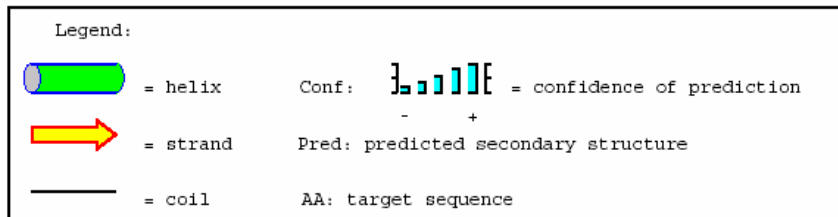
Norepinephrin/Noradrenalin Nishimura *et al.* 1995,  
Sirois *et al.* 2002  
Serotonin Liu *et al.* 2003,  
Sirois *et al.* 2002

Rauschmittel wie

Lysergsaeureaethylamid (LSD) Garratt *et al.* 1993

**6.3 Voraussage der Strukturbestimmung des HCN4-Kanals**





## 6.4 Homologiesuche

Alignment	DB:ID	Source	Length	Identity%	Ungapped%	Overlap	E <sub>0</sub>
1 <input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">SW:HCN4_MOUSE</a>	Potassium/sodium hyperpolarizatio	1186	100.000	100.000	14	0.14
2 <input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">SW:HCN4_RAT</a>	Potassium/sodium hyperpolarization-	1198	100.000	100.000	14	0.15
3 <input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">SW:HCN4_HUMAN</a>	Potassium/sodium hyperpolarizatio	1203	100.000	100.000	14	0.15
4 <input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">SW:HCN4_RABIT</a>	Potassium/sodium hyperpolarizatio	1175	100.000	100.000	12	1.4
5 <input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">SW:DAMS_HUMAN</a>	Putative 10.3 kDa proline-rich pr	95	76.923	76.923	13	1.8
6 <input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">SW:PRP_MYCBO</a>	Proline-rich protein (Fragment).	15	70.000	70.000	10	3.2
7 <input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">SW:ATF5_MOUSE</a>	Cyclic-AMP-dependent transcriptio	283	81.818	81.818	11	13
8 <input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">SW:VGLX_PRVRI</a>	Secreted glycoprotein GX.	498	100.000	100.000	9	14
9 <input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">SW:TMOF_AEDAE</a>	Trypsin-modulating oostatic facto	10	75.000	75.000	8	28
10 <input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">SW:NUKM_ARATH</a>	NADH-ubiquinone oxidoreductase 20	218	77.778	77.778	9	29
11 <input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">SW:CT04B_HUMAN</a>	Hypothetical protein C20orf40-2	95	81.818	81.818	11	29
12 <input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">SW:TRX2_MOUSE</a>	Trithorax homolog 2 (WW domain bi	290	72.727	72.727	11	29
13 <input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">SW:Y462_ARATH</a>	Putative protein At4g17620, chlor	544	76.923	76.923	13	32
14 <input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">SW:LECT_SOLTU</a>	Chitin-binding lectin 1 precursor	323	88.889	88.889	9	32
15 <input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">SW:SF01_HUMAN</a>	Splicing factor 1 (Zinc finger pr	639	72.727	72.727	11	37
16 <input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">SW:YBL7_SCHPO</a>	Hypothetical protein C106.07c in	167	77.778	77.778	9	38

**Ergebnisfenster 6.1:** Ergebnisse der Homologiesuche für die AS-Sequenz des Peptides Nr. 2.

```

Query                               1:14
1 SW:HCN4_MOUSE                     1:14 1007:1126
2 SW:HCN4_RAT                       1:14 1020:1139
3 SW:HCN4_HUMAN                     1:14 1022:1141
4 SW:HCN4_RABIT                     1:14 1003:1122
5 SW:DAMS_HUMAN                     1:14 1:60
6 SW:PRP_MYCBO                      1:14 1:15
7 SW:ATF5_MOUSE                     1:14 91:210
8 SW:VGLX_PRVRI                     1:14 301:420
9 SW:TMOF_AEDAE                     1:14 1:10
10 SW:NUKM_ARATH                    1:14 21:140
11 SW:CT04B_HUMAN                    1:14 50:95
12 SW:TRX2_MOUSE                     1:14 24:143
13 SW:Y462_ARATH                     1:14 502:544
14 SW:LECT_SOLTU                     1:14 167:286
15 SW:SF01_HUMAN                     1:14 598:639
16 SW:YBL7_SCHPO                     1:14 8:127
consensus/100%                      ...ss...PPs...
consensus/90%                       ...sPsssPPPP...
consensus/80%                       ...PPuosPPPP...
consensus/70%                       ...hPPAosPPPP.s
1 [ . . . ] 14
LLLPPASSPPPPQV
LLLPPASSPPPPQV
LLLPPASSPPPPQV
LLLPPASSPPPPQV
LLLPPASSPPPPPP
LLPPPATPPPPPS
--TTPXEXPPPPQX
PLLPPSPPPPPPP
SPRPPASSPPPPPP
--YDPAPPPPPP--
RPGPPSTSPPPGGL
PLLPNASSPPTPGQ
PLPPSTSPPPPAS
LLQNPASPPPPQ-
PPPPASPPPPPPA
FGMPPAPPPPPQN
SSIPPSSPPPRLT

```

**Ergebnisfenster 6.2:** Zeigt die Übereinstimmung der AS-Sequenz der gefundenen Homologe mit der AS-Sequenz des Peptides Nr. 2.

