

**Charakterisierung und Funktion von HCN
Kanälen im Kontext kardialer Rhythmogenese
und hippocampaler Oszillationsmuster**

vorgelegt von
Nana Samuel Kyei Duhme
2011

Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

präsentiert von

Diplom-Biologe Nana Duhme

geboren in Heilbronn

Danksagung:

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen. Mein Dank gilt im Besonderen:

Prof. Dr. med. Andreas Draguhn für die Betreuung der vorliegenden Arbeit und die damit verbundene intensive Heranführung an Elektrophysiologie.

Prof. Dr. Stefan Frings für die Begutachtung dieser Arbeit.

Dr. Claus Bruehl und Dr. Martin Both für ihre Hilfe, besonders bei technischen Schwierigkeiten.

Dr. Michael Koenen, Dr. med. Patrick Schweizer und Dr. med. Jörg Zehelein für die Vorbereitung des Projektes (*screening* der Patienten und Klonierung der mutierten HCN4 Kanäle).

Allen Kollegen der Arbeitsgruppe Draguhn für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung. Im Besonderen möchte ich Susanne Reichinnek danken, neben der es eine Freude war diese Arbeit niederzuschreiben.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, die in Gedanken stets bei mir waren.

Selbstständigkeitserklärung

(according to § 8 (3) b) and c) of the doctoral degree regulations: a) I hereby declare that I have written the submitted dissertation myself and in this process have used no other sources or materials than those expressly indicated, b) I hereby declare that I have not applied to be examined at any other institution, nor have I used the dissertation in this or any other form at any other institution as an examination paper, nor submitted it to any other faculty as a dissertation.)

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel (einschließlich elektronischer Medien und Online-Quellen) benutzt habe.

Alle wörtlich oder sinngemäß übernommenen Textstellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Heidelberg, _____

Gutachter:

- Prof. Dr. med. Andreas Draguhn
- Prof. Dr. rer. nat. Stephan Frings

Datum der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	xi
Zusammenfassung	xiii
Abstract	xv
1 Einleitung	1
1.1 HCN Familie	1
1.2 Struktur	2
1.3 Spannungsabhängigkeit und Aktivierungskinetik	3
1.4 Ionenleitfähigkeit	4
1.5 Modulation durch cAMP	4
1.6 Modulation durch pH und regulatorische Untereinheiten	5
1.7 Homo-/Heteromerisierung	5
1.8 Lokalisation der HCN Subtypen	6
1.9 Physiologische Rolle von HCN Kanälen	6
1.9.1 Modell der Herzfrequenzmodulation	7
1.9.2 Rolle von I_h bei dendritischer Integration	7
1.9.3 Rolle von I_h bei rhythmischen Oszillationen	9
1.10 Anatomie des Hippocampus	12
1.11 Ziel der Arbeit	12
2 Material und Methoden	15
2.1 Materialien	15
2.2 Lösungen und Medien	15
2.2.1 Lösungen für die Zellkultur und die Transfektion	15
2.2.2 Lösungen für die <i>patch-clamp</i> Experimente	15
2.2.3 Lösungen für die Präparation der Hippocampusschnitte und Mes- sung der Feldpotentiale	16
2.3 Plasmidvektoren	16
2.4 Zelllinien und heterologe Genexpression	18
2.4.1 Kulturbedingungen für die Zelllinien	18
2.4.2 Transiente Transfektion von HEK 293 Zellen	18
2.4.3 Identifizierung transfizierter HEK 293 Zellen	18

2.5	<i>patch-clamp</i> Technik	19
2.5.1	Messstand und Prinzip der <i>patch-clamp</i> Technik	19
2.5.2	Durchführung der Messung	20
2.6	Spannungsprotokolle	21
2.7	Auswertung der <i>patch-clamp</i> Daten	23
2.8	Tiere und die Herstellung vitaler Hippocampusschnitte	24
2.9	Feldpotentiale	25
2.9.1	Messstand und Prinzip der Feldpotentialmessungen	25
2.9.2	Durchführung der Messung	25
2.10	Auswertung der Messdaten/ Datenanalyse	25
2.11	Statistik	28
3	Ergebnisse	31
3.1	Pathologie der HCN4-695X Mutationsträger	31
3.2	Funktionelle Untersuchung der HCN4-695X Mutante	32
3.2.1	Umkehrpotential (E_{rev}) des HCN4-695X Kanals	32
3.2.2	Spannungsabhängigkeit der Aktivierung des HCN4-695X Kanals	33
3.2.3	Kinetik der Aktivierung des HCN4-695X Kanals	33
3.2.4	Deaktivierungseigenschaften des HCN4-695X Kanals	34
3.2.5	Aktivierung des heteromeren HCN4/HCN4-695X Kanals	35
3.3	Klinik der HCN4 K530N Mutante	36
3.4	Funktionelle Untersuchung	36
3.4.1	Umkehrpotential (E_{rev}) des HCN4 K530N Kanals	37
3.4.2	Spannungsabhängigkeit der Aktivierung des HCN4 K530N Kanals	37
3.4.3	Kinetik der Aktivierung des HCN4 K530N Kanals	38
3.4.4	Deaktivierungseigenschaften des HCN4 K530N Kanals	39
3.4.5	Aktivierung des heteromeren HCN4/HCN4 K530N Kanals	39
3.5	Feldpotentiale	42
3.5.1	Die kontinuierliche Applikation des I_h Blockers reduzierte die SPW-R Frequenz sowie die Amplitude der evozierten Feldpotentiale	42
3.5.2	Blockade der transient aktivierbaren Calcium Kanäle erhöht die SPW-R Frequenz in CA1 Stratum pyramidale, reduziert die Amplituden der SPW-R und mindert die Amplitude der evozierten Feldpotentiale in CA1 Pyramidale und CA3 Radiatum	47
3.5.3	Kurzzeitige Applikation des I_h Blockers mindert die SPW-R Frequenz, erhöht die SPW-R Amplitude und verringert die Amplitude der evozierten Feldpotentiale	50
3.5.4	Nach Durchtrennung der Schaffer Kollateralen verringert die Blockade des I_h ebenfalls die SPW-R Amplitude	53

3.5.5	In Kontrollexperimenten blieben die untersuchten Parameter über die Zeit konstant	55
4	Diskussion	59
	Referenzen	65

Abkürzungen

HCN Kanal	hyperpolarisations-aktivierter und durch cyclische Nukleotide-modulierter Kanal
I_h , I_f	Hyperpolarisations-aktivierter Strom
CNG Kanal	cyklische Nukleotid-gesteuerter Kanal
CNBD	cyklische Nukleotid-Bindedomäne
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyklisches Guanosinmonophosphat
P_{Na}/P_K	relative Permeabilität für Natrium- und Kaliumionen
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
SPW-R	<i>sharp wave-ripple</i>
ACSF	Artefizielle CerebroSpinale Flüssigkeit
HCN4-695X	HCN4 Untereinheit mit trunkierter cyclischen Nukleotid-Bindedomäne
HCN4 K530N	HCN4 Untereinheit in der Lysin an Position 530 gegen Asparagin ausgetauscht ist
ePSP	evoziertes postsynaptisches Potential
PopSpike	Summenaktionspotential
E_{rev}	Umkehrpotential
$V_{\frac{1}{2}}$	Potential der halbmaximalen Aktivierung
V_c	Steigung im Punkt $V_{\frac{1}{2}}$
I_{SS}	<i>steady-state</i> Strom
I_{INS}	instantaner Strom
ΔI_{INS}	I_{INS} normalisiert auf I_{SS}
CA1/3	Cornu Ammonis 1/3
pyr	Stratum pyramidale
rad	Stratum radiatum
ETX	Ethosuximid
wt	Wildtyp

Zusammenfassung

Der hyperpolarisations-aktivierte und durch cyclische Nukleotide modulierbare Kationenstrom I_h (I_f im Herzen) und sein Vorkommen in verschiedensten Zelltypen sind schon seit langer Zeit bekannt. Die genetischen und molekularen Grundlagen, die diesen Strom vermitteln, wurden vor einigen Jahren entschlüsselt. Er wird durch sogenannte HCN Kanäle vermittelt, die in 4 Subtypen (HCN1 - 4) vorkommen. HCN Kanäle werden in vielen Geweben exprimiert, darunter in kardialen Sinusknotenmyozyten sowie in hippocampalen Prinzipal- und Interneuronen. In den letzten Jahren wurden alle Subtypen elektrophysiologisch charakterisiert.

In Zellen des Sinusknotens wird der Anstieg der diastolischen Depolarisation maßgeblich vom Schrittmacherstrom I_f bestimmt. In den vergangenen Jahren wurden mehrere Studien veröffentlicht die belegen, dass heterozygote Mutationen im HCN4 Gen zu erblichen Herzrhythmusstörungen führen können. In dieser Arbeit wurden zwei HCN4 Mutanten untersucht, die aus zwei verschiedenen Patientenfamilien stammen. Mutationsträger der ersten Familie leiden an einer deutlichen Sinus-Bradykardie, sind jedoch chronotrop kompetent. Die Mutation wird durch eine Insertion von 13 Nukleotiden an Position 1933 im HCN4 Gen verursacht. Dies hat einen *frame shift* zur Folge, wodurch ein frühzeitiges Stop-Codon entsteht. Der folgende Kettenabbruch führt zu einer trunkeierten cyclischen Nukleotid-Bindedomäne (HCN4-695X). Die elektrophysiologische Charakterisierung ergab, dass der HCN4-695X Kanal insensitive gegen cAMP ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die cAMP-Sensitivität in der heteromeren Konfiguration dominant-negativ supprimiert wird. Dieser Befund, sowie die chronotrope Kompetenz (Herzfrequenzsteigerung durch beta-adrenerge Stimulation) der Patienten sprechen dafür, dass I_f nicht allein für die Herzfrequenzregulation verantwortlich ist.

Die K530N Mutation ist mit einer leicht bradykarden Herzfrequenz assoziiert. In höherem Lebensalter (>55 Jahre) entwickelt sich eine Sinusknotendysfunktion mit chronischem Vorhofflimmern und Tachykardie-Bradykardie Symptomatik. Die HCN4 K530N Mutation liegt im sogenannten C-Linker, einer intrazellulären Domäne des Kanalproteins. Hier führt eine Punktmutation zum Austausch des positiv geladenen Lysins (K) durch das neutrale Asparagin (N). Die elektrophysiologische Charakterisierung ergab, dass erst in der heteromeren Konfiguration drastische Unterschiede zum Tragen kommen. Die Aktivierungskurve des heteromeren Kanals verschob sich in Richtung negativerer Potentiale, so dass wesentlich stärkere Hyperpolarisationen zur Aktivierung benötigt werden. Unter basalen Bedingungen dürfte daher der Beitrag des I_f zur diastolischen Depolarisation

geringer sein als bei nativen Kanälen. Der langsamere Anstieg des Membranpotentials bis zum Erreichen der Aktionspotentialschwelle kann die leichte Bradykardie erklären. Neben der Schrittmacherfunktion im Herzen spielen HCN Kanäle auch bei der Integration neuronaler Signale und bei der Genese rhythmischer Netzwerkaktivität eine wichtige Rolle. Dies wurde am Beispiel der *sharp wave-ripple* (SPW-R) Komplexe untersucht, einem Aktivitätsmuster hippocampaler Netzwerke, das zur Konsolidierung des Raumgedächtnisses beiträgt. Auch in *in vitro* Schnittpräparationen sind diese SPW-Rs zu beobachten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Effekt der Blockade von I_h in horizontalen Hippocampusschnitten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Blockade des I_h die Frequenz der spontan auftretenden SPW-Rs in der CA1 Region reduzierte. Weiterhin hatte die Blockade des I_h eine Erhöhung der SPW-R Amplituden zur Folge. Dies zeigt, dass I_h eine wichtige Funktion bei der zeitlichen Verarbeitung von Signalen in neuronalen Netzwerken hat. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass I_h essentiell für die Erhaltung rhythmischer und synchroner Aktivität ist.

Abstract

Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels comprise a small subfamily of proteins within the superfamily of cation channels. In mammals, the HCN channel family consists of four members (HCN1 - 4) that are expressed in the heart and the nervous system. The current produced by HCN channels has been known as I_h (or I_f). In sinoatrial node myocytes I_f plays a key role in the generation and autonomic regulation of sinus rhythm and rate. More specifically, I_f determines the slope of the diastolic depolarization of pacemaker cells. Recently, more and more mutations in the gene coding for the HCN4 pacemaker channel have been found to be associated with inherited sinus bradycardia. Up to now four mutant HCN4 proteins have been electrophysiologically characterised.

In this study, two HCN4 mutants, derived from two different families, were investigated. Carriers of the first mutation suffer from severe sinus bradycardia. The mutation is caused by an insertion of 13 nucleotides at position 1933 inducing a premature termination codon, yielding a truncated cyclic nucleotide binding domain (HCN4-695X). Electrophysiological investigation showed that HCN4-695X channels were insensitive towards cAMP. Furthermore, co-expression of mutant and wild type subunits induced currents with properties nearly identical to currents produced by homomeric mutant channels, indicating a dominant-negative effect of mutant subunits on wild type current. Importantly, all individuals carrying the mutation displayed full ability to accelerate heart rate under physical activity or pharmacological stimulation. Thus, cAMP-mediated modulation of I_f critically determines basal heart rate but is not essential for autonomic rate response in humans.

The other mutation is associated with a mild bradycardia. During later stages of life patients carrying the mutation develop sinoatrial node dysfunctions comprising chronic atrial fibrillation and tachycardia-bradycardia symptoms. The underlying mutation (HCN4 K530N) is located in front of the cyclic nucleotide binding domain, where the positively charged amino acid lysine (K) is replaced by the neutral amino acid asparagine (N) at amino acid position 530. The electrophysiological characterization showed no differences between wild type and mutant channel. Drastic effects only came to action in the heteromeric conformation. The activation curve of the heteromeric channel was shifted towards negative potentials. As a result, these channels conduct less current during diastolic depolarisation, which in turn results in slowing the heart rate.

Despite their role in cardiac pacemaker cells, I_h channels are also involved in dendritic

integration and the generation of rhythmic activity in neuronal networks. I_h is highly expressed within the CA1 subfield of the mammalian hippocampus. Furthermore, the hippocampus displays a variety of state-dependent network oscillations. Particular oscillation patterns are so called sharp wave-ripples (SPW-R) which have been implicated in memory consolidation. Hippocampal slices *in vitro* express spontaneously occurring SPW-Rs. These SPW-Rs originate in the CA3 subfield and propagate along CA1 towards the entorhinal cortex. Accordingly, the contribution of I_h channels on the SPW-R oscillation was investigated in the subfields CA1 and CA3. I_h blockage reduced the frequency of SPW-Rs in CA1. Furthermore, the amplitude of SPW-Rs was increased in both regions. Thus, I_h has an important modulatory effect on temporal summation of synaptic input in the hippocampus.

In summary, I_h is essential for maintaining rhythmic and synchronized activity.

1 Einleitung

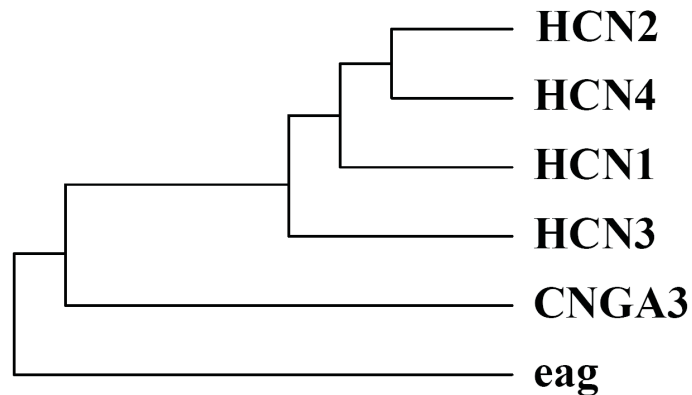
Komplexe und multizelluläre Organismen benötigen einen schnellen und präzisen Informationsaustausch zwischen Zellen und Geweben. In Vertebraten steuern elektrische Signale beispielsweise die Kontraktion von Muskeln, die Hormonsekretion, die Wahrnehmung der Umwelt sowie Informationsbearbeitung im Gehirn. Die elektrischen Signale entstehen durch ein fein reguliertes Öffnen und Schließen von verschiedenen Ionenkanälen. Bis heute sind über 140 Proteine bekannt, die der Superfamilie der Ionenkanäle angehören. Eine der außergewöhnlichsten Kanalfamilie stellen die hyperpolarisationsaktivierten und durch zyklische Nukleotide-modulierten (HCN) Kanäle dar. Im Gegensatz zu allen anderen spannungsgesteuerten Ionenkanälen werden HCN Kanäle durch hyperpolarisierende Membranpotentiale aktiviert. Aufgrund dieser unerwarteten Eigenschaft wurde der entsprechende Strom bei der Entdeckung I_f für „*funny*“ oder auch I_q für „*queer*“ genannt. Die heutzutage gängigste Bezeichnung ist I_h („*hyperpolarization*“, im Herzen spricht man aus historischen Gründen auch immer noch von I_f). Diesem Strom werden verschiedene physiologische Funktionen, wie z.B. Schrittmachereigenschaften in kardialem und neuronalem Gewebe, Regulation des Ruhemembranpotentials und neuronale Plastizität zugeschrieben. Vor allem bei der Steuerung rhythmischer Oszillationen scheint I_h eine wichtige Rolle zu spielen, so z.B. im Thalamus zur Kontrolle des Aufmerksamkeitsverhaltens oder auch in speziellen Zellen des kardialen Reizleitungssystems zur Generierung regelmäßiger Aktionspotentiale. Wie I_h tatsächlich zu diesen physiologischen Funktionen beiträgt ist teilweise immer noch unklar. Besonders die Rolle von I_h Kanälen als Schrittmacher des Sinusrhythmus im Herzen wird kontrovers diskutiert.