- Abdulla, F. A.** and Smith, P. A., Axotomy- and autotomy-induced changes in Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channel currents of rat dorsal root ganglion neurons, *Journal of Neurophysiology*, 85 (2001) 644-658.
- Abi-Gerges, N.**, Ji, G. J., Lu, Z. J., Fischmeister, R., Hescheler, J., and Fleischmann, B. K., Functional expression and regulation of the hyperpolarization activated non-selective cation current in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes, *Journal of Physiology-London*, 523 (2000) 377-389.
- Adam, T. J.**, Schwarz, D. W., and Finlayson, P. G., Firing properties of chopper and delay neurons in the lateral superior olive of the rat, *Exp Brain Res*, 124 (1999) 489-502.
- Adams, J. C.**, Heavy metal intensification of DAB-based HRP reaction product, *J. Histochem. Cytochem.*, 29 (1981) 775.
- Adoff, L. M.**, Egg yolk embedding for frozen whole brain sections, *Stain Technol.*, 56 (1981) 125-126.
- Aitkin, L. M.**, Anderson, D. J., and Brugge, J. F., Tono-topical Organization and Discharge Characteristics of Single Neurons in Nuclei of Lateral Lemniscus of Cat, *Journal of Neurophysiology*, 33 (1970) 421-440.
- Altomare, C.**, Bucchi, A., Camatini, E., Baruscotti, M., Viscomi, C., Moroni, A., and Difrancesco, D., Integrated allosteric model of voltage gating of HCN channels, *Journal of General Physiology*, 117 (2001) 519-532.
- Altomare, C.**, Terragni, B., Brioschi, C., Milanese, R., Pagliuca, C., Viscomi, C., Moroni, A., Baruscotti, M., and Difrancesco, D., Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node, *J. Physiol*, Apr 17, 549 (2003) 347-359.
- Arias, R. L.** and Bowby, M. R., Pharmacological characterization of antiepileptic drugs and experimental analgesics on low magnesium-induced hyperexcitability in rat hippocampal slices, *Brain Research*, 1047 (2005) 233-244.
- Arroyo A.**, Kim, B., Rasmuson, R.L., Bett, G., Yeh, J., Hyperpolarization-activated cation channels are expressed in rat hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and immortalized GnRH neurons, *J Soc Gynecol Investig*, 13 (2006) 442-50.
- Attal, N.**, Pharmacologic treatment of neuropathic pain, *Acta Neurologica Belgica*, 101 (2001) 53-64.
- Attwell, D.** and Wilson, M., Behaviour of the rod network in the tiger salamander retina mediated by membrane properties of individual rods, *J. Physiol*, 309 (1980) 287-315.
- Bajo, V. M.**, Merchan, M. A., Lopez, D. E., and Rouiller, E. M., Neuronal Morphology and Efferent Projections of the Dorsal Nucleus of the Lateral Lemniscus in the Rat, *Journal of Comparative Neurology*, 334 (1993) 241-262.
- Banks, M. I.**, Pearce, R. A., and Smith, P. H., Hyperpolarization-activated cation current (I<sub>h</sub>) in neurons of the medial nucleus of the trapezoid body: voltage-clamp analysis and enhancement by norepinephrine and cAMP suggest a modulatory mechanism in the auditory brain stem, *J Neurophysiol*, 70 (1993) 1420-1432.
- Bayliss, D. A.**, Viana, F., Bellingham, M. C., and Berger, A. J., Characteristics and postnatal development of a hyperpolarization-activated inward current in rat hypoglossal motoneurons in vitro, *J Neurophysiol*, 71 (1994) 119-128.
- Beaumont, V.** and Zucker, R. S., Enhancement of synaptic transmission by cyclic AMP modulation of presynaptic I<sub>h</sub> channels, *Nat Neurosci*, 3 (2000) 133-141.
- Bender, R. A.**, Brewster, A., Santoro, B., Ludwig, A., Hofmann, F., Biel, M., and Baram, T. Z., Differential and age-dependent expression of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channel isoforms 1-4 suggests evolving roles in the developing rat hippocampus, *Neuroscience*, 106 (2001) 689-698.
- Bender, R. A.**, Soleymani, S. V., Brewster, A. L., Nguyen, S. T., Beck, H., Mathern, G. W., and Baram, T. Z., 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 (2003) 6826-6836.
- Bennettclarke, C. A.**, Chiaia, N. L., Jacquin, M. F., and Rhoades, R. W., Parvalbumin and Calbindin Immunocytochemistry Reveal Functionally Distinct Cell Groups and Vibrissa-Related Patterns in the Trigeminal Brain-Stem Complex of the Adult-Rat, *Journal of Comparative Neurology*, 320 (1992) 323-338.
- Berod, A.**, Hartman, B. K., and Pujol, J. F., Importance of fixation in immunohistochemistry: use of formaldehyde solutions at variable pH for the localization of tyrosine hydroxylase, *J. Histochem. Cytochem.*, 29 (1981) 844-850.

- Biel, M.**, Ludwig, A., Zong, X., and Hofmann, F., Hyperpolarization-activated cation channels: a multi-gene family, *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 136 (1999) 165-181.
- Biel, M.**, Schneider, A., and Wahl, C., Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation, *Trends Cardiovasc. Med.*, 12 (2002) 206-212.
- Bischoff, U.**, Brau, M. E., Vogel, W., Hempelmann, G., and Olschewski, A., Local anaesthetics block hyperpolarization-activated inward current in rat small dorsal root ganglion neurones, *Br. J. Pharmacol.*, 139 (2003) 1273-1280.
- Bobker, D. H.** and Williams, J. T., Serotonin augments the cationic current  $I_h$  in central neurons, *Neuron*, 2 (1989) 1535-1540.
- Brauer, A. U.**, Savaskan, N. E., Kole, M. H., Plaschke, M., Monteggia, L. M., Nestler, E. J., Simburger, E., Deisz, R. A., Ninnemann, O., and Nitsch, R., Molecular and functional analysis of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the hippocampus after entorhinal cortex lesion, *Faseb J*, 15 (2001) 2689-2701.
- Brewster, A.**, Bender, R. A., Chen, Y., Dube, C., Eghbal-Ahmadi, M., and Baram, T. Z., Developmental febrile seizures modulate hippocampal gene expression of hyperpolarization-activated channels in an iso, *J Neurosci*, 22 (2002) 4591-4599.
- Brown, H.** and DiFrancesco, D., Voltage-Clamp Investigations of Membrane Currents Underlying Pace-Maker Activity in Rabbit Sino-Atrial Node, *Journal of Physiology-London*, 308 (1980) 331-351.
- Brown, H. F.**, DiFrancesco, D., and Noble, S. J., How Does Adrenaline Accelerate the Heart, *Nature*, 280 (1979) 235-236.
- Brown, R. E.**, Stevens, D. R., and Haas, H. L., The physiology of brain histamine, *Prog Neurobiol*, 63 (2001) 637-672.
- Brugge, J. F.**, Anderson, D. J., and Aitkin, L. M., Responses of Neurons in Dorsal Nucleus of Lateral Lemniscus of Cat to Binaural Tonal Stimulation, *Journal of Neurophysiology*, 33 (1970) 441-458.
- Bucchi, A.**, Baruscotti, M., and DiFrancesco, D., Current-dependent block of rabbit sino-atrial node  $I(f)$  channels by ivabradine, *J. Gen. Physiol*, 120 (2002) 1-13.
- Bucchi, A.**, Tognati, A., Milanese, R., Baruscotti, M., DiFrancesco, D., Properties of ivabradine-induced block of HCN1 and HCN4 pacemaker channels, *J. Physiol*, 572 (2006) 335-346
- Cerbai, E.**, Pino, R., Porciatti, F., Sani, G., Toscano, M., Maccherini, M., Giunti, G., and Mugelli, A., Characterization of the hyperpolarization-activated current,  $I_f$ , in ventricular myocytes from human failing heart, *Circulation*, 95 (1997) 568-571.
- Cerbai, E.**, Sartiani, L., DePaoli, P., Pino, R., Maccherini, M., Bizzarri, F., DiCiolla, F., Davoli, G., Sani, G., and Mugelli, A., The properties of the pacemaker current  $I_f$  in human ventricular myocytes are modulated by cardiac disease, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33 (2001) 441-448.
- Chang, F.**, Cohen, I. S., DiFrancesco, D., Rosen, M. R., and Tromba, C., Effects of Protein-Kinase Inhibitors on Canine Purkinje-Fiber Pacemaker Depolarization and the Pacemaker Current- $I_f$ , *Journal of Physiology-London*, 440 (1991) 367-384.
- Chapin, E. M.** and Andrade, R., A 5-HT(7) receptor-mediated depolarization in the anterodorsal thalamus. II. Involvement of the hyperpolarization-activated current  $I(h)$ , *J Pharmacol Exp Ther*, 297 (2001) 403-409.
- Chapin, E. M.**, Haj-Dahmane, S., Torres, G., and Andrade, R., The 5-HT(4) receptor-induced depolarization in rat hippocampal neurons is mediated by cAMP but is independent of  $I(h)$ , *Neurosci Lett*, 324 (2002) 1-4.
- Chaplan, S. R.**, Guo, H. Q., Lee, D. H., Luo, L., Liu, C., Kuei, C., Velumian, A. A., Butler, M. P., Brown, S. M., and Dubin, A. E., Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain, *J. Neurosci.*, 23 (2003) 1169-1178.
- Chen, K.**, Aradi, I., Thon, N., Eghbal, A. M., Baram, T. Z., and Soltesz, I., Persistently modified h-channels after complex febrile seizures convert the seizure-induced enhancement of inhibition to hyperexcitability, *Nature Medicine*, 7 (2001) 331-337.
- Chen, K.**, Aradi, I., Santhakumar, V., and Soltesz, I., H-channels in epilepsy: new targets for seizure control?, *Trends Pharmacol. Sci.*, 23 (2002) 552-557.

- Chen, S.**, Wang, J., and Siegelbaum, S. A., Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide, *J. Gen. Physiol.*, 117 (2001) 491-504.
- Chevaleyre, V.**, Moos, F. C., and Desarmenien, M. G., Correlation between electrophysiological and morphological characteristics during maturation of rat supraoptic neurons, *European Journal of Neuroscience*, 13 (2001) 1136-1146.
- Choi, H. S.**, Wang, D. Y., Noble, D., and Lee, C. O., Effect of isoprenaline, carbachol, and Cs<sup>+</sup> on Na<sup>+</sup> activity and pacemaker potential in rabbit SA node cells, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 276 (1999) H205-H214.
- Clapham, D. E.**, Not so funny anymore: Pacing channels are cloned, *Neuron*, 21 (1998) 5-7.
- Dalle, C.**, Schneider, M., Clergue, F., Bretton, C., and Jirounek, P., Inhibition of the I(h) current in isolated peripheral nerve: a novel mode of peripheral antinociception?, *Muscle Nerve*, 24 (2001) 254-261.
- Decher, N.**, Bundis, F., Vajna, R., and Steinmeyer, K., KCNE2 modulates current amplitudes and activation kinetics of HCN4: influence of KCNE family members on HCN4 currents, *Pflugers Arch.* 2003., 446 (2003) 633-640.
- DeToledo, J. C.**, Lidocaine and seizures, *Therapeutic Drug Monitoring*, 22 (2000) 320-322.
- Di Pasquale, E.**, Keegan, K. D., and Noebels, J. L., Increased excitability and inward rectification in layer V cortical pyramidal neurons in the epileptic mutant mouse Stargazer, *J Neurophysiol*, 77 (1997) 621-631.
- Difrancesco, D.**, Block and Activation of the Pace-Maker Channel in Calf Purkinje-Fibers - Effects of Potassium, Cesium and Rubidium, *Journal of Physiology-London*, 329 (1982) 485-507.
- Difrancesco, D.**, Ducouret, P., and Robinson, R. B., Muscarinic Modulation of Cardiac Rate at Low Acetylcholine Concentrations, *Science*, 243 (1989) 669-671.
- Difrancesco, D.** and Tortora, P., Direct Activation of Cardiac-Pacemaker Channels by Intracellular Cyclic-Amp, *Nature*, 351 (1991) 145-147.
- Difrancesco, D.** and Camm, J. A., Heart Rate Lowering by Specific and Selective I(f) Current Inhibition with Ivabradine: A New Therapeutic Perspective in Cardiovascular Disease, *Drugs*, 64 (2004) 1757-1765.
- Edman, A.**, Theander, S., and Grampp, W., Functional-Effects of A Hyperpolarization-Activated Membrane Current in the Lobster Stretch-Receptor Neuron, *Acta Physiologica Scandinavica*, 146 (1992) 221-232.
- Egli, M.**, Berger, T., and Imboden, H., Angiotensin II influences the hyperpolarization-activated current I<sub>h</sub> in neurones of the rat paraventricular nucleus, *Neurosci. Lett.*, 330 (2002) 53-56.
- Eng, D. L.**, Gordon, T. R., Kocsis, J. D., and Waxman, S. G., Current-clamp analysis of a time-dependent rectification in rat optic nerve, *J Physiol*, 421 (1990) 185-202.
- Erdemli, G.** and Crunelli, V., Hypoxia activates I-h in rat thalamocortical neurones in vitro, *Journal of Physiology-London*, 506P (1998) 150P.
- Erdemli, G.** and Crunelli, V., Release of monoamines and nitric oxide is involved in the modulation of hyperpolarization-activated inward current during acute thalamic hypoxia, *Neuroscience*, 96 (2000) 565-574.
- Fontaine, B.**, Plassart-Schiess, E., and Nicole, S., Diseases caused by voltage-gated ion channels, *Molecular Aspects of Medicine*, 18 (1997) 415-463.
- Frace, A. M.**, Maruoka, F., and Noma, A., Control of the Hyperpolarization-Activated Cation Current by External Anions in Rabbit Sinoatrial Node Cells, *Journal of Physiology-London*, 453 (1992) 307-318.
- Franz, O.**, Liss, B., Neu, A., and Roeper, J., Single-cell mRNA expression of HCN1 correlates with a fast gating phenotype of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channels (I<sub>h</sub>) in central neurons, *Eur. J. Neurosci.*, 12 (2000) 2685-2693.
- Friauf, E.** and Herbert, H., Topographic Organization of Facial Motoneurons to Individual Pinna Muscles in Rat (*Rattus-Rattus*) and Bat (*Rousettus-Aegyptiacus*), *Journal of Comparative Neurology*, 240 (1985) 161-170.
- Fu, X. W.**, Brezden, B. L., and Wu, S. H., Hyperpolarization-activated inward current in neurons of the rat's dorsal nucleus of the lateral lemniscus in vitro, *J Neurophysiol*, 78 (1997) 2235-2245.
- Funahashi, M.**, Mitoh, Y., and Matsuo, R., The sensitivity of hyperpolarization-activated cation current (I<sub>h</sub>) to propofol in rat area postrema neurons, *Brain Res.*, 1015 (2004) 198-201.

- Gabbott, P. L. A.**, Somogyi, J., Stewart, M. G., and Hamori, J., The Orientation of Interneurons in the Dorsal Lateral Geniculate-Nucleus of the Rat - A Quantitative Study, *Brain Research*, 438 (1988) 379-384.
- Galindo, B. E.**, Neill, A. T., Vacquier, V. D., A new hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channel from sea urchin sperm flagella, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 334 (2005) 96-101
- Garner, C. C.**, Nash, J., and Haganir, R. L., PDZ domains in synapse assembly and signalling, *Trends in Cell Biology*, 10 (2000) 274-280.
- Garratt, J. C.**, Alreja, M., and Aghajanian, G. K., LSD has high efficacy relative to serotonin in enhancing the cationic current *I<sub>h</sub>*: intracellular studies in rat facial motoneurons, *Synapse*, 13 (1993) 123-134.
- Gauss, R.**, Seifert, R., and Kaupp, U. B., Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm, *Nature*, 393 (1998) 583-587.
- Gauss, R.** and Seifert, R., Pacemaker oscillations in heart and brain: a key role for hyperpolarization-activated cation channels, *Chronobiol Int*, 17 (2000) 453-469.
- Geyer, G.** and Feustel, E. M., [On the usefulness of acrolein fixation for histochemical studies. I. Carbohydrates, proteins, nucleic acids], *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.*, 74 (1966) 393-406.
- Geysen, H. M.**, Rodda, S. J., Mason, T. J., Tribbick, G., and Schoofs, P. G., Strategies for epitope analysis using peptide synthesis, *J. Immunol. Methods*, 102 (1987) 259-274.
- Gill, C. H.**, Brown, J. T., Shivji, N., Lappin, S. C., Farmer, C., Randall, A., McNaughton, N. C., Cobb, S. R., Davies, C. H., Inhibition of *I<sub>h</sub>* reduces epileptiform activity in rodent hippocampal slices, *Synapse*, 59 (2006) 308-316
- Green, M. E.**, Edwards, G., Kirkup, A. J., Miller, M., and Weston, A. H., Pharmacological characterization of the inwardly-rectifying current in the smooth muscle cells of the rat bladder, *Br J Pharmacol*, 119 (1996) 1509-1518.
- Greenwood, I. A.** and Prestwich, S. A., Characteristics of hyperpolarization-activated cation currents in portal vein smooth muscle cells, *Am. J. Physiol Cell Physiol*, 282 (2002) C744-C753.
- Halliwell, J. V.** and Adams, P. R., Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons, *Brain Res.*, 250 (1982) 71-92.
- Haring, J. H.**, Henderson, T. A., and Jacquin, M. F., Principalis-Projecting Or Parabrachial-Projecting Spinal Trigeminal Neurons do Not Strain for Gaba Or Gad, *Somatosensory and Motor Research*, 7 (1990) 391-397.
- Harlow, E.** and Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988) 553-612.
- Harris, N. C.** and Constanti, A., Mechanism of block by ZD 7288 of the hyperpolarization-activated inward rectifying current in guinea pig substantia nigra neurons in vitro, *J Neurophysiol*, 74 (1995) 2366-2378.
- Hastings, M. H.**, Central clocking, *Trends in Neurosciences*, 20 (1997) 459-464.
- Higuchi, H.**, Funahashi, M., Miyawaki, T., Mitoh, Y., Kohjitani, A., Shimada, M., and Matsuo, R., Suppression of the hyperpolarization-activated inward current contributes to the inhibitory actions of propofol on rat CA1 and CA3 pyramidal neurons, *Neurosci. Res.*, 45 (2003) 459-472.
- Hoppe, U. C.**, Jansen, E., Sudkamp, M., and Beuckelmann, D. J., Hyperpolarization-activated inward current in ventricular myocytes from normal and failing human hearts, *Circulation*, 97 (1998) 55-65.
- Hoppe, U. C.** and Beuckelmann, D. J., Modulation of the hyperpolarization-activated inward current (*I<sub>f</sub>*) by antiarrhythmic agents in isolated human atrial myocytes, *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, 358 (1998) 635-640.
- Horn, S.**, Quasthoff, S., Grafe, P., Bostock, H., Renner, R., and Schrank, B., Abnormal axonal inward rectification in diabetic neuropathy, *Muscle & Nerve*, 19 (1996) 1268-1275.
- Ishii, T. M.**, Takano, M., Xie, L. H., Noma, A., and Ohmori, H., Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node, *J Biol Chem*, 274 (1999) 12835-12839.
- Jan, L. Y.** and Jan, Y. N., Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes, *Annual Review of Neuroscience*, 20 (1997) 91-123.
- Jensen, T. S.**, Anticonvulsants in neuropathic pain: rationale and clinical evidence, *European Journal of Pain-London*, 6 (2002) 61-68.