1.1 HCN Familie

Ungefähr 20 Jahre nach der ersten Charakterisierung des I_f (Noma und Irisawa, 1976, Brown et al., 1979) gelang es 1998 mehreren Arbeitsgruppen unabhängig voneinander verschiedene cDNAs, die den Schrittmacherkanal kodieren, zu klonieren (Gauss et al., 1998, Ludwig et al., 1998, Santoro et al., 1998, Ludwig et al., 1999). In Säugetieren wurden vier Subtypen identifiziert (HCN1 bis HCN4). Aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft zählen HCN Kanäle zur Familie der spannungsgesteuerten Kationenkanäle. Am nächsten verwandt sind ihnen die zyklische Nuklotid-gesteuerten (CNG) Kanäle und

die spannungsgesteuerten Kalium Kanäle der *ether à go-go* (EAG) Familie (Abbildung 1.1).

Abbildung 1.1:
Phylogenetischer
Stammbaum der
HCN Kanäle und
verwandter Kanäle.
Dargestellt sind die
Verwandtschaftsbe-
ziehungen der HCN
Kanäle untereinander
sowie zu CNG (ver-
treten durch CNGA3)
Kanälen als auch zu
Kaliumkanälen (vertre-
ten durch eag). (Much,
2003)



1.2 Struktur

Ein funktioneller HCN Kanal besteht aus 4 Untereinheiten, wobei jede Untereinheit 6 Transmembransegmente besitzt (Abbildung 1.2). Innerhalb der Transmembrandomänen ist das S4-Segment mit seinen zehn positiv geladenen Aminosäuren (Arginin und Lysin) ein Spannungssensor, der auf Änderungen des Membranpotentials reagieren kann (Mannikko et al., 2002). Dies führt zu einer nicht vollständig geklärten Konformationsänderung des Proteins (*gating*) und zur Öffnung der ionenleitenden Pore (P Helix), die sich zwischen Transmembransegment S5 und S6 befindet. Im C-Terminus befindet sich eine Bindungsdomäne für cyclische Nukleotide (CNBD, cyclische Nukleotid-Bindedomäne), die deutliche Sequenzhomologie zu CNBDs anderer Proteine aufweist. Als Beispiele seien hier die cAMP und cGMP abhängigen Proteinkinasen (Pfeifer et al., 1999) und die CNG-Kanäle (Biel et al., 1999) genannt, wobei zu letzteren die Homologie am größten ist. Der N-Terminus scheint eine wichtige Rolle für die korrekte Zusammenlagerung der 4 Untereinheiten zum funktionsfähigen Kanal zu spielen. Die vier HCN-Subtypen zeigen in den Transmembrandomänen und der CNBD eine ausgeprägte Sequenzhomologie von etwa 90 %, während die N- und C-terminalen Regionen zwischen den Subtypen stark variieren. Speziell die Porenregion mit dem Selektivitätsfilter zeigt große Ähnlichkeit mit der Pore von Kaliumkanälen, vermittelt aber überraschenderweise keine Selektivität für Kaliumionen und leitet auch Natriumionen.

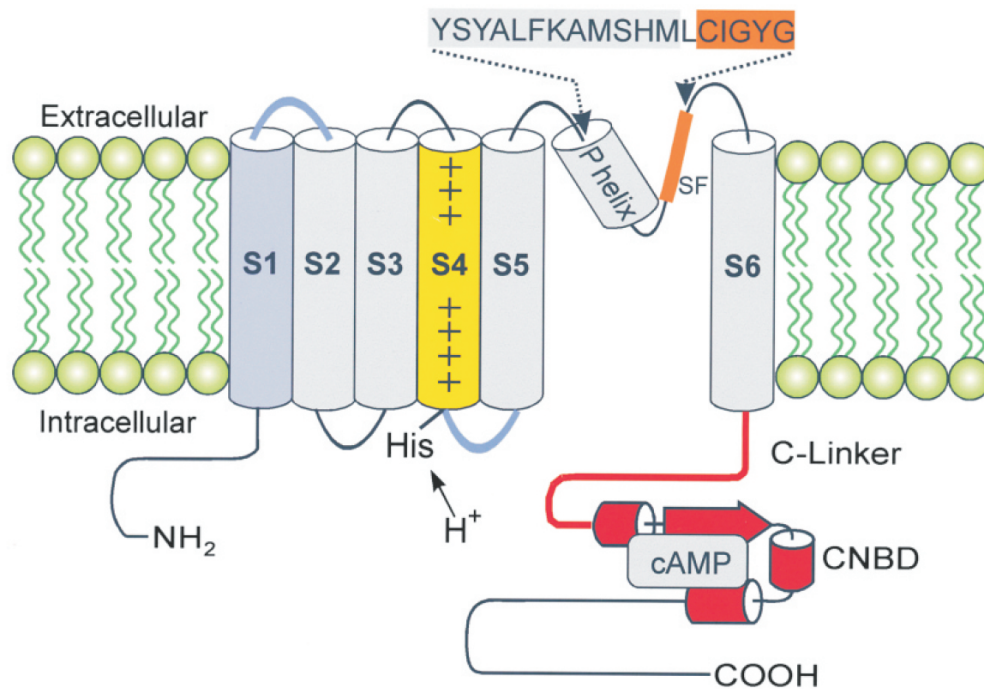
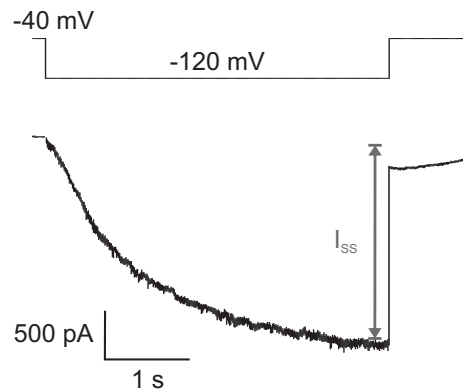


Abbildung 1.2: Strukturmodell der Hyperpolarisations-aktivierten und durch cyclische Nucleotide modulierten (HCN) Kanäle. Jede Untereinheit weist zwei funktionelle Teile auf: die Kernregion bestehend aus den sechs Transmembransegmenten (S1-S6) inklusive der P Helix zwischen S5 und S6, die die Pore bildet; und dem modulatorischen C-Terminus, der den C-Linker und die cyclische Nucleotidbindestelle (CNBD) enthält. Der Spannungssensor wird von der positiv-geladenen S4 Helix gebildet. Die S1 Helix, der extrazelluläre S1-S2 Linker und der intrazelluläre S4-S5 Linker - die für das „gating“ von Bedeutung sind - sind hervorgehoben. Ein Histidinrest an der Schnittstelle zwischen S4 und dem S4-S5 Linker vermittelt die pH-Sensitivität. Die Porenregion enthält neben der P Helix auch den Selektivitätsfilter (CIGYG-Motiv), der für die Permeationseigenschaften verantwortlich ist. (Biel et al., 2002)

1.3 Spannungsabhängigkeit und Aktivierungskinetik

HCN Kanalströme entwickeln sich mit einem charakteristischen sigmoidalen Zeitverlauf (Abbildung 1.3). Jeder Subtyp kann aufgrund seiner Aktivierungskinetik identifiziert werden. HCN1 zeigt die schnellste Kinetik (die Zeitkonstante τ variiert von 100 bis 300 ms bei -130 bis -100 mV), gefolgt von HCN2 und HCN3 (τ von 200 bis 500 ms bei -140 bis -100 mV) (Santoro et al., 2000, Stieber et al., 2005). Die Aktivierungskinetik des HCN4 Kanals ist am langsamsten (im Bereich von wenigen hundert ms bei -150 mV bis zu 30 s bei -70 mV, Ludwig et al., 1999). Die Geschwindigkeit ist stark von den experimentellen Bedingungen, wie Membranpotential, pH und Temperatur abhängig, was die Vergleichbarkeit von Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen erschwert.

Abbildung 1.3: Die Aktivierung des I_h Stroms ist spannungsabhängig. (Oben) Ein exemplarischer Spannungssprung von -40 auf -120 mV öffnet HCN Kanäle. (Unten) Die resultierende Stromantwort. Mit anhaltender Hyperpolarisation nimmt die Stromamplitude zu bis der „steady-state“ (I_{SS}) erreicht wird.



1.4 Ionenleitfähigkeit

Der engste Teil der Pore (Selektivitätsfilter) besitzt das GYG (Glycin-Tyrosin-Glycin)-Motiv, das für Kaliumkanäle charakteristisch ist (Macri et al., 2002). Obwohl HCN Kanäle bevorzugt Kaliumionen leiten, können andere Kationen wie Natriumionen ebenfalls passieren ($P_{Na}/P_K \sim 0.3$, (Wollmuth und Hille, 1992)). Unter physiologischen Bedingungen leiten HCN Kanäle hauptsächlich einen depolarisierenden Na^+ -Einwärtsstrom. Die molekularen Grundlagen für diese geringe Selektivität im Gegensatz zu Kaliumkanälen sind bis jetzt noch nicht geklärt, aber es scheinen wohl auch Strukturen außerhalb des eigentlichen Filters eine wichtige Rolle für die Regulation der Ionenleitfähigkeit zu spielen.

1.5 Modulation durch cAMP

Wie die verwandten CNG Kanäle besitzen auch die HCN Kanäle eine CNBD (zyklische Nukleotid-Bindedomäne) und sind direkt durch zyklische Nukleotide (cAMP bzw. cGMP) modulierbar. Dabei ist der Effekt von cAMP deutlich stärker ausgeprägt als der von cGMP und bewirkt eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung in Richtung positiverer Potentiale. Weniger starke Hyperpolarisationen reichen daher aus, um den ligandierten Kanal zu aktivieren. Außerdem verursacht cAMP eine Steigerung der Aktivierungsgeschwindigkeit, der steady-state Strom bei einem bestimmten Potential wird also schneller erreicht. Die verschiedenen Subtypen der HCN Kanäle unterscheiden sich in ihrer Modulierbarkeit durch cAMP. Am stärksten sprechen die Subtypen HCN2 und HCN4 auf zyklische Nukleotide an und zeigen dabei eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurven zu positiveren Potentiale von etwa 15 mV (Ludwig et al., 1999). HCN1 dagegen zeigt mit einer Verschiebung der Aktivierungskurve von 0 bis 7 mV eine geringe Reaktion (Moroni et al., 2001, Ulens und Tytgat, 2001). Über den Mechanismus der Modulation durch cAMP herrschte lange Unklarheit. Erst 2001 schlugen Wainger und Kollegen ein Modell vor, bei dem der C-Terminus mit der

CNBD eine entscheidende Rolle spielt. Durch Untersuchungen an verschiedenen Kanalchimären und trunkierten Kanälen entwickelten sie die Vorstellung, dass der C-Terminus bei nicht gebundenem cAMP mit den Transmembransegmenten interagiert und so das *gating* des Kanals inhibiert. Es kommt dadurch zu einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung zu negativeren Potentialen. Bindet nun cAMP an die CNBD, wird diese Inhibierung aufgehoben und der Kanal kann bei positiveren Potentialen aktiviert werden. Durch dieses Modell lassen sich auch die grundsätzlichen Unterschiede in der cAMP-Sensitivität der einzelnen HCN-Isoformen erklären. Die gut modulierbaren HCN2 und HCN4 und der schlecht modulierbare HCN1 zeigen demnach eine unterschiedlich stark ausgeprägte basale Inhibierung durch den C-Terminus. Je stärker diese basale Inhibierung, desto stärker auch der Effekt von cAMP.

1.6 Modulation durch pH und regulatorische Untereinheiten

Neben der Modulation durch cyclische Nukleotide werden HCN Kanäle auch durch den intrazellulären pH-Wert beeinflusst. Ein niedriger cytosolischer pH-Wert wirkt dabei inhibierend auf den Strom (Munsch und Pape, 1999), während ein niedriger extrazellulärer pH-Wert den Kanal aktiviert (Stevens et al., 2001).

In den letzten Jahren gibt es auch vermehrt Hinweise, dass verschiedene Proteinkinasen an der Feinregulation von HCN-Kanälen beteiligt sind. Die Src-Kinase etwa bindet an den Kanal und beschleunigt die Aktivierungskinetik durch Phosphorylierung eines Tyrosin-Restes (Zong et al., 2005). Ein weiteres Beispiel ist die p38 (*mitogen-activated protein kinase*). Wird sie in hippocampalen Pyramidenzellen spezifisch inhibiert, verringert sich der I_h -Strom und es kommt zu einer Hyperpolarisation des Membranpotentials (Poolos et al., 2006).

Außer der Interaktion mit speziellen Kinasen konnte auch eine Modulation durch das Protein MiRP1 nachgewiesen werden. Dieses steigert sowohl in heterologen Expressionssystemen (Yu et al., 2001), als auch in ventrikulären Myozyten der Ratte (Qu et al., 2004) die Stromdichte von I_h und die Aktivierungsgeschwindigkeit des Stroms. Ebenfalls dokumentiert ist die Beeinflussung der Stromkinetik durch das Gerüstprotein Filamin A (Gravante et al., 2004).

Es ist anzunehmen, dass noch etliche cytosolische Proteine identifiziert werden, die als regulatorische Untereinheiten fungieren und Einfluss auf das *gating* von HCN-Kanälen ausüben.

1.7 Homo-/Heteromerisierung

In manchen Zelltypen werden mehrere HCN Subtypen exprimiert. In Sinusknotenzellen beispielsweise werden HCN2 und HCN4, in Pyramidenzellen des Hippocampus HCN1

und HCN2 exprimiert. Der tatsächliche Beweis für eine Heteromerisierung konnte bislang noch nicht erbracht werden. Mehrere Gruppen konnten allerdings zeigen, dass sowohl die Expression eines Tandem-Dimers (HCN1-HCN2) (Ulens und Tytgat, 2001), als auch die Co-Expression einzelner Untereinheiten (HCN1 und HCN2) (Chen et al., 2001) in heterologen Systemen wie HEK 293 oder *Xenopus* Oozyten zu I_h -Strömen führen, die intermediäre Eigenschaften zu den jeweiligen Homomeren hatten.

1.8 Lokalisation der HCN Subtypen

Das Expressionsmuster der vier HCN Subtypen wurde von verschiedenen Gruppen erarbeitet. HCN1 wird stark in Gehirnarealen wie z.B. im Hippocampus (Ludwig et al., 1998, Santoro et al., 1998, Moosmang et al., 1999, Shi et al., 1999) exprimiert. Kleine Mengen konnten auch im Sinusknoten und den Purkinjefasern nachgewiesen werden (Shi et al., 1999). HCN2 mRNA wurde ebenfalls im Gehirn und im Herzen gefunden (Ludwig et al., 1998). Die stärkste Expression von HCN2 zeigte sich im Bulbus Olfactorius, im cerebralen Cortex, Amygdala, Cerebellum, Gehirnstamm sowie im Hippocampus (Moosmang et al., 1999). Große Mengen an HCN3 konnten bislang nur in Leber-, Lungen- und Nierengewebe gefunden werden (Santoro und Tibbs, 1999). HCN4 wurde im Gehirn im Bulbus Olfactorius, der Habenula, dem Thalamus (Ludwig et al., 1998) und der Substantia Nigra (Moosmang et al., 1999) detektiert. Große Mengen an HCN4 mRNA konnten auch im Herzen, besonders in Sinusknotenzellen gefunden werden (Shi et al., 1999). Notomi und Shigemoto (Notomi und Shigemoto, 2004) konnten die subzelluläre Lokalisation aller 4 HCN Isoformen im Hippocampus immunohistochemisch beschreiben. In der CA1 Region des Hippocampus wurden intensive Signale des HCN1 und HCN2 im Stratum lacunosum moleculare detektiert. Die Signalstärke nahm in Pyramidenneuronen vom apikalen Dendriten entlang der Membran zum Soma hin ab. In der CA3 Region wurden intensive Signale des HCN1 und moderate Signale des HCN2 im Stratum lacunosum moleculare nachgewiesen. In der Pyramidenzellschicht aller Hippocampusregionen konnten HCN1 und HCN2 detektiert werden, HCN3 und HCN4 sind hingegen nicht vertreten. Auf elektronenmikroskopischer Ebene konnten HCN1 und HCN2 auch in Axonen und Axonendigungen von Korbzellen, die auf Pyramidenzellen projizieren, nachgewiesen werden. (Abschnitt 1.10 beschreibt das laminare Profil des Hippocampus)

1.9 Physiologische Rolle von HCN Kanälen

I_h besitzt einzigartige biophysikalische Merkmale, die essentiell für die Feinregulation elektrischer Erregbarkeit und Reaktionsfähigkeit von Zellen sind. Im Hinblick auf die physiologische Bedeutung sind zwei Eigenschaften von besonderer Bedeutung für die

Einstellung des Ruhemembranpotentials. Erstens sind ein Teil der I_h Kanäle im Ruhezustand (von Neuronen) geöffnet. Zweitens besitzen I_h Kanäle eine intrinsische negative Feedback-eigenschaft, da sie sowohl Hyperpolarisationen als auch Depolarisationen der Membran entgegenwirken; wird die Membran hyperpolarisiert werden I_h Kanäle aktiviert und leiten einen Natriumeinwärtsstrom, der die Membran depolarisiert. Wird die Membran depolarisiert schließen I_h Kanäle und der ausbleibende Natriumeinwärtsstrom hat den Nettoeffekt einer Hyperpolarisation. So werden inhibitorische oder exzitatorische Signale aktiv gedämpft.

1.9.1 Modell der Herzfrequenzmodulation

Bei dem von DiFrancesco postulierten Modell der Herzfrequenzmodulation besitzt I_f eine Schlüsselrolle. Gegen Ende eines Aktionspotentials von Sinusknotenschrittmacherzellen, wenn die Membran durch den Kaliumausstrom hyperpolarisiert wird, werden HCN Kanäle geöffnet. Der resultierende Einwärtsstrom depolarisiert (diastolische Depolarisation) die Membran bis zum Erreichen der Aktionspotentialschwelle. Durch Stimulation beta-adrenerger Rezeptoren kommt es zu einer intrazellulären Erhöhung des cAMP-Spiegels, was eine beschleunigte Aktivierung des I_f -Stroms zur Folge hat (DiFrancesco und Tortora, 1991). Die Steigung der Depolarisation nimmt zu, die Aktionspotentialschwelle wird eher erreicht, wodurch die Herzfrequenz gesteigert werden kann (siehe Modell Abbildung 1.4).