- Kamondi, A.** and Reiner, P. B., Hyperpolarization-activated inward current in histaminergic tuberomammillary neurons of the rat hypothalamus, *J Neurophysiol*, 66 (1991) 1902-1911.
- Kaufmann, R.**, Chaurand, P., Kirsch, D., and Spengler, B., Post-source decay and delayed extraction in matrix-assisted laser desorption/ionization-reflectron time-of-flight mass spectrometry. Are there trade-offs?, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 10 (1996) 1199-1208.
- Kaupp, U. B.** and Seifert, R., Molecular diversity of pacemaker ion channels, *Annu Rev Physiol*, 63 (2001) 235-257.
- Kimura, K.**, Kitano, J., Nakajima, Y., and Nakanishi, S., Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated HCN2 cation channel forms a protein assembly with multiple neuronal scaffold proteins in distinct modes of protein-protein interaction, *Genes Cells*, 9 (2004) 631-640.
- Kitayama M.**, Kogure S., Miyata H., Saito N., Yano M., Matsuda Y., Yamauchi T., Could Ih channels contribute to the seizure generation in the rabbit hippocampus? *Epilepsia*, 42 (2001), 1.256
- Kitayama, M.**, Miyata, H., Yano, M., Saito, N., Matsuda, Y., Yamauchi, T., and Kogure, S., Ih blockers have a potential of antiepileptic effects, *Epilepsia*, 44 (2003) 20-24.
- Klinke R.** & Silberagl S., *Lehrbuch der Physiologie. Sonderauflage 2000*, Thieme-Verlag Stuttgart.
- Knaus, A.**, Zong, X., Beetz, N., Jahns, R., Lohse, M.J., Biel, M., Hein, L., Direct inhibition of cardiac hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated pacemaker channels by clonidine, *Circulation*. 115(2007) 872-80.
- Kobertz, W. R.** and Miller, C., K<sup>+</sup> channels lacking the 'tetramerization' domain: implications for pore structure, *Nat. Struct. Biol.*, 6 (1999) 1122-1125.
- Koch, U.**, Braun, M., Kapfer, C., and Grothe, B., Distribution of HCN1 and HCN2 in rat auditory brainstem nuclei, *Eur. J. Neurosci.*, 20 (2004) 79-91.
- Kubota, M.**, Nakamura, M., and Tsukahara, N., Ionic conductance associated with electrical activity of guinea-pig red nucleus neurones in vitro, *J Physiol*, 362 (1985) 161-171.
- Lamas, J. A.**, A hyperpolarization-activated cation current (I<sub>h</sub>) contributes to resting membrane potential in rat superior cervical sympathetic neurones, *Pflugers Arch*, 436 (1998) 429-435.
- Lehmann-Horn, F.** and Jurkat-Rott, K., Voltage-gated ion channels and hereditary disease, *Physiological Reviews*, 79 (1999) 1317-1372.
- Liu, Z.**, Bunney, E. B., Appel, S. B., and Brodie, M. S., Serotonin reduces the hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) in ventral tegmental area dopamine neurons: involvement of 5-HT<sub>2</sub> receptors and protein kinase C, *J. Neurophysiol.*, 90 (2003) 3201-3212.
- Lorincz, A.**, Notomi, T., Tamas, G., Shigemoto, R., and Nusser, Z., Polarized and compartment-dependent distribution of HCN1 in pyramidal cell dendrites, *Nat. Neurosci.*, 5 (2002) 1185-1193.
- Ludwig, A.**, Zong, X., Jeglitsch, M., Hofmann, F., and Biel, M., A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels, *Nature*, 393 (1998) 587-591.
- Ludwig, A.**, Zong, X., Hofmann, F., and Biel, M., Structure and function of cardiac pacemaker channels, *Cell Physiol Biochem.*, 9 (1999) 179-186.
- Ludwig, A.**, Budde, T., Stieber, J., Moosmang, S., Wahl, C., Holthoff, K., Langebartels, A., Wotjak, C., Munsch, T., Zong, X., Feil, S., Feil, R., Lancel, M., Chien, K. R., Konnerth, A., Pape, H. C., Biel, M., and Hofmann, F., Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2, *EMBO J.*, 22 (2003) 216-224.
- Luo, L.**, Chang, L., Brown, S.M., Ao, H., Lee, D.H., Higuera, E.S., Dubin, A.E., Chaplan, S.R., Role of peripheral hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated channel pacemaker channels in acute and chronic pain models in the rat, *Neuroscience*, 144 (2007) 1477-85
- Luthi, A.** and McCormick, D. A., Periodicity of thalamic synchronized oscillations: the role of Ca<sup>2+</sup>-mediated upregulation of I<sub>h</sub>, *Neuron*, 20 (1998) 553-563.
- Luthi, A.** and McCormick, D. A., Ca<sup>2+</sup>-mediated up-regulation of I<sub>h</sub> in the thalamus. How cell-intrinsic ionic currents may shape network activity, *Ann N Y Acad Sci*, 868 (1999) 765-769.
- Maccarone, R.**, Izzizzari, G., Gargini, C., Cervetto, L., and Bisti, S., The impact of organic inhibitors of the hyperpolarization activated current (I<sub>h</sub>) on the electroretinogram (ERG) of rodents, *Arch. Ital. Biol.*, 142 (2004) 95-103.



- Magee, J. C.**, Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons, *J Neurosci*, 18 (1998) 7613-7624.
- Magee, J. C.**, Dendritic Ih normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons, *Nat Neurosci*, 2 (1999) 508-514.
- Mayer, M. L.**, James, M. H., Russell, R. J., Kelly, J. S., and Pasternak, C. A., Changes in Excitability Induced by Herpes-Simplex Viruses in Rat Dorsal-Root Ganglion Neurons, *Journal of Neuroscience*, 6 (1986) 391-402.
- McCormick, D. A.** and Pape, H. C., Noradrenergic and serotonergic modulation of a hyperpolarization-activated cation current in thalamic relay neurones, *J Physiol Lond*, 431 (1990) 319-342.
- McCormick, D. A.** and Williamson, A., Modulation of neuronal firing mode in cat and guinea pig LGNd by histamine: possible cellular mechanisms of histaminergic control of arousal, *J Neurosci*, 11 (1991) 3188-3199.
- Mellor, J.**, Nicoll, R. A., and Schmitz, D., Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by presynaptic Ih channels, *Science*, 295 (2002) 143-147.
- Mironov, S. L.**, Langohr, K., and Richter, D. W., Hyperpolarization-activated current, Ih, in inspiratory brainstem neurons and its inhibition by hypoxia, *Eur J Neurosci*, 12 (2000) 520-526.
- Mistrik, P.**, Mader, R., Michalakis, S., Weidinger, M., Pfeifer, A., and Biel, M., The murine HCN3 gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides, *Journal of Biological Chemistry*, 280 (2005) 27056-27061.
- Monteggia, L. M.**, Eisch, A. J., Tang, M. D., Kaczmarek, L. K., and Nestler, E. J., Cloning and localization of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel family in rat brain, *Molecular Brain Research*, 81 (2000) 129-139.
- Moosmang, S.**, Biel, M., Hofmann, F., and Ludwig, A., Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain, *Biol Chem*, 380 (1999) 975-980.
- Moroni, A.**, Gorza, L., Beltrame, M., Gravante, B., Vaccari, T., Bianchi, M. E., Altomare, C., Longhi, R., Heurteaux, C., Vitadello, M., Malgaroli, A., and Difrancesco, D., Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current I-f, *Journal of Biological Chemistry*, 276 (2001) 29233-29241.
- Much, B.**, Wahl-Schott, C., Zong, X., Schneider, A., Baumann, L., Moosmang, S., Ludwig, A., and Biel, M., Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels, *J. Biol. Chem.*, 278 (2003) 43781-43786.
- Müller, F.**, Scholten, A., Ivanova, E., Haverkamp, S., Kremmer, E., and Kaupp, U. B., HCN channels are expressed differentially in retinal bipolar cells and concentrated at synaptic terminals, *Eur. J. Neurosci.*, 17 (2003) 2084-2096.
- Munsch, T.** and Pape, H. C., Modulation of the hyperpolarization-activated cation current of rat thalamic relay neurones by intracellular pH, *J Physiol*, 519 Pt 2 (1999) 493-504.
- Munsch, T.** and Pape, H. C., Upregulation of the hyperpolarization-activated cation current in rat thalamic relay neurones by acetazolamide, *J Physiol Lond*, 519 Pt 2 (1999) 505-514.
- Neuhoff, H.**, Neu, A., Liss, B., and Roeper, J., I(h) channels contribute to the different functional properties of identified dopaminergic subpopulations in the midbrain, *J Neurosci*, 22 (2002) 1290-1302.
- Nishimura, Y.**, Muramatsu, M., Asahara, T., Tanaka, T., and Yamamoto, T., Electrophysiological properties and their modulation by norepinephrine in the ambiguous neurons of the guinea pig, *Brain Res*, 702 (1995) 213-222.
- Notomi, T.** and Shigemoto, R., Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain, *J. Comp Neurol.*, 471 (2004) 241-276.
- Okabe, K.**, Inoue, Y., Kawarabayashi, T., Kajiya, H., Okamoto, F., and Soeda, H., Physiological significance of hyperpolarization-activated inward currents (Ih) in smooth muscle cells from the circular layers of pregnant rat myometrium, *Pflugers Arch*, 439 (1999) 76-85.
- Oreilly, P. M. R.** and Fitzgerald, M. J. T., Fiber Composition of the Hypoglossal Nerve in the Rat, *Journal of Anatomy*, 172 (1990) 227-243.

- Pape, H. C.** and McCormick, D. A., Noradrenaline and serotonin selectively modulate thalamic burst firing by enhancing a hyperpolarization-activated cation current, *Nature*, 340 (1989) 715-718.
- Pape, H. C.**, Adenosine promotes burst activity in guinea-pig geniculocortical neurones through two different ionic mechanisms, *J Physiol Lond*, 447 (1992) 729-753.
- Pape, H. C.** and Mager, R., Nitric-Oxide Controls Oscillatory Activity in Thalamocortical Neurons, *Neuron*, 9 (1992) 441-448.
- Pape, H. C.**, Specific Bradycardiac Agents Block the Hyperpolarization-Activated Cation Current in Central Neurons, *Neuroscience*, 59 (1994) 363-373.
- Pape, H. C.**, Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons, *Annu Rev Physiol*, 58 (1996) 299-327.
- Parkis, M. A.** and Berger, A.J., Clonidine reduces hyperpolarization-activated inward current (I<sub>h</sub>) in rat hypoglossal motoneurons, *Brain Res*, 769 (1997) 108-118.
- Paxinos, G.** [Hrsg.]: "The rat nervous system." - San Diego [u.a.]: Acad. Press, 1995 ISBN: 0-12-547635-3
- Paxinos, G.** [Hrsg.]: "The rat nervous system." - Amsterdam [u.a.]: Elsevier, 2004 ISBN: 0-12-547638-8
- Paxinos G.** & Watson C.: "The rat brain in stereotaxic coordinates." - San Diego [u.a.]: Acad. Press, 1998 - ISBN: 0-12-547617-5
- Pearson, W.R.**, Lipman, D.J., Improved tools for biological sequence comparison, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 85 (1988) 2444-2448
- Plotnikov, A. N.**, Sosunov, E. A., Qu, J., Shlapakova, I. N., Anyukhovskiy, E. P., Liu, L., Janse, M. J., Brink, P. R., Cohen, I. S., Robinson, R. B., Danilo, P., Jr., and Rosen, M. R., Biological pacemaker implanted in canine left bundle branch provides ventricular escape rhythms that have physiologically acceptable rates, *Circulation*, 109 (2004) 506-512.
- Poolos, N. P.**, Migliore, M., and Johnston, D., Pharmacological upregulation of h-channels reduces the excitability of pyramidal neuron dendrites, *Nat. Neurosci.*, 5 (2002) 767-774.
- Potapova, I.**, Plotnikov, A., Lu, Z., Danilo, P., Jr., Valiunas, V., Qu, J., Doronin, S., Zuckerman, J., Shlapakova, I. N., Gao, J., Pan, Z., Herron, A. J., Robinson, R. B., Brink, P. R., Rosen, M. R., and Cohen, I. S., Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers, *Circ. Res.*, 94 (2004) 952-959.
- Proenza, C.**, Tran, N., Angoli, D., Zahynacz, K., Balcar, P., and Accili, E. A., Different roles for the cyclic nucleotide binding domain and amino terminus in assembly and expression of HCN channels, *J Biol Chem*, 277 (2002) 29634-29642.
- Qu, J.** and Robinson, R. B., Cardiac ion channel expression and regulation: the role of innervation, *J. Mol. Cell Cardiol.* 2004., 37 (2004) 439-448.
- Qu, J. H.**, Plotnikov, A. N., Danilo, P., Shlapakova, I., Cohen, I. S., Robinson, R. B., and Rosen, M. R., Expression and function of a biological pacemaker in canine heart, *Circulation*, 107 (2003) 1106-1109.
- Ray, A. M.**, Benham, C. D., Roberts, J. C., Gill, C. H., Lanneau, C., Gitterman, D. P., Harries, M., Davis, J. B., and Davies, C. H., Capsazepine protects against neuronal injury caused by oxygen glucose deprivation by inhibiting I<sub>h</sub>, *J. Neurosci.*, 23 (2003) 10146-10153.
- Reid, J. M.**, Gwym, D. G., and Flumerfelt, B. A., Cytoarchitectonic and Golgi Study of Red Nucleus in Rat, *Journal of Comparative Neurology*, 162 (1975) 337-361.
- Reid, J. M.**, Flumerfelt, B. A., and Gwyn, D. G., Ultrastructural Study of Red Nucleus in Rat, *Journal of Comparative Neurology*, 162 (1975) 363-385.
- Reiss, W. G.** and Oles, K. S., Acetazolamide in the treatment of seizures, *Annals of Pharmacotherapy*, 30 (1996) 514-519.
- Robinson, R. B.**, Yu, H. G., Chang, F., and Cohen, I. S., Developmental change in the voltage-dependence of the pacemaker current, i<sub>f</sub>, in rat ventricle cells, *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, 433 (1997) 533-535.
- Rocchetti, M.**, Armato, A., Cavalieri, B., Micheletti, M., and Zaza, A., Lidocaine inhibition of the hyperpolarization-activated current (I<sub>f</sub>) in sinoatrial myocytes, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 34 (1999) 434-439.