Allerdings tragen in dieser Phase des Aktionspotentials sicher auch noch andere Leitfähigkeiten und regulatorische Mechanismen bei. In dem von Lakatta (Lakatta et al., 2010) vorgeschlagenen Szenario bilden die Gesamtheit der auftretenden Ströme eine sog. „*voltage-clock*“, welche mit den rhythmischen, Ryanodinrezeptor-vermittelten intrazellulären Calcium Freisetzungen interagieren („*calcium-clock*“). Die Ströme werden von L- und T-Typ Ca^{2+} Kanälen (I_{CaL} , I_{CaT}), dem „*delayed rectifier*“ (I_K) und dem Na^+/Ca^{2+} Austauscher (I_{NCX}) generiert. Diese Proteine werden von der Proteinkinase A oder von der Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMK II) phosphoryliert, sie werden also in Abhängigkeit von cAMP und Ca^{2+} moduliert. Konzertiert machen beide „*clocks*“ den größten Teil der autonomen Frequenzregulation aus (Maltsev et al., 2011).

1.9.2 Rolle von I_h bei dendritischer Integration

Dendritische Integration ist ein wichtiger Prozess der Signalverarbeitung vieler Neurone. Ein einzelnes exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) ist in der Regel nicht ausreichend, um das Ruhemembranpotential so stark zu depolarisieren, dass die Aktionspotentialschwelle überschritten wird. Deshalb müssen am Soma mehrere synaptische Signale integriert werden. Um die Genauigkeit der Informationsverarbeitung zu gewährleisten, muss die Integration der EPSPs zeitlich und räumlich streng kontrolliert werden.

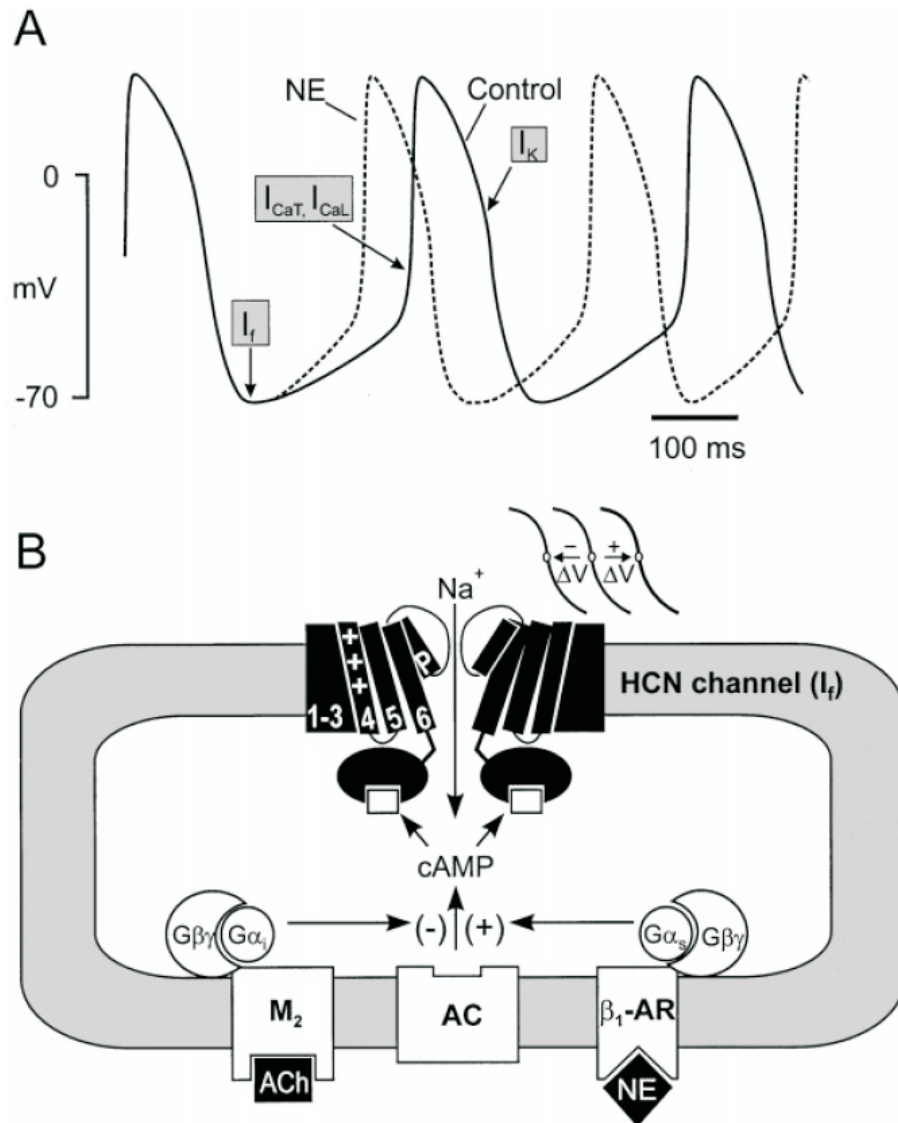


Abbildung 1.4: Modell für die Frequenzmodulation in Sinusknotenzellen. (A) Aktionspotentiale in einer Sinusknotenzelle unter Kontrollbedingungen (durchgezogene Linie) und nach β -adrenerger Stimulation mit Noradrenalin (NE, gestrichelte Linie). Bei Stimulation steigt die Stromamplitude von I_f . Durch den verstärkten depolarisierenden Einwärtsstrom wird die diastolische Depolarisation beschleunigt und dadurch die Schwelle für das nächste Aktionspotential schneller erreicht. (B) Regulation des I_f Stroms durch die cytosolische cAMP-Konzentration. M_2 : muskarinischer Rezeptor Typ 2; AC: Adenylatcyclase; β_1 -AR: β -adrenerger Rezeptor Typ 1; G_i : α -Untereinheit des G_i -Proteins (hemmt AC); G_{α_s} : α -Untereinheit des G_s -Proteins (stimuliert AC). (Biel et al., 2002)

Wie die eingehenden EPSPs aufsummiert werden hängt von den passiven Kabeleigenschaften ab. Die elektrotone Weiterleitung verlangsamt den zeitlichen Verlauf der EPSPs, sodass ein EPSP distaler Dendriten, wenn es am Soma ankommt, wesentlich länger (und flacher, aufgrund von Leckströmen) wäre als ein proximales EPSP (Abbildung 1.5), und wirkt so als Tiefpassfilter. Folglich würde man erwarten, dass repetitive EPSPs distaler Synapsen das Soma über einen längeren Zeitraum depolarisieren. Bei vielen Zellen, wie z.B. CA1 Pyramidenzellen, ist dies allerdings nicht zu beobachten. Grund hierfür ist ein I_h Gradient, der kontinuierlich vom Soma zu distal gelegenen Dendriten zunimmt (Lorincz et al., 2002). Dieser Gradient wirkt dem dendritischen Filtern entgegen. Während der ansteigenden Phase eines EPSPs deaktivieren I_h Kanäle, sodass der I_h -vermittelte Einwärtsstrom versiegt. Die entstehende Nettohyperpolarisation beschleunigt den Abfall jedes EPSPs. Folglich ist die zeitliche Summation aller eingehenden Signale dann am Soma ungefähr gleich. Diese zeitliche Normierung geht allerdings auf Kosten der EPSP Amplitude.

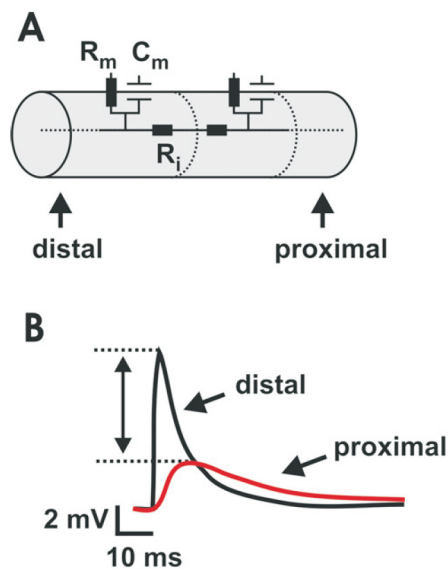


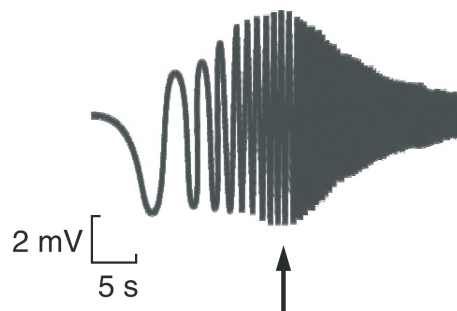
Abbildung 1.5: Passive Eigenschaften eines Dendriten. (A) Elektrischer Schaltkreis eines idealisierten zylindrischen Segments eines Dendriten. Drei Komponenten sind für die passiven Eigenschaften eines Dendriten verantwortlich: der spezifische Membranwiderstand (R_m), die spezifische Kapazität der Membran (C_m) und der intrazelluläre Widerstand (R_i). (B) Die passiven Eigenschaften eines Dendriten schwächen ein zum Soma propagierendes EPSP ab (in schwarz das distal gemessene EPSP; in grau: das gleiche EPSP nachdem es zum Soma propagierte). (Biel et al., 2009)

1.9.3 Rolle von I_h bei rhythmischen Oszillationen

Viele neuronale Netzwerke zeigen anhaltende rhythmische Oszillationen (Buzsaki, 2002, Buzsaki und Draguhn, 2004). Oszillationen entstehen durch synchrone Aktivität von Neuronen und spielen eine essentielle Rolle bei der Informationsverarbeitung in neuronalen Netzwerken. Im Hippocampus beispielsweise, sind drei prominente Oszillationsmuster unterschiedlicher Frequenzen beobachtbar. Die Theta-Oszillation ist mit einer Frequenz von 4 - 12 Hz die langsamste, die Gamma-Oszillation hat eine Frequenz von 30 - 100 Hz und die schnelle Ripple-Oszillation eine Frequenz von knapp 200 Hz (Draguhn et al., 2000). Jeder dieser Oszillationen sind verschiedene kognitive Funktionen, wie Verarbeitung und Kodierung sowie Speicherung räumlicher Informationen zugeschrieben.

Die Antwort von Neuronen auf Hyperpolarisation wird durch I_h kontrolliert. In Neuronen ist die Verarbeitung bzw. Integration rhythmischer oszillierender Signale daher stark von I_h abhängig. I_h Kanäle statten die Membran mit Resonanzeigenschaften aus (Hutcheon und Yarom, 2000, Narayanan und Johnston, 2008). Resonanz beschreibt das Phänomen, dass Neurone auf eingehende Signale einer bestimmten Frequenz eine größere Antwort zeigen als auf andere Frequenzen (Abbildung 1.6). Beispielsweise reagieren Neurone auf einen sogenannten ZAP Strom (Impedanz (Z)-Amplituden Profil) mit Resonanz. Bei einem ZAP Strom handelt es sich um einen Stimulus mit konstanter Amplitude und stetig ansteigender Frequenz. Das Spannungsantwortprofil vieler Neurone zeigt eine Resonanzspitze im Bereich der natürlichen Eigenfrequenz. Resonanz entsteht aus der Interaktion passiver und aktiver Membraneigenschaften (τ_m). Die passiven Eigenschaften schwächen Spannungsantworten auf Signale, die mit hoher Frequenz eingehen ab. Die aktiven I_h -vermittelten Eigenschaften schwächen Spannungsantworten auf Signale mit geringen Eingangsfrequenzen ab. Bei niedrigen Frequenzen haben I_h Kanäle Zeit zu aktivieren und wirken aktiv den Änderungen des Membranpotentials entgegen. Bei hohen Frequenzen haben I_h Kanäle nicht genug Zeit zu Öffnen, sodass den Änderungen des Membranpotentials nicht entgegengewirkt werden kann. Resonanz entsteht daher bei intermediären Frequenzen, die zu schnell sind um von I_h gedämpft zu werden und zu langsam um von τ_m gefiltert zu werden.

Abbildung 1.6: Resonanzeigenschaften eines Neurons. Resonanz entsteht durch die Interaktion der aktiven und passiven Eigenschaften eines Neurons. Die Spannungsantwort auf einen ZAP-Strom zeigt im Bereich der Eigenfrequenz des Neurons eine Resonanzspitze (Pfeil)



Thetarhythmus

Der Thetarhythmus ist eine der prominenten Oszillationen im Hippocampus und tritt bei Nagetieren während explorativem Verhalten sowie im REM (*rapid eye movement*) Schlaf auf (Abbildung 1.7). Bewegt sich eine Maus beispielsweise auf einer linearen Bahn, zeigen einige Zellen ein ortsabhängiges Feuerverhalten, das heißt diese „Ortszellen“ sind aktiv wenn sich das Tier an einer bestimmten Position befindet. Desweiteren kann man eine Korrelation dieser Zellen zur darunterliegenden Thetaoszillation beobachten. Betritt die Maus ein sogenanntes „*place field*“ feuern die Ortszellen auf der Spitze der Thetaoszillation. Beim Durchlaufen des „*place field*“ beginnen die Zellen während der aufsteigenden Phase des Theta sukzessiv zu immer früheren Zeitpunkten zu feuern („*phase precessi-*

on“). Entsprechend sind mehrere Ortszellen nacheinander aktiv, wobei der Thetarhythmus als zeitliche Referenz dient. Die entstehenden Sequenzen werden später während des Tiefschlafs (*slow wave sleep*) oder auch während inaktiver Wachphasen („*inactive wakefulness*“) reaktiviert und in schnellerer Geschwindigkeit wiedergegeben (Wilson und McNaughton, 1994, Nadasdy et al., 1999). Im Elektroencephalogramm äußern sich diese Sequenzen als sogenannte „*sharp wave-ripple*“ (SPW-R) Komplexe. Dies deckt sich mit dem von Buzsaki entwickelten „Zwei-Stufen-Modell zur Gedächtnisbildung“ (Buzsaki, 1989). Während der Thetaoszillation werden demnach zuerst Erinnerungsinformationen im Hippocampus gebildet und gespeichert, bevor diese in neocortikalen Strukturen konsolidiert werden (nach Maier, 2006).

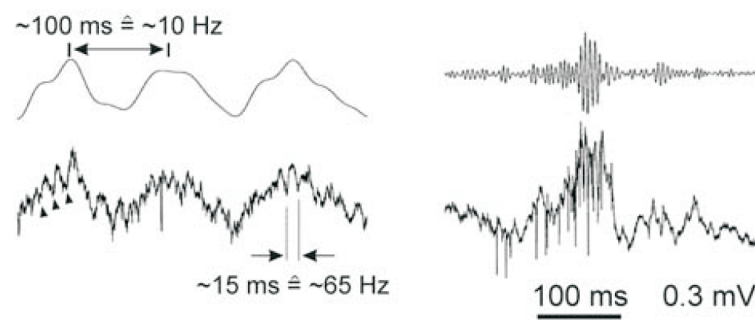


Abbildung 1.7: Theta-Band Oszillationen (links) und SPW-R (rechts) aus dem Hippocampus der Ratte *in vivo*. Die oberen Spuren zeigen die jeweils gefilterten Ableitungen der entsprechenden Originalspuren (links Thetaoszillation; rechts SPW-R). (Bandpass; 5-25 Hz, links und Isolierung von Ripples bei 150-250 Hz, rechts). Pfeilspitzen: Gamma-Oszillationen, die den Thetacyklen aufmoduliert sind. Die Pfeile verdeutlichen die Länge der Caclen bzw. die Oszillationsfrequenzen von Theta- und Gamma-Oszillationen. (Maier, 2006)

Sharp Wave-Ripple (SPW-R) Komplexe

Nach dem „Zwei-Stufen-Modell zur Gedächtnisbildung“ (Buzsaki, 1989, Hasselmo, 1999) werden diesen zwei elektrophysiologisch charakterisierbaren Zuständen des Hippocampus je ein funktioneller Zustand zugeordnet: Während der Theta-Phasen erfolgt das Einlesen von Information in den Hippocampus („*open loop state*“). Die Konsolidierung der neu erworbenen Informationen erfolgt dann in den Phasen, die durch das Auftreten von *sharp wave-ripple* (SPW-R) Komplexen charakterisiert sind. In dieser zweiten Stufe ist der Hippocampus von subkortikalen Eingängen funktionell deafferenziert („*closed loop state*“). Die wiederholte sequentielle Aktivierung von Zellen innerhalb des hippocampalen Netzwerkes - wie sie während des „replay“ von Sequenzen in Ortszellen beschrieben wurde (Lee und Wilson, 2002) - soll zur Verstärkung der Kopplung synaptischer Verbindungen und damit zur Konsolidierung von zuvor eingelesenen Gedächtnisinhalten führen (Buzsaki, 1989, Hasselmo, 1999). In diesem Modell zur Gedächtnisbildung gelten SPW-Rs demnach als elektrophysiologische Korrelate für den Transfer von intermediär

im Hippocampus gespeicherten Informationen in das kortikal lokalisierte Langzeitgedächtnis (Siapas und Wilson, 1998).

SPW-R Komplexe propagieren von der CA3 Region (wo sie als Netzwerkbursts erscheinen) über die Schaffer Kollateralen zur CA1 Region und verlassen die Hippocampusformation über das Subiculum und über den Entorhinalen Cortex (Chrobak und Buzsaki, 1994, Csicsvari et al., 2000). Wie die SPW-Rs in CA1 zu ihrer charakteristischen Form gelangen wird aktuell durch zwei verschiedene Hypothesen beschrieben. Die von Buzsaki vorgeschlagene Hypothese zur Generierung der *ripple*-Oszillation geht davon aus, dass Interneuron-Netzwerke Pyramidenzellen phasisch inhibieren. Dadurch ist das Feuern dieser CA1 Pyramidenzellen nur in den Phasen möglich in denen sie nicht inhibiert werden. In dem von Traub und Bibbig (Traub und Bibbig, 2000) entwickelten Modell für die Genese der ~ 200 Hz Ripple-Oszillation sind die Axone der CA1 Pyramidenzellen über *gap junctions* verbunden. Durch einen afferenten exzitatorischen Antrieb, wie er physiologisch während der SPWs vorkommt, wird in diesem Netzwerk die Bildung ektopter Aktionspotentiale angeregt. Die Synchronisierung der Pyramidenzellen wird durch *gap junction*-gekoppelte Axone erreicht. Diese wiederum regen phasisch Interneurone zum Feuern von Aktionspotentialen an.

1.10 Anatomie des Hippocampus

Die hippocampale Formation liegt im Temporallappen und ist ein Teil des limbischen Systems. Sie zählt zu den evolutionär ältesten Strukturen des Gehirns. Der Hippocampus wird in mehrere Regionen unterteilt: Subiculum, Ammonshorn (Cornu ammonis, bestehend aus den Regionen 1 - 3) und dem Gyrus dentatus (Abbildung 1.8). Diese Strukturen sind miteinander und mit dem entorhinalen Cortex trisynaptisch verbunden (Andersen et al., 1979, Döller und Weight, 1982, Yeckel und Berger, 1990); der entorhinale Cortex über den Traktus perforans mit dem Gyrus dentatus; der Gyrus dentatus über die Moosfasern mit CA3, und CA3 über die Schaffer-Kollateralen (SC) mit CA1 (Abbildung 1.8 B). Darüber hinaus besitzt der Hippocampus Efferenzen zum Stammhirn, den Raphe Kernen und Teilen des limbischen Systems. Mit dem Neocortex ist der Hippocampus indirekt verbunden, z.B. über den entorhinalen Cortex oder über die Amygdala.

1.11 Ziel der Arbeit

HCN4 Kanälen wird eine tragende Rolle bei der Entstehung der diastolischen Depolarisation in Sinusknotenmyozyten zugesprochen und haben somit eine Schlüsselfunktion bei der Generierung des Herzrhythmus. In den letzten Jahren wurden in unterschiedlichen Patienten, die an Herzrhythmusstörungen leiden, verschiedene Mutationen im *HCN4* Gen entdeckt. Mehrere Arbeiten konnten zeigen, dass diese Herzrhythmusstörungen in

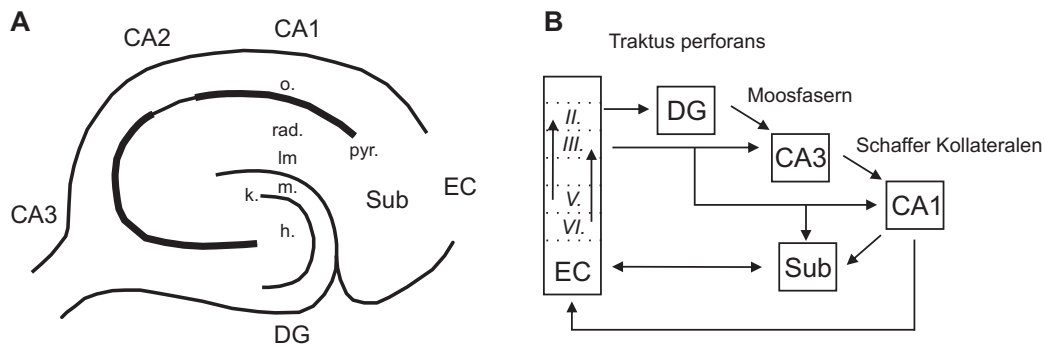


Abbildung 1.8: Laminarer Aufbau des Hippocampus und trisynaptischer Schaltkreis. (A) Schematische Darstellung des Hippocampus. Strukturelle Organisation mit Cornu ammonis 1 (CA1), der Cornu ammonis 2 (CA2, schmal dargestellt), der Cornu ammonis 3 (CA3), dem Gyrus dentatus (DG), dem Subiculum (Sub) und dem entorhinalen Cortex (EC). (B) Trisynaptischer hippocampaler Schaltkreis. Signale des entorhinalen Cortex erreichen über den Traktus perforans, die Mossfasern und über die Schaffer-Kollateralen das Subiculum. Das Subiculum besitzt seinerseits Afferenzen und Efferenzen zum entorhinalen Cortex. EC: entorhinaler Cortex; h.: Hilus; k.: Körnerzellschicht; lm.: Stratum lacunosum moleculare; m.: Stratum moleculare; o.: Stratum oriens; pyr.: Stratum pyramidale; rad.: Stratum radiatum (Amaral, 1993)

direktem Zusammenhang mit Mutationen im *HCN4* Gen stehen (Schulze-Bahr et al., 2003, Ueda et al., 2004, Milanesi et al., 2006, Nof et al., 2007).

In dieser Arbeit sollen unter anderem zwei neue *HCN4* Mutanten elektrophysiologisch charakterisiert werden, die aus Patienten mit Sinusbradykardien kloniert wurden. Die sich hier aufdrängende Frage ist: wie steht das Krankheitsbild im Zusammenhang mit der jeweiligen Mutation?

In den vergangenen Jahren wurde auch Difrancescos Theorie zu Regulation der Herzrhythmusfrequenzsteigerung (siehe Abschnitt 1.9.1) von Lakatta in Frage gestellt. Nach Lakatta unterliegen rhythmische Kontraktion sogenannte „*calcium clocks*“. Die Untersuchung der *HCN4* Mutanten soll auch weiteren Aufschluss über den Mechanismus der Herzfrequenzsteigerung geben.

Weiterhin soll die Funktion der *HCN* Kanäle bei Netzwerkoszillationen, wie bei der *sharp wave-ripple* Oszillation, untersucht werden. Narayanan und Johnston (Narayanan und Johnston, 2008) beispielsweise konnten zeigen, dass I_h Ströme Neurone dazu ausstatten optimal innerhalb des Thetafrequenzbereich zu arbeiten. Welche Rolle I_h bei höher frequenten Oszillationen, wie den SPW-Rs spielen soll hier untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Die verwendeten Chemikalien wurden in p.A.-Qualität von folgenden Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Fluka Chemie GmbH (Steinheim), Invitrogen GmbH (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg) und Sigma Aldrich Chemikalien GmbH (Steinheim). Die Lösungen und Puffer wurden mit Wasser aus einer MilliQ UF Plus-Anlage der Firma Millipore (APS Water Services Inc., Van Nuys, CA, USA) angesetzt, falls nicht anders genannt.

2.2 Lösungen und Medien

Alle Lösungen wurden bei 4°C aufbewahrt. Zellkulturlösungen wurden auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Die Lösungen für die *patch-clamp* Experimente hatten bei Verwendung Raumtemperatur.

2.2.1 Lösungen für die Zellkultur und die Transfektion

PBS: 137,0 mM NaCl; 10,0 mM Na₂HPO₄; 2,6 mM KCl; 2,6 mM KCl; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7.2 *Poly-L-Lysin*: 0,1 mg Poly-L-Lysin/ml H₂O *Trypsin/EDTA*: 0,05 % (v/v) Trypsin; 0,02 % (v/v) EDTA *CaCl₂*: 2 M CaCl₂ in H₂O *2x BES-Buffered Solution (BBS)*: 50 mM BES (N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid); 280 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄ (pH 6,95); mit einem 0,22-mm Nitrozellulosefilter sterilfiltriert.

2.2.2 Lösungen für die *patch-clamp* Experimente

Extrazellulärlösung

KCl 30 mM; NaCl 110 mM; CaCl₂ 1,8 mM; MgCl₂ 0,5 mM; HEPES 5 mM. Die Substanzen wurden in H₂O bidest gelöst. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Die Osmolarität wurde mit Sucrose auf 290 - 300 mosmol/l eingestellt. Diese Lösung würde bei 4°C aufbewahrt und hatte Raumtemperatur bei Gebrauch.

Intrazellulärlösung

KCl 130 mM; NaCl 10 mM; MgCl₂ 0.5 mM; EGTA 1 mM; HEPES 5 mM wurden in H₂O bidest gelöst und der pH-Wert mit KOH auf 7.4 eingestellt. 10 ml dieser Stocklösung wurden abgenommen und mit Nukleotiden sowie Kreatin versetzt. MgATP 2 mM; NaGTP 0.1 mM; Phosphokreatin 5 mM. Für die Untersuchungen der Modulierbarkeit durch cyklische Nukleotide, wurden zusätzlich 10 μ M cAMP zugegeben. Falls nötig, wurde der pH-Wert wieder eingestellt und die Osmolarität auf 280 - 290 mosmol/l (Glucose) eingestellt. Mengen von 1 ml wurden aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.3 Lösungen für die Präparation der Hippocampuschnitte und Messung der Feldpotentiale

Artefizielle CerebroSpinale Flüssigkeit (ACSF) NaCl 124 mM; KCl 3 mM; NaH₂PO₄ 1.25 mM; CaCl₂ 1.6 mM; MgSO₄ 1.8 mM; Glucose 10 mM; NaHCO₃ 26 mM wurden in H₂O bidest gelöst. Um HCN Kanäle zu blockieren wurde die ACSF mit 10 μ M ZD 7288 versetzt. Transient aktivierbare Calciumkanäle wurden durch Zugabe 0.75 mM Ethosuximid blockiert.

2.3 Plasmidvektoren

Bei einem screening von Patienten mit starken Sinusarrhythmien wurden zwei Mutationen in dem *HCN4* Gen gefunden. In der ersten Mutante (HCN4-695X) wurde eine Insertion von 13 Nukleotiden an Position 1933 entdeckt. Diese Insertion verursacht einen frame shift der zu einem frühzeitigen Stop-Codon führt. Der folgende Kettenabbruch führt zu einer trunkierten cyklischen Nukleotid-Bindedomäne (CNBD). Die zweite Mutation (HCN4 K530N) liegt deutlich vor der CNBD. Hier führt eine Punktmutation zu einem Aminosäureaustausch. Das positiv geladene Lysin (K) wird an Position 530 durch das neutrale Asparagin (N) ersetzt.

Die humane HCN4 cDNA wurde in einen Expressionsvektor kloniert, beide Mutationen wurden durch gezielt Mutagenese (QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene) induziert. Die Verifizierung der Wildtyp- und Mutantensequenzen erfolgte durch Sequenzierung beider Stränge. Zwischen einem Cytomegalovirus (CMV)-Promotor und Simian Virus (SV) Polyadenylierungssignal wurde entweder nur eines der HCN4 Konstrukte, oder ein bicistronische Konstrukt, bestehend aus HCN4 und dem Fluoreszenzprotein DsRed, eingebettet.

Die Plasmide (Abbildung 2.1) wurden von Dr. M. Koenen (Max-Planck Institut für medizinische Forschung, Heidelberg) bereitgestellt.

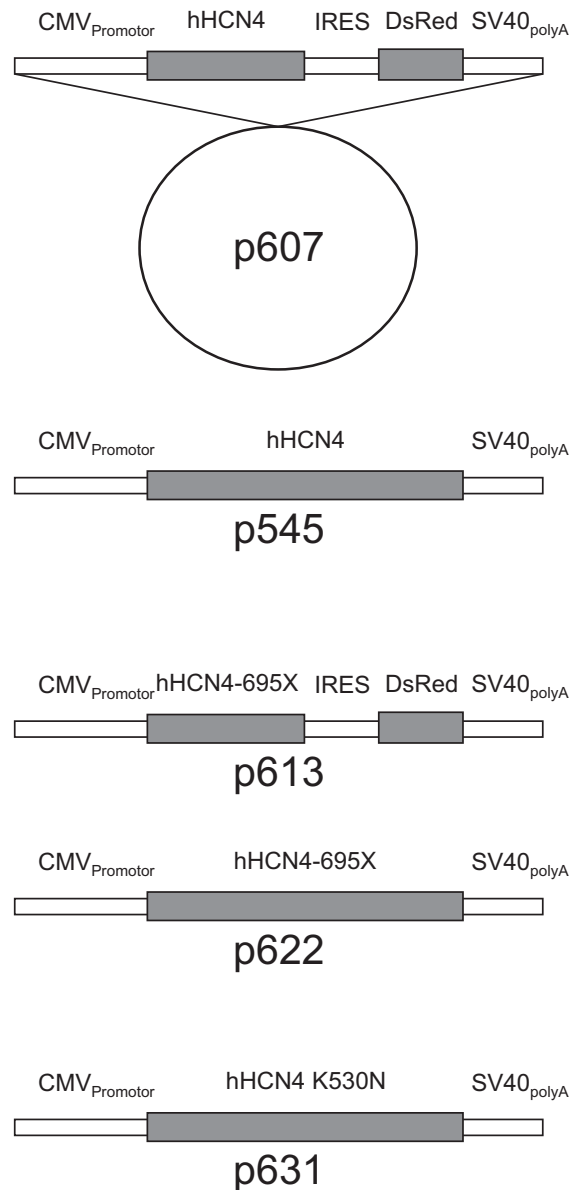


Abbildung 2.1: Plasmide. Das bicistronische Plasmid p607 enthält neben cDNA des humanen HCN4 Kanals, welche unter einen Cytomegalovirus (CMV) Promotor exprimiert wird, auch das fluoreszierende Protein DsRed, welches über eine interne ribosomale Eingangsstelle (IRES) exprimiert wird. Das Polyadenylierungssignal stammt vom Simian-Virus 40 (SV40). Das Plasmid p613 ist ähnlich aufgebaut. Anstatt der hHCN4 enthält es die mutierte Form hHCN4-695X. Die anderen verwendeten Plasmide (p622 und p631) sind monocistronisch; die cDNA des jeweiligen HCN4 ist zwischen CMV Promotor und Polyadenylierungssignal eingebunden.

2.4 Zelllinien und heterologe Genexpression

2.4.1 Kulturbedingungen für die Zelllinien

HEK 293 Zellen wurden in DMEM bei 37 °C, 5 % CO₂ und ~ 95 % Luftfeuchtigkeit auf Petrischalen (Ø 12 cm) kultiviert. Das Medium wurde alle 3 bis 4 Tage gewechselt. Die Zellen teilen sich etwa alle 24 h. Bei 70 - 90 %iger Konfluenz wurden die Zellen abgelöst und auf neue Schalen verteilt (*splitting*). Dazu wurden die Zellen zunächst mit 10 ml PBS gewaschen und dann mit 1.5 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C in ca. 90 s abgelöst. Die Zellen wurden in 10 ml Medium resuspendiert und die Zelldichte der Suspension wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für die Zellerhaltung wurden 5x10⁵ und 10⁶ Zellen auf Ø 12 cm-Schalen mit 12 ml frischem Medium ausgesät. Ein anderer Teil der Zellen wurde für die Transfektion auf poly-D-Lysin beschichtete Deckplättchen ausgesät (40 000 Zellen pro Deckplättchen). Nach 30 *splitting*-Runden wurden die Zellen verworfen und ein neues Aliquot tiefgefrorener Zellen für die Aussaat verwendet.

2.4.2 Transiente Transfektion von HEK 293 Zellen

Die Zellen wurden nach der Calciumphosphat-Methode (Chen und Okayama, 1987) transfiziert. Alle Lösungen wurden auf 37°C erwärmt. Für 6 Deckplättchen wurde folgender Transfektionsansatz vorbereitet. 21 µl Vektor DNA (0.2 µg/µl); 7 µl CD8 DNA (0.1 µg/µl); 47 µl H₂O; 25 µl CaCl₂ (2 M) wurden gemischt (wenn ein bicistronisches Plasmid mit wurden die 7 µl CD8 DNA durch die entsprechende Menge H₂O ersetzt). Anschließend wurden 200 µl BBS hinzugegeben, gemischt und für 90 s bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 3.1 ml DMEM wurde das Transfektionsmedium für 20 min bei 37° inkubiert. 500 µl des Transfektionsmediums wurden auf jedes Deckplättchen gegeben. Die Zellen werden für weitere 7 - 9 h inkubiert (bei 37°C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) und dann gemessen.

2.4.3 Identifizierung transfizierter HEK 293 Zellen

Die Co-Transfektion mit dem CD8 Oberflächenprotein (Vektor DNA + CD8 DNA) ermöglicht die Erkennung transfizierter Zellen. Hierzu wurden Antikörper, an die eine kleine Plastikkugel angeheftet (Anti-CD8-Beads) ist, auf die transfizierten Zellen gegeben und für 30 - 45 min inkubiert. Dabei binden diese an spezifische membranständige Epitope des CD8 Proteins. Danach wurden die Zellen in frisches Medium überführt Die Plastikkugeln sind unter dem Lichtmikroskop gut sichtbar und transfizierte Zellen konnten so von nicht transfizierten Zellen unterschieden werden. Zellen, die mit einem bicistronischem Plasmid transfiziert wurden, und das fluoreszierende Protein DsRed (Exzitation

bei 558 nm, die Emission bei 583 nm) exprimierten, konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop an Hand ihrer roten Fluoreszenz identifiziert werden.