- Russier, M.**, Carlier, E., Ankri, N., Fronzaroli, L., and Debanne, D., A-, T-, and H-type currents shape intrinsic firing of developing rat abducens motoneurons, *J. Physiol*, 549 (2003) 21-36.
- Santoro, B.**, Liu, D. T., Yao, H., Bartsch, D., Kandel, E. R., Siegelbaum, S. A., and Tibbs, G. R., Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain, *Cell*, 93 (1998) 717-729.
- Santoro, B.** and Tibbs, G. R., The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels, *Ann N Y Acad Sci*, (1999) 868741-868764.
- Santoro, B.**, Chen, S., Luthi, A., Pavlidis, P., Shumyatsky, G. P., Tibbs, G. R., and Siegelbaum, S. A., Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS, *J Neurosci*, 20 (2000) 5264-5275.
- Satoh, H.**, Identification of a hyperpolarization-activated inward current in uterine smooth muscle cells during pregnancy, *Gen Pharmacol*, 26 (1995) 1335-1338.
- Scholten, A.**, Charakterisierung von hyperpolarisationsaktivierten und zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen (HCN-Kanäle) in der Retina und im Gehirn der Ratte, Institut für Biologische Informationsverarbeitung, Forschungszentrum Jülich. - Dissertation, JUEL -3936 (2001)
- Schulze-Bahr, E.**, Neu, A., Friederich, P., Kaupp, U. B., Breithardt, G., Pongs, O., and Isbrandt, D., Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease, *J. Clin. Invest*, 111 (2003) 1537-1545.
- Sciancalepore, M.** and Constanti, A., Inward-rectifying membrane currents activated by hyperpolarization in immature rat olfactory cortex neurones in vitro, *Brain Res*, 814 (1998) 133-142.
- Seifert, R.**, Scholten, A., Gauss, R., Mincheva, A., Lichter, P., and Kaupp, U. B., Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (1999) 9391-9396.
- Semba, K.** and Egger, M. D., The Facial Motor-Nerve of the Rat - Control of Vibrissal Movement and Examination of Motor and Sensory Components, *Journal of Comparative Neurology*, 247 (1986) 144-158.
- Shabb, J. B.** and Corbin, J. D., Cyclic nucleotide-binding domains in proteins having diverse functions, *J. Biol. Chem.*, 267 (1992) 5723-5726.
- Sheng, M.** and Sala, C., PDZ domains and the organization of supramolecular complexes, *Annual Review of Neuroscience*, 24 (2001) 1-29.
- Shouse, M. N.**, Langer, J., Bier, M., Farber, P. R., Alcalde, O., Moghimi, R., Richkind, M., and Szymusiak, R., The alpha(2)-adrenoreceptor agonist clonidine suppresses seizures, whereas the alpha(2)-adrenoreceptor antagonist idazoxan promotes seizures in amygdala-kindled kittens: A comparison of amygdala and pontine microinfusion effects, *Epilepsia*, 37 (1996) 709-717.
- Sirois, J. E.**, Pancrazio, J. J., III, C. L., and Bayliss, D. A., Multiple ionic mechanisms mediate inhibition of rat motoneurons by inhalation anaesthetics, *J Physiol Lond*, 512 (1998) 851-862.
- Sirois, J. E.**, Lynch, C., III, and Bayliss, D. A., Convergent and reciprocal modulation of a leak K<sup>+</sup> current and I(h) by an inhalational anaesthetic and neurotransmitters in rat brainstem motoneurons, *J. Physiol*, 541 (2002) 717-729.
- Solomon, J. S.**, Doyle, J. F., Burkhalter, A., and Nerbonne, J. M., Differential expression of hyperpolarization-activated currents reveals distinct classes of visual cortical projection neurons, *J Neurosci*, 13 (1993) 5082-5091.
- Soltész, I.**, Lightowler, S., Leresche, N., Jassik, G. D., Pollard, C. E., and Crunelli, V., Two inward currents and the transformation of low-frequency oscillations of rat and cat thalamocortical cells, *J Physiol Lond*, 441 (1991) 175-197.
- Somogyi, P.** and Takagi, H., A note on the use of picric acid-paraformaldehyde-glutaraldehyde fixative for correlated light and electron microscopic immunocytochemistry, *Neuroscience*, 7 (1982) 1779-1783.
- Spain, W. J.**, Schwindt, P. C., and Crill, W. E., Anomalous Rectification in Neurons from Cat Sensorimotor Cortex In vitro, *Journal of Neurophysiology*, 57 (1987) 1555-1576.
- Stevens, D. R.**, Seifert, R., Bufe, B., Müller, F., Kremmer, E., Gauss, R., Meyerhof, W., Kaupp, U. B., and Lindemann, B., Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli, *Nature*, 413 (2001) 631-635.

- Stieber, J.**, Wieland, K., Stockl, G., Ludwig, A., Hofmann, F., Bradycardic and proarrhythmic properties of sinus node inhibitors, *Mol. Pharmacol.*, 69 (2006) 1328-1337
- Strauss, U.**, Kole, M. H., Brauer, A. U., Pahnke, J., Bajorat, R., Rolfs, A., Nitsch, R., and Deisz, R. A., An impaired neocortical I is associated with enhanced excitability and absence epilepsy, *Eur. J. Neurosci.*, 19 (2004) 3048-3058.
- Strominger, R. N.**, McGiffen, J. E., and Strominger, N. L., Morphometric and Experimental Studies of the Red Nucleus in the Albino-Rat, *Anatomical Record*, 219 (1987) 420-428.
- Stuart, G.** and Spruston, N., Determinants of voltage attenuation in neocortical pyramidal neuron dendrites, *Journal of Neuroscience*, 18 (1998) 3501-3510.
- Svoboda, K. R.** and Lupica, C. R., Opioid inhibition of hippocampal interneurons via modulation of potassium and hyperpolarization-activated cation (I<sub>h</sub>) currents, *J Neurosci*, 18 (1998) 7084-7098.
- Takigawa, T.**, Alzheimer, C., Quasthoff, S., and Grafe, P., A special blocker reveals the presence and function of the hyperpolarization-activated cation current I<sub>H</sub> in peripheral mammalian nerve fibres, *Neuroscience*, 82 (1998) 631-634.
- Tennigkeit, F.**, Schwarz, D. W., and Puil, E., Mechanisms for signal transformation in lemniscal auditory thalamus, *J Neurophysiol*, 76 (1996) 3597-3608.
- Tennigkeit, F.**, Schwarz, D. W., and Puil, E., Effects of metabotropic glutamate receptor activation in auditory thalamus, *J Neurophysiol*, 82 (1999) 718-729.
- Thollon, C.**, Bedut, S., Villeneuve, N., Coge, F., Piffard, L., Guillaumin, J. P., Brunel-Jacquemin, C., Chomar, P., Boutin, J. A., Peglion, J. L., Vilaine, J. P., Use-dependent inhibition of hHCN4 by ivabradine and relationship with reduction in pacemaker activity, *Br. J. Pharmacol.*, 150 (2007) 37-46
- Tian, L.** and Shipston, M. J., Characterization of hyperpolarization-activated cation currents in mouse anterior pituitary, *AtT20 D16:16 corticotropes*, *Endocrinology*, 141 (2000) 2930-2937.
- Travagli, R. A.** and Gillis, R. A., Hyperpolarization-activated currents, I<sub>H</sub> and I<sub>KIR</sub>, in rat dorsal motor nucleus of the vagus neurons in vitro, *J Neurophysiol*, 71 (1994) 1308-1317.
- Tremont-Lukats, I. W.**, Megeff, C., and Backonja, M. M., Anticonvulsants for neuropathic pain syndromes - Mechanisms of action and place in therapy, *Drugs*, 60 (2000) 1029-1052.
- Tsubokawa, H.**, Miura, M., and Kano, M., Elevation of intracellular Na<sup>+</sup> induced by hyperpolarization at the dendrites of pyramidal neurones of mouse hippocampus, *Journal of Physiology-London*, 517 (1999) 135-142.
- Tucker, C. L.**, Lee S. A., and Kennedy P. R. Re-defining rat red nucleus: Cytoarchitecture and connectivity. *Neurosci. Abstr.*, 15 (1989) 405.
- Ueda, K.**, Nakamura, K., Hayashi, T., Inagaki, N., Takahashi, M., Arimura, T., Morita, H., Higashiuesato, Y., Hirano, Y., Yasunami, M., Takishita, S., Yamashina, A., Ohe, T., Sunamori, M., Hiraoka, M., and Kimura, A., Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia, *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 27194-27198.
- Uemurasumi, M.**, Itoh, M., and Mizuno, N., The Distribution of Hypoglossal Motoneurons in the Dog, Rabbit and Rat, *Anatomy and Embryology*, 177 (1988) 389-394.
- Ulens, C.** and Tytgat, J., Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels, *J Biol Chem*, 276 (2001) 6069-6072.
- Van Bogaert, P. P.** and Pittoors, F., Use-dependent blockade of cardiac pacemaker current (I<sub>f</sub>) by cilobradine and zatebradine, *Eur. J. Pharmacol.*, 478 (2003) 161-171.
- Wainger, B. J.**, DeGennaro, M., Santoro, B., Siegelbaum, S. A., and Tibbs, G. R., Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels, *Nature*, 411 (2001) 805-810.
- Wang, Z.**, van den Berg, R. J., and Ypey, D. L., Hyperpolarization-activated currents in the growth cone and soma of neonatal rat dorsal root ganglion neurons in culture, *Journal of Neurophysiology*, 78 (1997) 177-186.
- Watson, C. R. R.**, Sakai, S., and Armstrong, W., Organization of the Facial Nucleus in the Rat, *Brain Behavior and Evolution*, 20 (1982) 19-28.

- Watts, A. E.**, Williams, J. T., and Henderson, G., Baclofen inhibition of the hyperpolarization-activated cation current, *I<sub>h</sub>*, in rat substantia nigra zona compacta neurons may be secondary to potassium current activation, *J Neurophysiol*, 76 (1996) 2262-2270.
- Weber, I. T.** and Steitz, T. A., Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, 198 (1987) 311-326.
- Webster, M. J.** and Rowe, M.H., Morphology of Identified Relay Cells and Interneurons in the Dorsal Lateral Geniculate-Nucleus of the Rat, *Experimental Brain Research*, 56 (1984) 468-474.
- Williams, J. T.**, Colmers, W. F., and Pan, Z. Z., Voltage-Activated and Ligand-Activated Inwardly Rectifying Currents in Dorsal Raphe Neurons *In vitro*, *Journal of Neuroscience*, 8 (1988) 3499-3506.
- Yanagida, H.**, Inoue, R., Tanaka, M., and Ito, Y., Temperature-sensitive gating of cation current in guinea pig ileal muscle activated by hyperpolarization, *Am J Physiol Cell Physiol*, 278 (2000) C40-C48.
- Yellen, G.**, The voltage-gated potassium channels and their relatives, *Nature*, 419 (2002) 35-42.
- Ying, S. W.**, Abbas, S. Y., Harrison, N. L., Goldstein, P. A., Propofol block of *I<sub>h</sub>* contributes to the suppression of neuronal excitability and rhythmic burst firing in thalamocortical neurons, *Eur. J. Neurosci.*, 23 (2006) 465-480
- Yu, H.**, Wu, J., Potapova, I., Wymore, R. T., Holmes, B., Zuckerman, J., Pan, Z., Wang, H., Shi, W., Robinson, R. B., El Maghrabi, M. R., Benjamin, W., Dixon, J., McKinnon, D., Cohen, I. S., and Wymore, R., MinK-related peptide 1: A beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation, *Circ Res*, 88 (2001) E84-E87.
- Zhou, F. M.** and Hablitz, J. J., Postnatal development of membrane properties of layer I neurons in rat neocortex, *Journal of Neuroscience*, 16 (1996) 1131-1139.
- Zicha, S.**, Fernandez-Velasco, M., Lonardo, G., L'Heureux, N., and Nattel, S., Sinus node dysfunction and hyperpolarization-activated (HCN) channel subunit remodeling in a canine heart failure model, *Cardiovascular Research*, 66 (2005) 472-481.

## **8. Danksagungen**

Besonders möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. K. Zilles für die Bereitstellung des Themas bedanken. Ich bin Ihm dankbar für die Unterstützung und die Ratschläge, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. T. Görcs danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die gute Betreuung der Arbeit, für seine Geduld, seine wissenschaftlichen aber auch privaten Ratschläge und dafür, dass er jederzeit offen für Fragen und Probleme war.

Herrn Prof. Dr. Kaupp und Frau Dr. Kremmer möchte ich für die Herstellung und Bereitstellung der Antikörper danken.

Mein herzlichster Dank gilt Frau Dr. E. Oermann für die wertvollen praktischen und theoretischen Ratschläge und für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Herrn Dipl.-Math. Kowalski, Herrn Simon möchte ich für die technische Unterstützung im ständigen Kampf mit dem Computer danken, sowie allen anderen Mitarbeitern des Institutes für ihre Hilfsbereitschaft danken. Frau Schäfer möchte ich für die moralische Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir dieses Studium ermöglicht hat. Danke für alles.