2.5 *patch-clamp* Technik

2.5.1 Messstand und Prinzip der *patch-clamp* Technik

Im Folgenden werden die Hauptbestandteile eines *patch-clamp* Messstandes beschrieben: Ein inverses Mikroskop (CKX41; Olympus, Hamburg, Deutschland) ist auf einem schwingungsgedämpften, isolierten Tisch (Science Products, Hofheim, Deutschland) angebracht. Eine Hg-Lampe und der entsprechende Anregungsfilter regt die Probe zur Emission von Fluoreszenzlicht an. Ein Faraday-Käfig schirmt elektrisches Rauschen ab. Mit einem Drei-Achsen Wasserhydraulik Mikromanipulator (MHW-3; Narishige, Tokyo, Japan) kann der Pipettenhalter mikrometergenau bewegt werden. Durch eine analoge 12-Rollenpumpe (IDEX Health & Science GmbH, Wertheim, Deutschland) kann die Messlösung rezirkuliert werden. Die Ag/AgCl-Referenzelektrode wurde über eine Agarosebrücke (0,5 %) in die Badlösung in der Messkammer eingetaucht. In die Pipette wurde ein chlorierter Silberdraht eingeführt, der mit dem Vorverstärker verbunden ist. Über die Pipettenhalterung am Vorverstärker kann ein Über- oder Unterdruck im Inneren der Glaspipette angelegt werden. Der Vorverstärker ist mit dem Hauptverstärker (EPC-7; HEKA, Lambrecht, Deutschland) verbunden. Ausgehend vom Hauptverstärker gelangt das Signal der Messelektrode über einen analog/digital-Wandler (CED 1401 micro; CED, Cambridge, UK) in einen Computer. Mittels der Software Signal3 wurde das Stromsignal aufgenommen.

Das Prinzip der *patch-clamp* Technik (Hamill et al., 1981) besteht darin, einen isolierten Bereich der Zellmembran (*patch*, die Fläche beträgt einige μm^2) so an die Spitze einer feinen Glaskapillare (*Patchelektrode*) zu schmiegen, dass ein hochohmiger Kontakt (*gigaseal*; $\geq 1 \text{ G}\Omega$) zwischen Membran und Glas entsteht. Dadurch lassen sich Leckströme und thermisches Rauschen so stark reduzieren, dass Ströme von wenigen pA über die Membran messbar sind. Über eine Kompensationsschaltung kann die angelegte Membranspannung unabhängig von dem über den *patch* fließenden Strom konstant gehalten werden (*voltage-clamp*).

Um Zugang zum Inneren einer Zelle zu bekommen, kann der unter der Pipette befindliche, *patch* durch Erzeugen eines Unterdrucks durchbrochen werden. In dieser *whole-cell* Konfiguration werden nun alle Ströme gemessen die über die Zellmembran fließen. Da das Volumen der Pipette wesentlich größer ist als das des Cytoplasmas wird durch Diffusion ein klar definiertes intrazelluläres Milieu geschaffen.

Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Komponenten des *patch-clamp* Messstandes ist in „*Patch-Clamp-Technik*“ (Numberger und Draguhn, 1996) zu finden.

2.5.2 Durchführung der Messung

Ein Deckplättchen mit transfizierten Zellen wurde in der Messkammer plaziert und gleichmäßig mit Extrazellulärlösung umströmt. Pipetten wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Außendurchmesser: 1.5 mm, Innendurchmesser: 0.87 mm, Hilgenberg, Malsfeld) mittels eines Flaming/Brown Pullers (MODEL P-97; Sutter Instruments, Novato, USA) gezogen und anschließend mit Intrazellulärlösung befüllt.

Befanden sich die Pipette und Referenzelektrode in der Badlösung, konnte die Stromantwort der Pipette auf einen rechteckförmigen Kommandospaltungspuls (5 mV) mit dem Computer betrachtet werden. Der Widerstand der Pipette kann aus dieser Stromantwort ermittelt werden (Abbildung 2.2). Er lag bei allen Messungen zwischen 2 und 4 M Ω (je nach Größe der Öffnung, angelegtem Druck und der verwendeten Intrazellulärlösung).

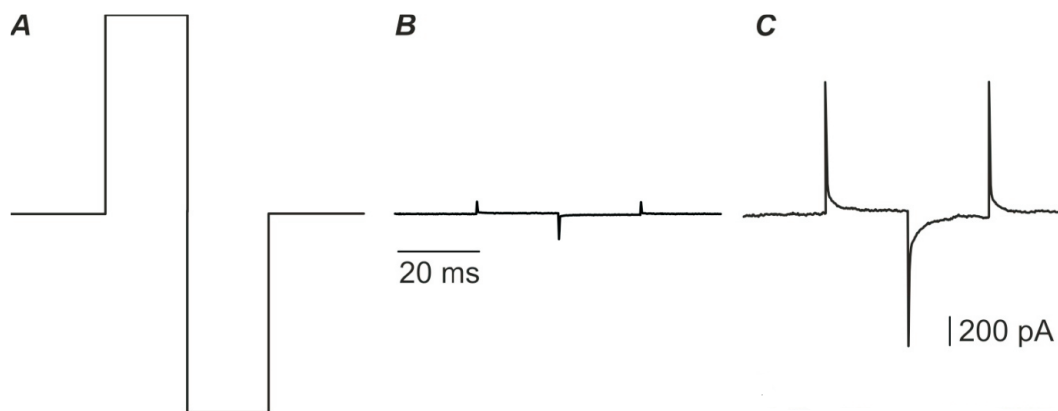


Abbildung 2.2: Stromantwort auf einen 5 mV Rechteckpuls der Kommando- spannung im *voltage-clamp*. (A) Die Stromantwort einer offenen Pipette, die in Extrazellulärlösung getaucht ist, ist rechteckig, da die Pipette sich wie ein ohmscher Widerstand verhält (hier: $R_{\text{pip}} = 3 \text{ M}\Omega$). (B) Nach Ausbildung eines Gigaseals (*cell-attached*) wird die Stromantwort minimal. Zusehen sind die kapazitiven Artefakte. (C) In der *whole-cell* Konfiguration sind die kapazitiven Artefakte prominenter, da hier eine größere Membranfläche umgeladen werden muss. (Nach Numberger und Draguhn)

Da sich zwischen zwei Lösungen (Intra- und Extrazellulärlösung) mit unterschiedlicher ionaler Zusammensetzung sogenannte „*liquid junction*“ Potentiale ausbilden können, wurde vor dem Kontakt der Pipette mit der Zelle ein Nullabgleich vorgenommen.

Alle *patch-clamp* Experiment wurden in der *whole-cell* Konfiguration durchgeführt. Frühestens 5 min nach Ausbildung *whole-cell* Konfiguration wurde die Messung begonnen, sodass das Cytoplasma ausgewaschen wurde. Desweiteren wurden die kapazitive Arte-

fakte kompensiert (70 - 90 %).

Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle aufgezeichneten Ströme wurden mit 1 kHz gefiltert.

2.6 Spannungsprotokolle

Alle *whole-cell* Messungen zur Charakterisierung der verschiedenen HCN4 Kanäle wurden mit folgenden Spannungsprotokollen durchgeführt:

Strom/Spannungs-Beziehung:

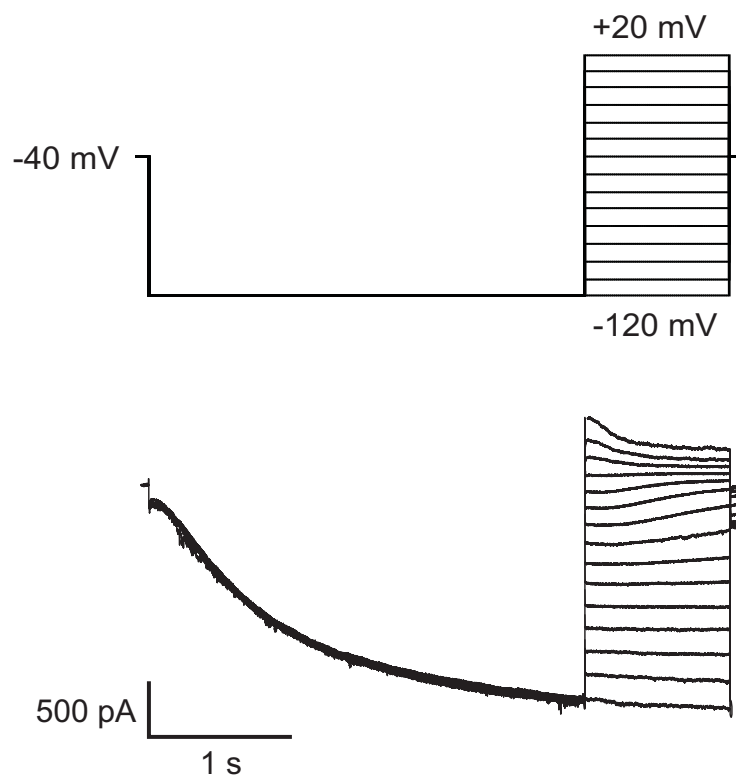


Abbildung 2.3: Strom/Spannungs-Beziehung. (Oben) Ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV wurde ein 3 s langer Spannungssprung von -120 mV appliziert, um die Kanäle vollständig zu aktivieren. Anschließend wurde das Membranpotential für 1 s auf Werte zwischen -120 mV und +20 mV geklemmt (Inkrement: 10 mV). Nach jedem Durchgang wurde eine 30 s lange Pause eingelegt (-40 mV). (Unten) Ein Beispiel von übereinander gelegten Stromspuren. Zur besseren Übersicht wurden die Messartefakte graphisch entfernt.

Aktivierungsprotokoll:

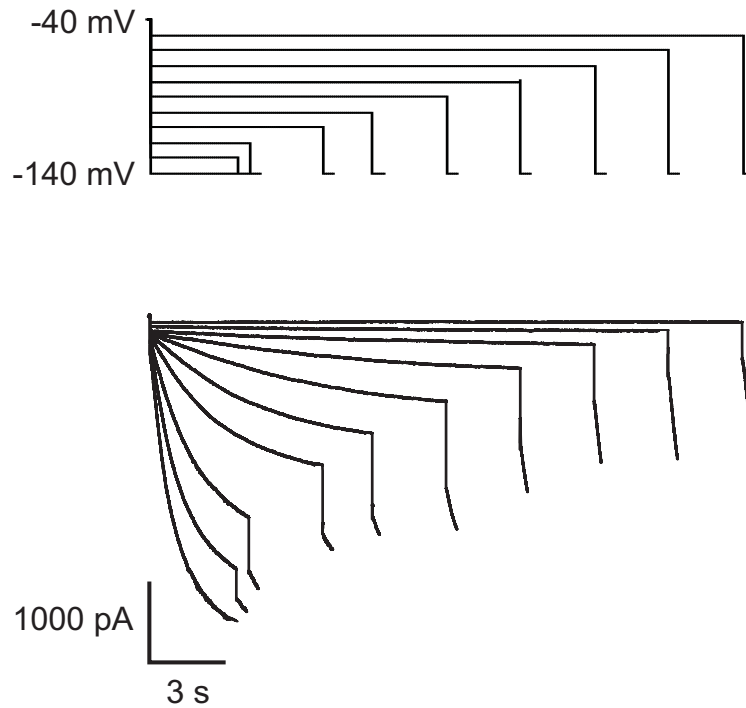


Abbildung 2.4: Aktivierungsprotokoll. (Oben) Das Membranpotential wurde bei sämtlichen Messungen der *steady-state* Ströme auf -40 mV gehalten. Mit einem ersten Sprung auf Potentiale zwischen -50 mV und -140 mV (Inkrement: -10 mV) konnten die Zeitkonstanten berechnet werden (siehe Abschnitt 2.7). Über einen zweiten Sprung auf -140 mV, der zur vollständigen Restaktivierung diente, wurde die Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung bestimmt. Um die Zellen zu schonen wurde, je größer das angelegte Potential war, die Dauer des Pulses herabgesetzt. Nach jedem Durchgang wurde eine 30 s lange Pause eingelegt (-40 mV). (Unten) Ein Beispiel von übereinander gelegten Stromspuren. Mit zunehmenden Potentialen wird die Stromantwort größer. Zur besseren Übersicht wurden die Messartefakte graphisch entfernt.

Deaktivierungseigenschaften:

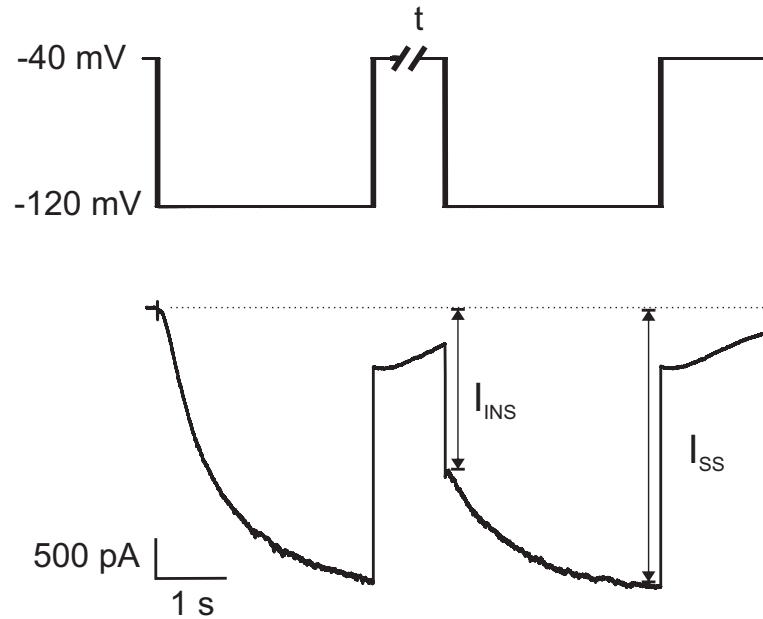


Abbildung 2.5: Deaktivierungsprotokoll. (Oben) Ausgehend von einem Haltepotential von -40 mV wurde ein 3 s langer Spannungssprung von -120 mV appliziert. Dieser Spannungssprung öffnet die Mehrzahl der Kanäle sodass sich ein *steady-state* einstellt (I_{SS}). Danach wurde die Membran zurück auf das Haltepotential geklemmt, sodass ein Teil der Kanäle deaktiviert wird. Ein zweiter Puls von -120 mV wurde nach unterschiedlich langer Erholungsphase appliziert (Δt). Je länger die Zwischenpulsintervall ist, umso mehr Kanäle haben die Möglichkeit zu schließen. Nach jedem Durchgang wurde eine 30 s lange Pause eingelegt (-40 mV). (Unten) Beispiel einer Stromspur bei der die Zwischenpulszeit 1 s betrug. Der initiale instantane Strom (I_{INS}), der dem zweiten Spannungssprung folgt, spiegelt die Fraktion der Kanäle wider, die noch nicht deaktiviert wurden. Mit länger andauernden Zwischenpulsintervallen nimmt der instantane Strom ab, da mehr und mehr Kanäle geschlossen sind. Zur besseren Übersicht wurden die Messartefakte graphisch entfernt.

2.7 Auswertung der patch-clamp Daten

Die Messungen wurden mit der Signal3 Software analysiert. Die Quantifizierung erfolgte mit Microsoft Office Excel 2003 und Origin7. Zur statistischen Evaluierung wurde Graph Pad Instat3 herangezogen.

Die Zeitkonstanten der Kanalaktivierung (τ_{act}) von HCN Kanälen und deren Mutanten wurden durch eine Exponentialfunktion nach hyperpolarisierenden Pulsen von -80 bis -140 mV ermittelt.

Das Potential der halbmaximalen Aktivierung (V_h) wurde mittels der Goldman-Hodgkin-Katz Strom Gleichung bestimmt:

$$\Delta I(V) = V \frac{\Delta g_{max}}{1 + \exp\left(\frac{-V_{1/2} + V}{V_c}\right)} \cdot (V + 140) \quad (2.1)$$

Mit V , Haltepotential; $V_{1/2}$, Potential der halbmaximalen Aktivierung; V_c , Steigung in Punkt $V_{1/2}$; g_{max} , maximale Leitfähigkeit

Werte der maximalen Stromamplitude des zweiten Spannungsschrittes wurden gegen die entsprechende Spannung aufgetragen. Mittels der Goldman-Hodgkin-Katz Spannungsgleichung lässt sich das Umkehrpotential und das Verhältnis der Leitfähigkeiten von Natrium zu Kalium bestimmen.

$$E_{rev} = 2.303 \cdot \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \log \frac{P_{K^+} \cdot [K^+]_a + P_{Na^+} \cdot [Na^+]_a}{P_{K^+} \cdot [K^+]_i + P_{Na^+} \cdot [Na^+]_i} \quad (2.2)$$

Mit E_{rev} , Umkehrpotential; P_K , Kaliumpermeabilität; P_{Na} , Natriumpermeabilität; R , ideale Gaskonstante; T , absolute Temperatur; F , Faradaykonstante; z , Ladung des Ions

Die Deaktivierungseigenschaften wurden wie folgt bestimmt: die Amplitude der instantanen Stromantwort auf den zweiten Puls wurde auf die Amplitude des *steady-states* Stromes der ersten Pulses normalisiert. Dieser Quotient wurde gegen das entsprechende Zwischenpulsintervall aufgetragen.

2.8 Tiere und die Herstellung vitaler Hippocampuschnitte

Für die Herstellung vitaler Gehirnschnitte wurden männliche Mäuse (P28 - P45) des Stammes C57Bl6 (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen bei einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus in vollklimatisierten Räumen gehalten. Vor der Präparation wurden die Tiere durch CO₂-Begasung betäubt und anschließend dekapitiert. Die Präparation wurde in eiskalter, mit Carbogen-begaster ACSF durchgeführt. Dazu wurde das Fell und die Schädeldecke entfernt und das Gehirn herausgelöst. Das Cerebellum sowie der anteriore Teil des Bulbus Olfactorius und des präfrontalen Cortexes wurde jeweils durch einen koronalen Schnitt abgetrennt. Der verbleibende Teil des Gehirns wurde auf die vorgekühlte Schneidekammer eines Vibratoms (Leica VT1000 S, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland) geklebt. Die Schneidekammer wurde mit eiskalter, mit Carbogen-begaster

ACSF aufgefüllt und es wurden 450 μm dicke horizontale Schnitte angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte für mindestens 3 h in der Messkammer bei 32°C inkubiert.

Alle Vorgänge, die Tiere involvierten, wurden entsprechend der Richtlinien der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) durchgeführt.

2.9 Feldpotentiale

2.9.1 Messstand und Prinzip der Feldpotentialmessungen

Feldpotentiale sind extrazelluläre Spannungsänderungen, die durch die Aktivität mehrerer Zellen zustande kommen. Beispielsweise erzeugen eingehende exzitatorische synaptische Potentiale am Dendriten einen Einstrom positiver Ladungen. Diese extrazelluläre Ladungsverschiebung ist im Feld als ein negativer Ausschlag detektierbar und man spricht von einer aktiven Senke („*active sink*“). Am Soma entsteht eine passive Quelle („*passive source*“), was im Feld als positive Auslenkung gemessen werden kann. Aufgrund der laminaren Anordnung der Pyramidenzellen - in der die Dendritenbäume in die eine Richtung und die Somata in die andere Richtung zeigen - erzeugen synchrone synaptische Übertragungen einen elektrischen Dipol (Abbildung 2.6).

2.9.2 Durchführung der Messung

Die Feldpotentiale und die evozierten Potentiale in der CA1 bzw. CA3 Region im Stratum pyramidale und Stratum radiatum wurden mit Feldelektroden aufgenommen (Abbildung 2.7). Die Feldelektroden wurden vor Gebrauch mit ACSF befüllt und hatten an der Spitze einen Durchmesser von 2-5 μm . Die Potentiale wurden mit einem EXT 10-2FX Verstärker (npi electronics, Tamm, Deutschland) 100 fach amplifiziert, bei 3 kHz tiefpassgefiltert und mit 20 kHz digitalisiert. Die evozierten Potentiale wurden durch elektrische Stimulation der Schaffer Kollateralen (100 μs Rechteckpuls bei 60 % der maximalen Reizantwort, alle 60 s) ausgelöst. Dazu wurde ein bipolarer Platin/Iridium-Draht (Science Products, Hofheim, Deutschland) in die Oberfläche des Schnittes eingetaucht.

2.10 Auswertung der Messdaten/ Datenanalyse

Die Daten wurden mit der Spike2 und Signal3 Software (CED, Cambridge, UK) aufgenommen und offline mit selbstgeschriebenen Skripten mit Matlab (The MathWorks, Natick, Massachusetts, USA) analysiert. Die Skripte wurden von Dr. Martin Both (Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Heidelberg) geschrieben. Um die Zeitpunkte

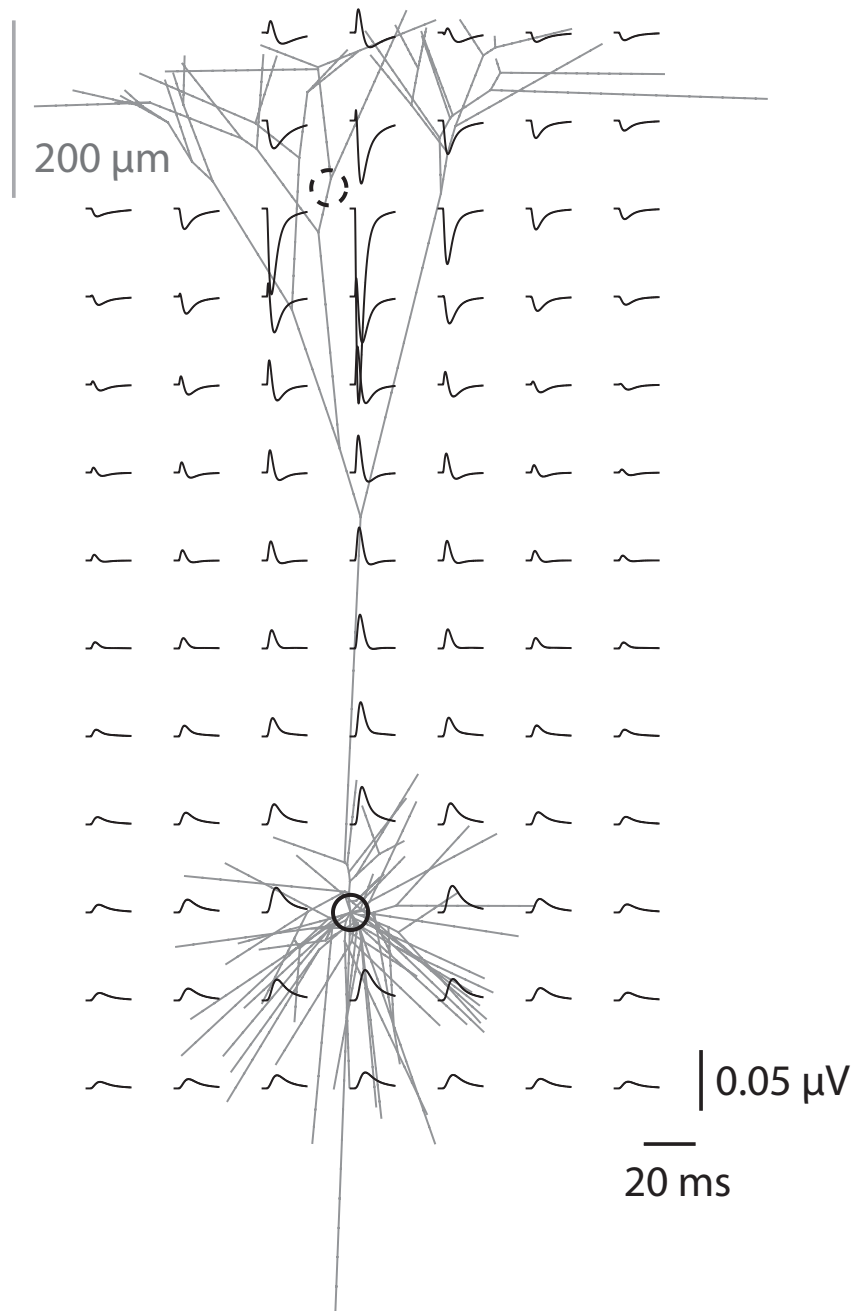


Abbildung 2.6: Berechnete extrazelluläre Feldpotentiale eines Pyramidenneurons. Unterschiedliche Elektrodenpositionen nehmen unterschiedliche Signale auf. Nahe dem apikalen Dendriten sind die Amplituden der Feldpotentiale negativ. Der Einstrom positiver Ladung hinterlässt einen „*active sink*“ im lokalen Feld. Um das Soma sind die Amplituden positiv. Hier spiegeln die Amplituden die Ausgleichsströme („*passive source*“) wider. Es entsteht ein elektrischer Dipol (offener Kreis: Minuspol; geschlossener Kreis: Pluspol). (Einevoll et al., 2010)

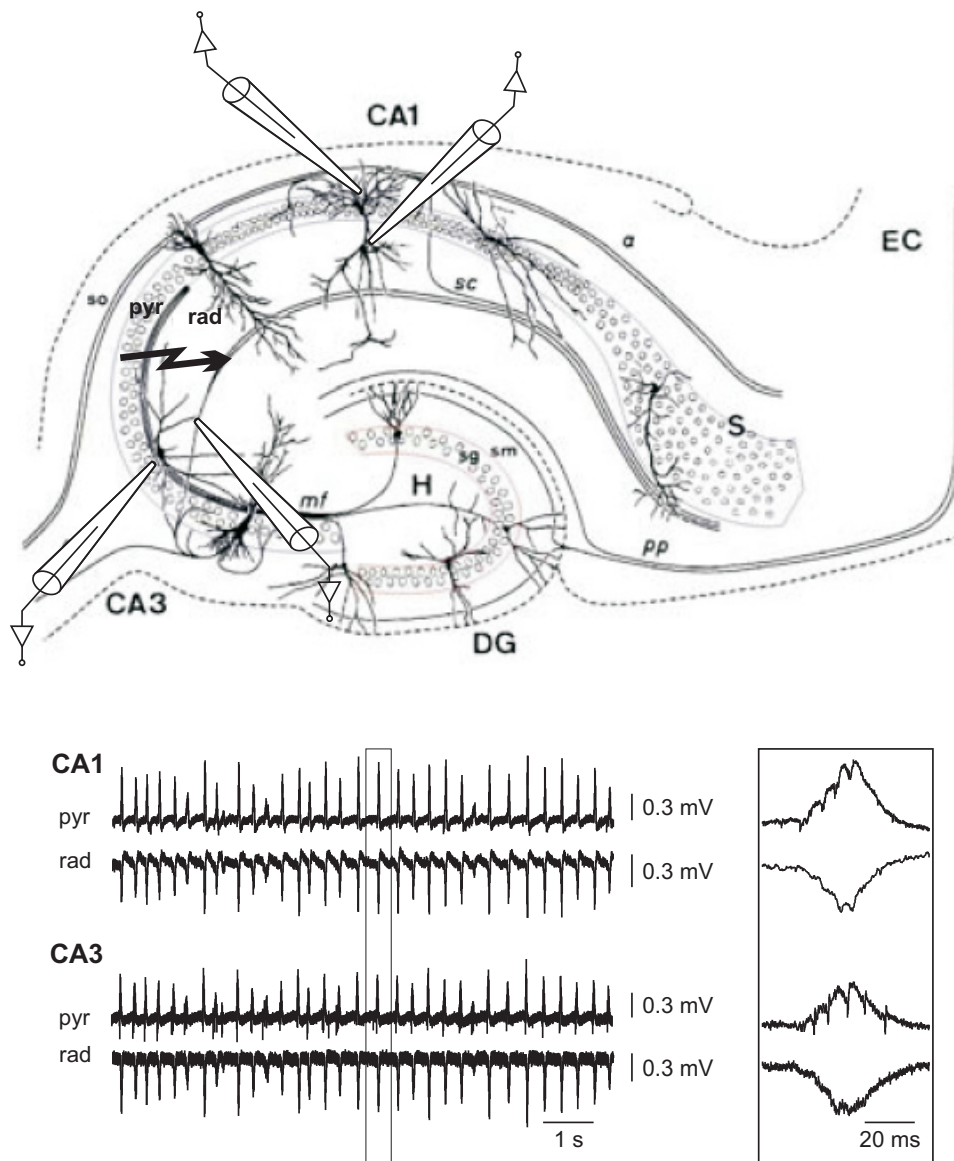


Abbildung 2.7: Anordnung der Messelektroden sowie Beispielspuren einer Feldpotentialmessung. (Oben) Je eine Feldelektrode wurde im Stratum pyramidale und im Stratum radiatum der CA1 und der CA3 Region platziert. Die Platzierung der Reizelektrode in den Schaffer Kollateralen ist durch den Blitz gekennzeichnet. Die Zeichnung zeigt die Hauptfaserverbindungen nach Ramon y Cajal. DG, Gyrus dentatus; H, Hilus; CA, Cornu ammonis; EC, entorhinaler Cortex; S, Subiculum; a, Alveus; mf, Moosfasern; pp, Tractus perforans; SC, Schaffer Kollateralen; sg, Körnerzellschicht; sm, Stratum moleculare; so, Stratum oriens; pyr, Stratum pyramidale; rad, Stratum radiatum. (Unten) Spontan auftretende Netzwerkereignisse wurden als Feldpotentiale im Stratum pyramidale (pyr), sowie im Stratum radiatum (rad) horizontaler Maushippocampuschnitte gemessen. Diese spontan auftretenden Ereignisse (*sharp wave-ripple* Komplexe) treten in der Pyramidenzellschicht als nach oben gerichtete Ausschläge auf, in dendritischen Schichten als nach unten gerichtete Ausschläge. Die umrandeten SPW-Rs sind rechts im Detail dargestellt.

der auftretenden SPW-Rs zu ermitteln, wurden die Rohdaten mit einem Tiefpass (50 Hz) gefiltert. Dazu wurden die *sharp waves* (innerhalb eines 30 ms Zeitfensters) als lokale Maxima detektiert. Die untere Grenze für die Detektion von SPW-Rs wurde, je nach Schnitt, auf Amplituden von 0.1 - 0.2 mV festgelegt (Abbildung 2.8). Dieser Wert entspricht der vierfachen Standardabweichung des Hintergrundrauschens bei ereignisfreier Baseline, was eine stabile und reliable Detektion der SPW-R ermöglichte. Anschließend wurden die SPW-R durch eine kontinuierliche Wavelet-Transformation (nach Morlet), innerhalb des Zeitfensters 33 ms vor und 67 ms nach dem Maximum der SPW-R, analysiert (Both et al., 2008). Von diesem Spektrogramm wurde die Frequenz der *ripple*-Oszillation, welche größer als 140 Hz waren, extrahiert. Die Ripple Energie wurde als Integral des Spektrogramms bei der jeweils detektierten Frequenz definiert. Hier wurden die Grenzen auf das Zweifache der Standardabweichung von ereignisfreier Baseline gesetzt. Alle im Ergebnisteil dargestellten SPW-R Parameter werden als Mittelwerte aus 5 Minutenintervallen dargestellt.

Die evozierten Feldpotentiale (elektrische Stimulation der Schaffer Kollateralen) haben in den verschiedenen Strata unterschiedliche Formen (Abbildung 2.9). In CA1 Stratum pyramidale sieht man die langsame positive Komponente (postsynaptische Potentiale, PSPs) sowie die aufgelagerte negative Auslenkung des Summenaktionspotentials („*population spike*“ im Folgenden als „PopSpike“ bezeichnet). Im Stratum radiatum ist das ePSP als negative Kurve beobachtbar. Auch in CA3 Stratum pyramidale entsteht ein EPSP, das allerdings von zwei PopSpikes unterbrochen wird. Der erste PopSpike entsteht durch die antidrome Leitung der Schaffer Kollaterale, wohingegen der zweite durch die rekurrente Verschaltung der Pyramidenneurone zustande kommt. Die Amplituden der PopSpikes (orthodrom) wurden semiautomatisch vermessen (siehe Kasten Abbildung 2.9). Im Stratum radiatum wurde die Steigung des ePSPs als Kriterium herangezogen (siehe Kasten Abbildung 2.9). Bei der Quantifizierung wurden die PopSpikes bzw. die Steigung der ePSPs auf den Mittelwert der ersten 10 PopSpikes normalisiert.

2.11 Statistik

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm S.E.M. (Standardfehler) angegeben. Wenn Gruppen normalverteilt waren, wurde ein parametrischer Test (ungepaarter t-Test, Welch-korrigiert) verwendet, anderenfalls wurde ein nicht-parametrischer Test verwendet (Mann-Whitney Test). P-Werte < 0.05 galten als signifikant. Experimente die mit einer Anzahl von weniger als 6 Wiederholungen in diese Arbeit eingegangen sind, wurden nicht auf Signifikanz getestet.

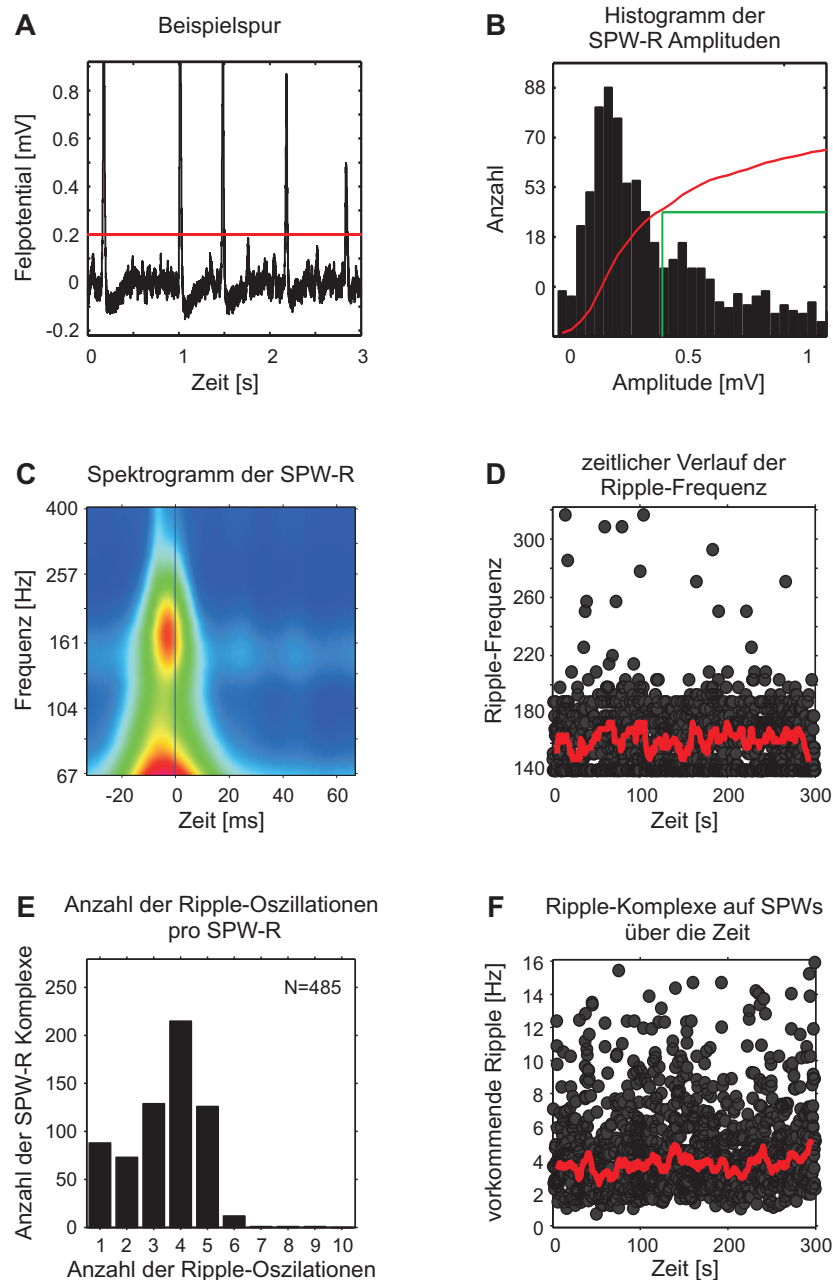


Abbildung 2.8: Analyse der spontan auftretenden SPW-Rs. (A) Beispielspur einer Feldpotentialmessung. Die positiven Auslenkungen sind die SPW-Rs. Ebenfalls dargestellt ist die Detektionsgrenze, hier bei 0.2 mV. Die Detektionsgrenze wurde je nach Größe der Amplituden auf bis zu 0.1 mV herabgesetzt. (B) Histogramm der SPW-R Amplituden (C) Das Spektrogramm der SPW-R zeigt zwei prominente Frequenzen. Die niedrigere Frequenz, bei etwa 60 Hz entspricht der Sharp Wave. Die Frequenz im Bereich von 160 Hz entspricht der *ripple*-Oszillation. Die Nulllinie beschreibt den Zeitpunkt bei dem die SPW-R Amplitude maximal ist. (D) Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der *ripple* Frequenz. (E) Die Anzahl der aufgetretenen SPW-Rs und die Anzahl der *ripple*-Oszillationen wurden gegeneinander aufgetragen (F) *ripple*-Komplexe über die Zeit