<b>Persönliche Daten</b>	Geburtstag: 01.05.1975
	Geburtsort: Kronstadt
	Staatsangehörigkeit: deutsch
	Familienstand: ledig
<b>Schulbildung:</b>	<b>1982 - 1983</b> Grundschule in Casablanca, Marokko
	<b>1983 - 1984</b> Deutsches Gymnasium in Kronstadt, Rumänien
	<b>1984 - 1988</b> Deutsches Gymnasium in Bukarest, Rumänien
	<b>1988 - 1995</b> Carl-Duisberg Gymnasium in Wuppertal
	<b>1995</b> Abschluss: Hochschulreife
<b>Ersatzdienst:</b>	<b>1995 - 1996</b> Rot-Kreuz Krankenhaus, München
<b>Studium:</b>	<b>10/96 - 06/04</b> <b>Humanmedizin</b> an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
	<b>09/99</b> Physikum
	<b>08/00</b> 1. Staatsexamen
	<b>03/03</b> 2. Staatsexamen
	<b>06/04</b> 3. Staatsexamen
	<b>seit 10/04</b> <b>Zahnmedizin</b> an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
	<b>seit 07/07</b> Stellvertretender Fachschaftsratsvorsitzender
<b>Beruf</b>	<b>seit 02/06</b> Assistenzarzt für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Malteser Krankenhaus St. Johannes-Stift, Duisburg Homberg
	<b>seit 06/07</b> Assistenzarzt für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Klinik für Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
<b>Praktika:</b>	<b>09/05</b> Hospitation in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie bei Dr. Dr. H. Sieber, Malteser Krankenhaus St. Johannes-Stift, Duisburg
	<b>01-02/06</b> Hospitation in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie bei Dr. Dr. H. Sieber, Malteser Krankenhaus St. Johannes-Stift, Duisburg
	<b>08/06</b> Hospitation in der Oral and Maxillofacial Surgery bei Dr. D. A. Behrman, NewYork-Presbyterian Hospital - New York Weill Cornell Center, NewYork, USA
	<b>09/06</b> Hospitation in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie bei Prof. P. Cascone und Prof. G. Iannetti, Universita degli Studi di Roma "La Sapienza", Policlinico Umberto I, Roma, Italien
<b>Praktisches Jahr:</b>	<b>04-08/03</b> Innere Medizin, Universitätsklinikum Düsseldorf
	<b>08-12/03</b> Chirurgie bei Mr. Bayla, Nelson R. Mandela, School of Medicine, University of Natal, Durban, Südafrika
	<b>12/03-02/04</b> Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie bei Prof. Richter, Hôpitaux Universitaires de Genève, Schweiz
<b>Famulaturen</b>	<b>03/01</b> Internistische Praxisfamulatur, Wuppertal
	<b>08/01</b> Anästhesie Famulatur, Kliniken der Landeshauptstadt Düsseldorf, Krankenhaus Benrath
	<b>09/01</b> Famulatur in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie bei Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Lentrodt, Universitätsklinikum Düsseldorf, Westdeutsche Kieferklinik
	<b>03/02</b> Praktikum der Allgemeinmedizin, St. Christina, Italien
	<b>08/02</b> Famulatur in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie bei Prof. mult. h.c. J. Bier, Universitätsklinikum Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt Universität zu Berlin

**Veröffentlichungen****03/01** Poster - Anatomische Gesellschaft, Münster

„The distribution of the subunit HCN-4 of hyper-polarization-activated, cyclic nucleotide gated ion channel in the rodent forebrain.” Teil 1: Cortex & Hippocampus

C. Räder, A. Scholten, E. Kremmer, T. J. Görcs, S. Pöggel, K. Zilles, U.B. Kaupp

**09/01** Poster - Anatomische Gesellschaft, Würzburg

„The distribution of the subunit HCN-4 of hyper-polarization-activated, cyclic nucleotide-gated ion channel in the rodent brain.” Teil 2: Mesencephalon & Rhombencephalon

C. Räder, A. Scholten, E. Kremmer, T.J. Görcs, S. Pöggel, K. Zilles, U.B. Kaupp



## Zusammenfassung

---

Seit der Entdeckung des  $I_h$ -Stromes in den späten 70ern und der Identifizierung und Klonierung vier verschiedener HCN-Gene fast 20 Jahre später hat das Interesse an der Erforschung dieser Ionenkanäle drastisch zugenommen. Die HCN-Kanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Generierung von rhythmisch elektrischer Aktivität, sowohl im Herzen als auch in bestimmten Regionen des zentralen Nervensystems. In anderen Gehirnregionen, die keine rhythmische Aktivität besitzen, weisen diese Kanäle eine Beteiligung an einer Vielfalt anderer wichtiger Funktionen auf, wie z.B. der Regulierung des Ruhemembranpotentials, der Synchronisation neuronaler Aktivitäten oder der Kontrolle der synaptischen Transmission. Die HCN1-4 Kanäle werden im Gehirn und im Herzen in unterschiedlichem Maße exprimiert und zeigen ein jeweils spezifisches Verteilungsmuster auf.

Um das Verteilungsmuster des HCN4-Kanalproteins im zentralen Nervensystem wiedergeben zu können, musste ein spezifischer Antikörper hergestellt und ein für diesen geeignetes immunhistochemisches Versuchsprotokoll entwickelt werden. Vier monoklonale und vier polyklonale Antikörper gegen den C-Terminus des HCN4-Kanalproteins wurden bereitgestellt. Die Epitop-Charakterisierung zeigte für jeden der getesteten Antikörper die jeweils spezifische Epitop-Region auf. Anschließend wurde eine Homologiesuche für die Aminosäure-Sequenz der jeweiligen Epitope durchgeführt. Diese zeigten, dass das jeweils untersuchte Epitop mit Aminosäure-Sequenzen anderer Proteine keine Übereinstimmung besitzt oder dass Proteine mit ähnlichen Aminosäure-Sequenzen nicht im Gehirn von Nagetieren vorkommen. Die immunhistochemischen Reaktionen der verschiedenen Antikörper wurden untereinander verglichen, sowohl in Ratten, als auch in Mäusen, Hamstern und Meerschweinchen. Das Verteilungsmuster der verschiedenen Antikörper war gleich, aber die besten immunhistochemischen Ergebnisse lieferte der SHG-1E5 Antikörper. Ein in der Zwischenzeit käuflich erwerblicher Antikörper der Firma Alomone (APC-052) wurde zur Überprüfung der Spezifität des SHG-1E5 Antikörper hinzugezogen. Insgesamt haben die Versuche aus dem ersten Teil dieser Arbeit - die Antikörper-Charakterisierung - die Spezifität des monoklonalen SHG-1E5 Antikörpers gegen das HCN4-Kanalprotein aufgezeigt. Dadurch konnte die spezifische Verteilungscharakteristik des HCN4-Kanalproteins im Gehirn und Rückenmark von Ratten untersucht werden.

HCN4 kommt in einer Vielzahl von Gehirnregionen vor und weist dort unterschiedliche Intensitäten auf. In Bereichen des Thalamus, Epithalamus, Hypothalamus, Cerebellum, Medulla spinalis und in allen somatomotorischen Kernen besitzen die HCN4-Kanalproteine ein ausgeprägtes bis sehr ausgeprägtes Vorkommen. Des Weiteren sind HCN4-Kanalproteine in allen Kerngebieten des akustischen Systems in unterschiedlicher Intensität zu finden. HCN4 immunopositive Reaktionen sind vor allem im Soma und in proximalen Dendriten zu finden. In einigen Regionen, wie z.B. Ncl. praeopticus medialis, Ncl. paraventricularis, Ncl. n. oculomotorius, Ncl. n. abducentis, Ncl. n. facialis, Ncl. ambiguus oder Ncl. praepositus hypoglossi, sind an den Perikaryen der HCN4 positiven Neuronen immunopositive punktähnliche Verdichtungen deutlich sichtbar. Je nach Lokalisation dieser (Plasmamembran oder Cytoplasma) könnte es sich um gruppierte Rezeptorkomplexe oder um Transportvesikel handeln.