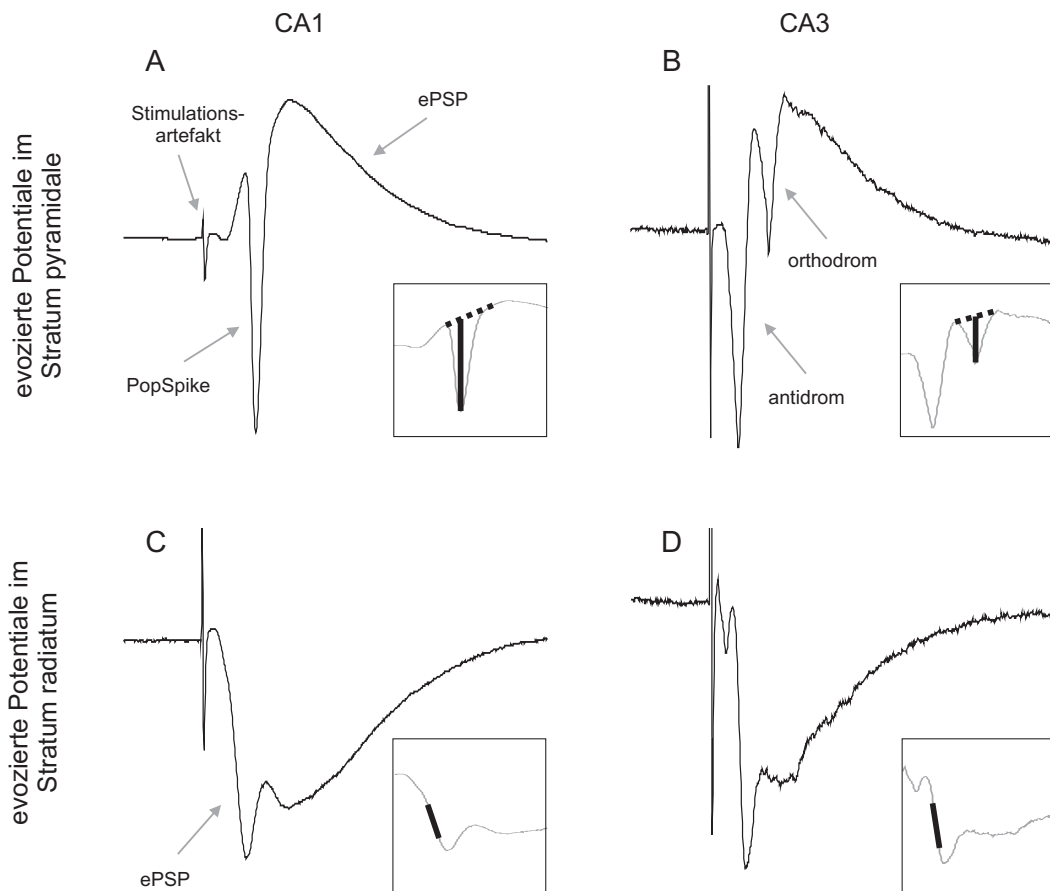


Abbildung 2.9: Analyse der evozierten Potentiale. (A) Elektrische Stimulation der Schaffer Kollateralen evoziert postsynaptische Potentiale (ePSP). In CA1 Stratum pyramidale ist dem ePSP ein PopSpike (Summensaktionspotential) aufgelagert. Die Amplituden des PopSpikes wurden semiautomatisch vermessen (siehe Einsatz). (C) Im Stratum radiatum ist das ePSP als negative Kurve beobachtbar. Die Steigung des ePSPs wurde als Kriterium herangezogen (siehe Einsatz Abbildung). (B) Das ePSP in CA3 Stratum pyramidale ist durch zwei PopSpikes unterbrochen. Der erste PopSpike entsteht durch die antidrome Leitung der Schaffer Kollaterale. Der orthodrome PopSpike, der durch die rekurrente Verschaltung der Pyramidenneurone zustande kommt, wurde semiautomatisch vermessen (siehe Einsatz). (D) Im Stratum radiatum wurde die Steigung des ePSPs ermittelt.

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil ist in zwei Bereiche unterteilt. Im ersten Abschnitt werden die Untersuchungen der heterolog exprimierten HCN4 Mutanten präsentiert. Thema des zweiten Teils ist die Auswirkung des HCN Kanalblockers ZD 7288 auf *sharp wave-ripple* Komplexe (SPW-R).

In Sinusknotenmyocyten wird der Anstieg der diastolischen Depolarisation maßgeblich von dem Schrittmacherstrom I_h bestimmt (Difrancesco et al., 1986, Difrancesco und Tromba, 1988, Difrancesco und Mangoni, 1994, Difrancesco, 1999). Folglich spielt I_h eine Schlüsselrolle bei der Generierung und der autonomen Regulation des Sinusrhythmus (Difrancesco, 1993). In den vergangenen Jahren wurden mehrere Studien veröffentlicht, die belegen, dass heterozygote Mutationen im HCN4 Gen zu erblichen Herzrhythmusstörungen führen können (Schulze-Bahr et al., 2003, Ueda et al., 2004, Milanesi et al., 2006, Nof et al., 2007). In der ersten, von mir untersuchten Mutante (HCN4-695X), verursacht eine Insertion von 13 Nukleotiden an Position 1933 einen *frame shift* wodurch ein frühzeitiges Stop-Codon entsteht. Der folgende Kettenabbruch führt zu einer trunkeierten zyklischen Nukleotid-Bindedomäne (Schweizer et al., 2010). Die zweite Mutation (HCN4 K530N) liegt im C-Linker. Hier führt eine Punktmutation zu einem Aminosäureaustausch. Das positiv geladene Lysin (K) wird an Position 530 durch das neutrale Asparagin (N) ersetzt.

Die zwei in dieser Studie untersuchten HCN4 Mutanten stammen aus zwei verschiedenen Großfamilien. Dr. Jörg Zehelein und Dr. Patrick Schweizer (Medizinisches Universitätsklinikum, Heidelberg) haben viele Familienmitglieder rekrutiert und diversen kardiovaskulären Tests unterzogen.

3.1 Pathologie der HCN4-695X Mutationsträger

Alle Mutationsträger zeigen eine deutliche Sinus-Bradykardie, sind jedoch chronotrop kompetent. Bei adrenerger Stimulation waren fünf von sieben Mutationsträgern anfällig für verfrühte Herzschläge und Episoden bestimmter Sinusarrhythmien.

Hilfe der Goldman-Hodgkin-Katz Spannungsgleichung konnte auch die Ionenleitfähigkeit berechnet werden. Die davon abgeleitete relative Permeabilität für Natrium- und Kaliumionen lag bei 0.25 für beide Kanalsubtypen, d.h. für Kaliumionen etwa vier mal ergiebiger als Natriumionen, was im Bereich eines unselektiven Kanals liegt.

3.2.2 Spannungsabhängigkeit der Aktivierung des HCN4-695X Kanals

HCN Kanäle werden im Gegensatz zu anderen spannungsgesteuerten Ionenkanälen durch Membranhyperpolarisation aktiviert. Mit zunehmender Hyperpolarisation ist auch eine Zunahme der Amplitude des durch Kationen getragenen Einwärtsstroms zu erkennen (Abbildung 3.2 A, D). Eine Veränderung der Spannungsabhängigkeit könnte somit maßgeblich die Funktion taktgebender Sinusknotenzellen beeinflussen.

Das Aktivierungsprofil wurde mit Hilfe des Spannungsprotokolls wie im Material und Methoden Teil beschrieben (Abschnitt 2.6) untersucht. Abbildung 3.2 zeigt die Auswertung der spannungsabhängigen Aktivierungskurven und das Potential der halbmaximalen Aktivierung ($V_{\frac{1}{2}}$). $V_{\frac{1}{2}}$ des Wildtyp Kanals lag bei -87.5 ± 3.3 mV ($n=15$) und verschob sich in Anwesenheit von intrazellulärem cAMP ($10 \mu\text{M}$) in Richtung positiver Potentiale um fast 15 mV ($V_{\frac{1}{2}; \text{cAMP}} = 73.2 \pm 1.8$ mV; $n=16$; $p<0.01$; Abbildung 3.2 B). $V_{\frac{1}{2}}$ des HCN4-695X Kanals war signifikant ($p<0.05$) positiver als die halbmaximale Aktivierung der Wildtyp-Kanäle ($V_{\frac{1}{2}} = -78.5 \pm 2.4$ mV; $n=13$). Allerdings zeigte der HCN4-695X Kanal keine Verschiebung der Aktivierungskurve in der Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ cAMP ($V_{\frac{1}{2}, \text{cAMP}} = -83.1 \pm 2.4$ mV; $n=15$). Der HCN4-695X Kanal unterscheidet sich vom Wildtyp in seiner Spannungsabhängigkeit und in seiner fehlenden cAMP-Insensitivität.

3.2.3 Kinetik der Aktivierung des HCN4-695X Kanals

Die Aktivierung eines Ionenkanals wird nicht allein durch seine Spannungsabhängigkeit (Öffnungswahrscheinlichkeit) bestimmt, sondern auch durch seine Kinetik (Öffnungsgeschwindigkeit). Die Steigung der diastolischen Depolarisation wird beispielsweise durch I_f bestimmt (DiFrancesco, 1986). Die Aktivierungskinetik spielt damit auch eine Rolle während der diastolischen Depolarisation. Die Aktivierungszeitkonstanten (τ) waren spannungsabhängig und nicht signifikant verschieden in Wildtyp und mutiertem Kanal. Die Anwesenheit von intrazellulärem cAMP ($10 \mu\text{M}$) beschleunigte die Aktivierung des Wildtyp-Kanals (von 120 mV = 1.66 ± 0.10 s; $n=13$ auf 120 mV cAMP = 0.88 ± 0.07 s; $n=12$; $p<0.01$; Abbildung 3.2 C). Die Aktivierungskinetik des HCN4-695X Kanals blieb durch intrazelluläres cAMP unverändert (von -120 mV = 1.19 ± 0.16 s; $n=14$

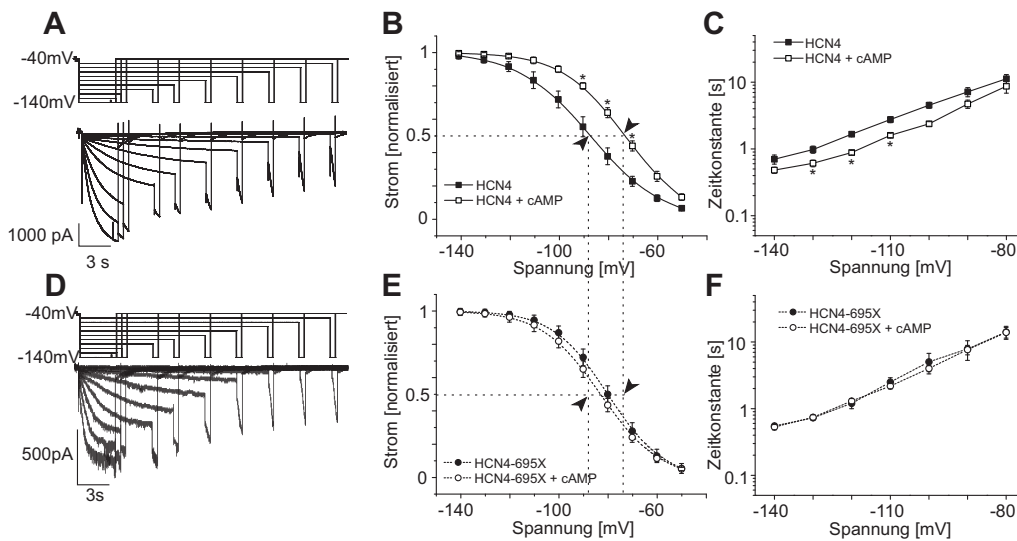


Abbildung 3.2: Aktivierung des HCN4-695X und des HCN4 Kanals. (A) bis (C) beschreibt den Wildtyp Kanal, (D) bis (F) den HCN4-695X Kanal. (A), (D) Spannungsprotokoll (oben) und repräsentative *whole-cell* Stromspuren transfizierter HEK 293 Zellen (unten). (B), (E) Spannungsabhängige Aktivierungskurven des Wildtyp bzw. HCN4-695X Kanals. In Anwesenheit von cAMP verschob sich das Potential der halbmaximalen Aktivierung ($V_{\frac{1}{2}}$) des Wildtyp Kanals signifikant um etwa 15 mV in Richtung positiver Potentiale (B). Beim HCN4-695X Kanal war diese Verschiebung nicht zu beobachten (E, die Pfeilspitzen zeigen die entsprechenden $V_{\frac{1}{2}}$ des Wildtyps an). (C), (F) Die Kinetik der Aktivierung wurde durch einen exponentiellen Fit der Stromspuren bestimmt. In Anwesenheit von cAMP waren die Zeitkonstanten des HCN4 Kanals signifikant kleiner (C). Die Zeitkonstanten des HCN4-695X Kanals wurden durch cAMP nicht beeinflusst (F).

auf 120 mV cAMP = 1.37 ± 0.10 s; $n=15$; $p>0.05$; Abbildung 3.2 F). Diese Ergebnisse deuten, ebenso wie die der halbmaximalen Aktivierung auf eine cAMP-Insensitivität des mutierten Kanals hin.

3.2.4 Deaktivierungseigenschaften des HCN4-695X Kanals

Die Untersuchung der Deaktivierung ist ein weiterer Parameter der Aufschluss über die Rolle der HCN Kanäle bei der Herzfrequenzregulation bringen könnte. Verbleiben HCN4 Kanäle länger in der geöffneten Konformation, könnte dies eine schnellere Re-Depolarisationen und somit eine gesteigerte Herzfrequenz begünstigen. Die Deaktivierungseigenschaften wurden mit Hilfe eines Zweischnittprotokolls erarbeitet (siehe Abschnitt 2.6). Dabei spiegelt der initiale instantane Strom (I_{INS}), der dem zweiten Spannungssprung folgt, die Fraktion der Kanäle wider die noch nicht deaktiviert wurden. Mit länger andauernden Zwischenpulszeiten nimmt der instantane Strom ab, da mehr und mehr Kanäle geschlossen sind.

Die Abnahme des ΔI_{INS} (I_{INS} normalisiert auf die maximal Aktivierung des *steady-state* Stromes (I_{SS})) zeigte keine Unterschiede zwischen wildtyp und HCN4-695X im zeitlichen Verlauf (Abbildung 3.4). In der Anwesenheit von cAMP und einer Zwischenpulszeit von 1 s stieg I_{INS} des Wildtyps von $47 \pm 7 \%$ ($n=10$) auf $65 \pm 5 \%$ ($n=11$; $p<0.05$) an. Ähnliche Unterschiede konnten auch bei anderen Zwischenpulszeiten beobachtet werden (siehe Abbildung 3.3). Im Gegensatz dazu zeigte die Mutante keinen cAMP-vermittelten Effekt auf die Deaktivierungseigenschaften (Abbildung 3.3). In Anwesenheit von cAMP verweilen Wildtypkanäle für längere Zeit in einem Offenzustand. Daher ist es vorstellbar, dass mehr HCN4 Kanäle für die diastolische Depolarisation zur Verfügung stehen als dies bei HCN4-695X Kanälen der Fall wäre.

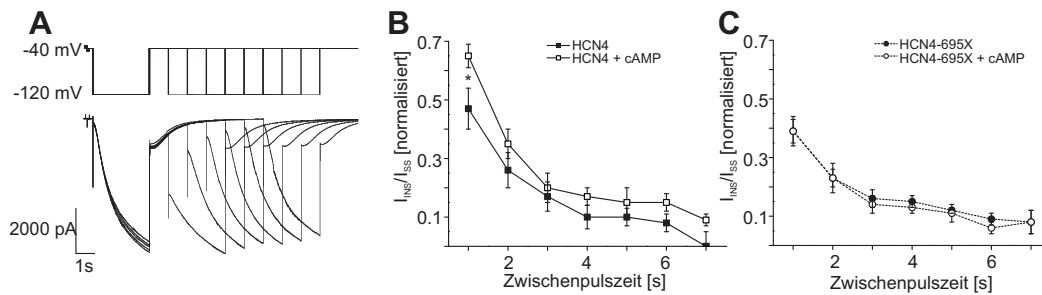


Abbildung 3.3: Deaktivierungseigenschaften des HCN4-695X und des HCN4 Kanals. (A) Die Deaktivierungseigenschaften wurden mittels dieses Spannungsprotokolls untersucht (siehe Material und Methoden), und in (B), (C) quantifiziert. Mit größer werdenden Zwischenpulszeiten nahm die instantane Stromantwort (I_{INS}) ab. (B) Bei Wildtyp Kanälen nahm I_{INS} in Anwesenheit von cAMP (offene Kreise), im Vergleich zu basalen Bedingungen (gefüllte Kreise), zu. (C) Den HCN4-695 Kanälen fehlte die Modulierbarkeit durch cAMP.

3.2.5 Aktivierung des heteromeren HCN4/HCN4-695X Kanals

Heterozygote Träger der HCN4-695X Mutation zeigen eine Sinusbradykardie. Daher sollte der heteromere zelluläre Phänotyp der 695X-Mutationsträger nachgeahmt werden, indem HEK 293 Zellen mit den Plasmiden, die für den Wildtyp und den HCN4-695X Kanal kodieren, co-transfiziert wurden. Das Mischungsverhältnis der Plasmide betrug 1:1. Unter basalen Bedingungen zeigten Zellen, die den heteromeren Kanal exprimierten, ein $V_{1/2}$ von -89.6 ± 3.3 mV ($n=12$). Dieses $V_{1/2}$ des heteromeren Kanals ist vergleichbar mit dem des homomeren Wildtyps (-87.5 ± 3.3 mV; $n=15$; Abbildung 3.4), unterscheidet sich aber signifikant von dem der homomeren Mutante (-78.5 ± 2.4 mV; $n=13$; $p=0.01$). Die Aktivierungszeitkonstanten des heteromeren Kanals lagen zwischen denen des homomeren Wildtyps und der homomeren Mutante, waren allerdings nicht signifikant unterschiedlich (Tabelle 3.1 und Abbildung 3.4). Ebenso wie der monomeren Mutante fehlt dem heteromeren Kanal die Modulierbarkeit durch cAMP (basal: -89.6 ± 3.3 mV; $n=12$, mit cAMP: -85.7 ± 3.7 mV; $n=14$; $p>0.05$). Dies deutet auf eine dominant-negative Suppression der cAMP-vermittelten Aktivierung der HCN4 Kanäle durch die mutierte

Untereinheit hin.

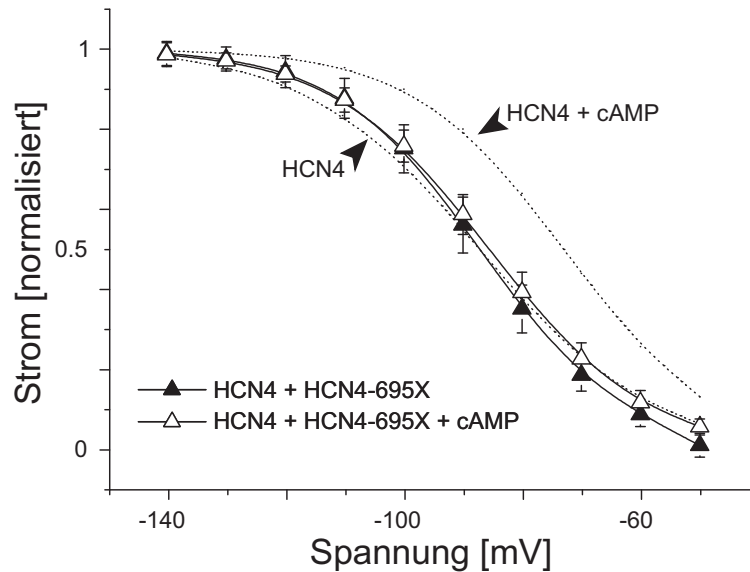


Abbildung 3.4: Spannungsabhängige Aktivierungskurven des heteromeren HCN4/HCN4-695X Kanals. Spannungsabhängigkeit des heteromeren Kanals, bestehend aus HCN4 und HCN4-695X Untereinheiten. In Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ cAMP verschob sich die Aktivierungskurve des heteromeren Kanals nicht. Zum Vergleich sind auch die Aktivierungskurven des homomeren HCN4 Kanals (gestrichelte Kurven) angezeigt.

Eine Zusammenfassung der grundlegenden elektrophysiologischen Eigenschaften bietet Tabelle 3.1.

3.3 Klinik der HCN4 K530N Mutante

Die K530N Mutation scheint mit einer leicht bradykarden Herzfrequenz assoziiert zu sein. In höherem Lebensalter (> 55 Jahre) entwickelt sich eine Sinusknotendysfunktion mit chronischem Vorhofflimmern und Tachykardie-Bradykardie Symptomatik. Diese Symptomatik wurde bei 3 lebenden Mutationsträgerinnen und 2 bereits verstorbenen mutmaßlichen Mutationsträgerinnen nachgewiesen. Auch hier wurde der mutierte Kanal kloniert und heterolog in HEK 293 Zellen exprimiert und anschließend mittels patch-clamp (*whole-cell* Konfiguration) untersucht.

3.4 Funktionelle Untersuchung

Die Untersuchung der zweiten Mutante erfolgte nach einem analogen Muster. Zuerst wurde das Umkehrpotential bestimmt um die zugrundeliegenden Permeationseigenschaften des Kanals zu bestimmen.

3.4.1 Umkehrpotential (E_{rev}) des HCN4 K530N Kanals

Hier wurden ebenfalls die hyperpolarisationsaktivierte Ströme der HCN4 Mutante und des Wildtyps in transient transfizierten HEK 293 Zellen analysiert. Das Umkehrpotential des HCN4 K530N Kanals ($E_{rev} = -18.4 \pm 0.5$ mV; $n=12$) unterschied sich von dem des Wildtyps ($E_{rev} = -22.2 \pm 1.4$ mV; $n=8$; $p<0.05$) (Tabelle 3.1 und Abbildung 3.5). Die Strom-Spannungsbeziehung (Abbildung 3.5 B) verlief über den gesamten Bereich der Aktivierungspotentiale linear. Auch diese Mutante besitzt also keine bevorzugte Richtung der Leitfähigkeit. Mittels der Goldman-Hodgkin-Katz Spannungsgleichung wurde die Ionenleitfähigkeit berechnet. Die davon abgeleitete relative Permeabilität für Natrium und Kalium lag bei 0.3 für die Mutante. Damit leitet der homomere K530N Kanal Kaliumionen etwa drei mal ergiebiger als Natriumionen, beim Wildtyp ergab die relative Permeabilität eine Präferenz von Kaliumionen um den Faktor 4.

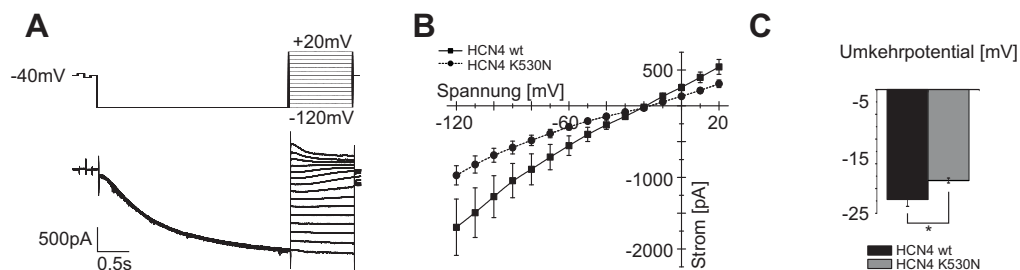


Abbildung 3.5: Umkehrpotential des HCN4 K530N und des HCN4 Kanals. (A) Repräsentative HCN4 Stromspur. Der Kanal wird erst durch eine Hyperpolarisation bei -120 mV aktiviert. Anschließend erfolgt ein Sprung auf verschiedene Potentiale. Die jeweilige Stromamplitude zu Beginn der Stromantwort wurde zur Erstellung der Strom-Spannungsbeziehung verwendet. Über der Stromspur ist das verwendete Spannungsprotokoll gezeigt. (B) Strom-Spannungsbeziehung für den HCN4 Wildtyp (Quadrat) und den HCN4 K530N Kanal (Kreis). Alle Kanäle zeigen einen linearen Verlauf und somit keine Gleichrichterfunktion. (C) Das Umkehrpotential der beiden Kanäle unterscheidet sich um etwa 4 mV signifikant.

3.4.2 Spannungsabhängigkeit der Aktivierung des HCN4 K530N Kanals

Als nächstes wurde das Aktivierungsverhalten untersucht. Sowohl die Spannungsabhängigkeit als auch die Kinetik der Aktivierung des HCN4 K530N Kanals wurden ermittelt und mit den Ergebnissen der Wildtypdaten verglichen. Der HCN4 K530N Kanal zeigte ebenfalls mit zunehmender Hyperpolarisation eine Zunahme der Stromamplitude (Abbildung 3.6 A). Eine Veränderung der Spannungsabhängigkeit könnte somit maßgeblich die Funktion taktgebender Sinusknotenzellen beeinflussen. Das Aktivierungsprofil beider Kanäle ähnelte sich (Abbildung 3.6) und wurde mit Hilfe des Spannungsprotokolls wie im Material und Methoden Teil beschrieben (Abschnitt 2.6) untersucht. Abbildung 3.6 zeigt die Auswertung der spannungsabhängigen Aktivierungskurven und das Potential

der halbmaximalen Aktivierung ($V_{\frac{1}{2}}$). Das Potential der halbmaximalen Aktivierung war nahezu identisch ($V_{\frac{1}{2}; \text{wt}} = -87.5 \pm 3.3 \text{ mV}$; $n=15$, $V_{\frac{1}{2}; \text{K530N}} = -88.8 \pm 1.9 \text{ mV}$; $n=19$; $p>0.05$). Intrazelluläres cAMP ($10 \mu\text{M}$) verursachte in beiden Kanälen eine Verschiebung der Aktivierungskurven in Richtung positiver Potentiale (cAMP: $V_{\frac{1}{2}; \text{wt}} = -73.2 \pm 1.8 \text{ mV}$; $n=16$; $p<0.01$, $V_{\frac{1}{2}; \text{K530N}} = -71.4 \pm 1.9 \text{ mV}$; $n=14$; $p<0.01$).

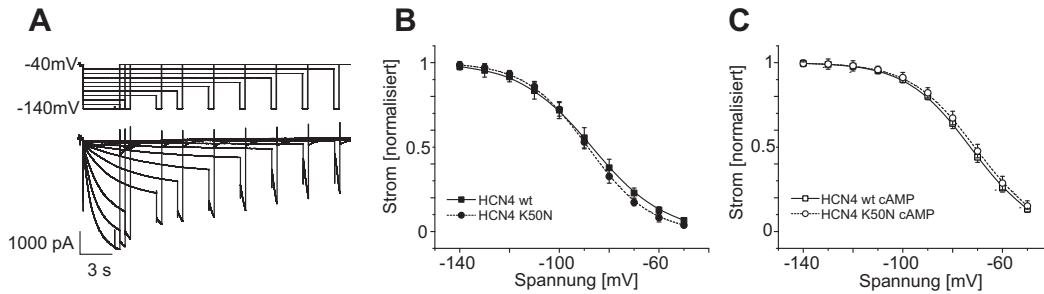


Abbildung 3.6: Spannungabhängige Aktivierung des HCN4 K530N und des HCN4 Kanals. (A) Spannungprotokoll (oben) und repräsentative *whole-cell* Stromspuren transfizierter HEK 293 Zellen (unten). (B) Spannungabhängige Aktivierungskurven des Wildtyp (Quadrat) bzw. HCN4-695X (Kreis) Kanals. Beide Kurven sind nahezu identisch. (C) In Anwesenheit von cAMP verschoben sich die Aktivierungskurven beider Kanäle signifikant um etwa 15 mV in Richtung positiver Potentiale.

3.4.3 Kinetik der Aktivierung des HCN4 K530N Kanals

Auch die Aktivierungszeitkonstanten des homomeren HCN4 K530N Kanals unterscheiden sich nicht von denen des Wildtyps (siehe Tabelle 3.1 und Abbildung 3.7). Die Aktivierung wurde in beiden Kanälen durch cAMP-Modulation beschleunigt.

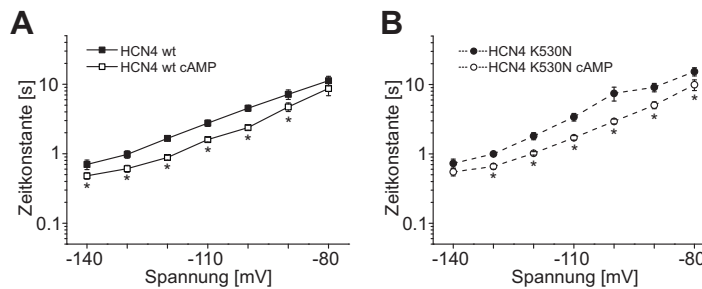


Abbildung 3.7: Aktivierungskinetik des HCN4 K530N und des HCN4 Kanals. (A) Die Kinetik der Aktivierung wurde durch einen exponentiellen Fit der Stromspuren bestimmt. In Anwesenheit von cAMP waren die Zeitkonstanten des HCN4 Kanals signifikant kleiner. (B) Die Aktivierungsgeschwindigkeit des HCN4 K530N Kanals wurden durch cAMP ebenfalls signifikant beschleunigt.

Nachdem das Aktivierungsprofil des HCN4 K530N Kanals nahezu identisch mit dem des Wildtyps ist, stellte sich die Frage, ob sich Unterschiede in den Deaktivierungsverhalten

ergeben, die eine Bradykardie erklären könnten.

3.4.4 Deaktivierungseigenschaften des HCN4 K530N Kanals

Die Deaktivierungseigenschaften wurden mit Hilfe eines Zweischrittprotokolls erarbeitet (siehe Abschnitt 2.6). Dabei spiegelt der initiale instantane Strom (I_{INS}), der dem zweiten Spannungssprung folgt, die Fraktion der noch nicht deaktivierten Kanäle wider. Mit länger andauernden Zwischenpulszeiten nimmt der instantane Strom ab, da mehr und mehr Kanäle geschlossen sind (Abbildung 3.8 A). Die Abnahme des I_{INS} (I_{INS} normalisiert auf die maximale Aktivierung des *steady-state* Stromes (I_{SS})) zeigte keine Unterschiede zwischen HCN4 und HCN4 K530N im zeitlichen Verlauf (Abbildung 3.8 B, C). In der Anwesenheit von cAMP und einer Zwischenpulszeit von 1 s stieg I_{INS} des Wildtyps von $47 \pm 7\%$ ($n=10$) auf $65 \pm 5\%$ ($n=11$; $p<0.05$) an. Ähnliche Unterschiede konnten auch bei anderen Zwischenpulszeiten beobachtet werden (siehe Abbildung 3.8). Bei HCN4 K530N Kanälen stieg I_{INS} von $46 \pm 4\%$ ($n=10$) auf $65 \pm 4\%$ ($n=11$; $p<0.01$) in Anwesenheit von cAMP an (Abbildung 3.8). Auch hier konnten ähnliche Unterschiede bei anderen Zwischenpulszeiten beobachtet werden. Die Deaktivierungseigenschaften beider Kanäle entsprechen einander.

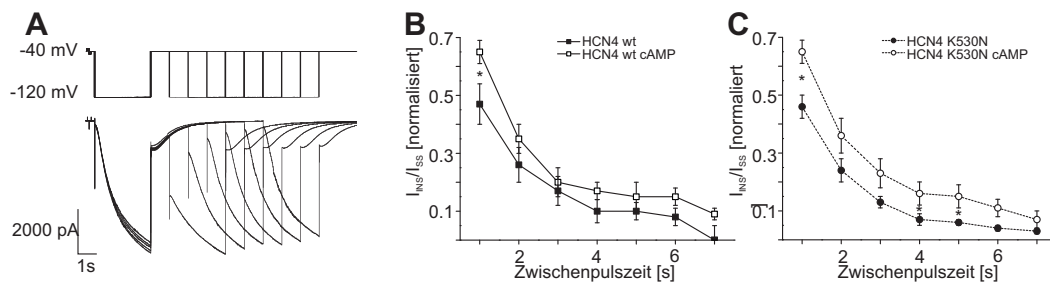


Abbildung 3.8: Deaktivierungseigenschaften des HCN4 K530N und des HCN4 Kanals. (A) Die Deaktivierungseigenschaften wurden mittels dieses Spannungspulskolls untersucht (siehe Material und Methoden), und in (B), (C) quantifiziert. Mit größer werdenden Zwischenpulszeiten nahm die instantane Stromantwort (I_{INS}) ab. (B) Bei Wildtyp Kanälen nahm I_{INS} in Anwesenheit von cAMP (offene Kreise), im Vergleich zu basalen Bedingungen (gefüllte Kreise), zu. (C) Die HCN4 K530N Kanäle waren ebenfalls durch cAMP modulierbar. Die Deaktivierungseigenschaften waren denen des HCN4 Kanals ähnlich.

3.4.5 Aktivierung des heteromeren HCN4/HCN4 K530N Kanals

Schulze-Bahr und Kollegen (2003) konnten zeigen, dass eine mutierte HCN4 Unter-einheit einen dominant-negativen Effekt auf den heteromeren Kanal haben kann. Die Untersuchung der HCN4 K530N Mutante zeigte in der homomeren Konformation keine

Unterschiede zum Wildtyp. Möglicherweise verhält sich der heteromere Kanal unterschiedlich.

Um den heteromeren zellulären Phänotyp der von der K530N-Mutation betroffenen Patienten nachzuahmen, wurden HEK 293 Zellen mit Wildtyp und HCN4 K530N Plasmiden (Mischungsverhältnis 1:1) co-transfiziert. Verglichen mit dem homomeren Wildtypdaten, war unter basalen Bedingungen eine Verschiebung der halbmaximalen Aktivierung in Richtung negativerer Potentiale zu beobachten ($V_{\frac{1}{2}; \text{het}} = -101.7 \pm 3 \text{ mV}$; $n=13$ verglichen mit $V_{\frac{1}{2}; \text{wt}} = -87.5 \pm 3.3 \text{ mV}$; $n=15$; $p<0.01$). Obwohl die spannungsabhängige Aktivierung der heteromeren Kanäle in Anwesenheit von cAMP sich wieder in Richtung positiverer Potentiale verschob ($-80.0 \pm 2.6 \text{ mV}$, $n=13$; $p<0.01$, Abbildung 3.9), lag das Potential der halbmaximalen Aktivierung dennoch negativer als das des reinen Wildtyps bzw. der homomeren Mutante (-73 mV ; $p>0.05$ bzw. -71 mV ; $p<0.05$).

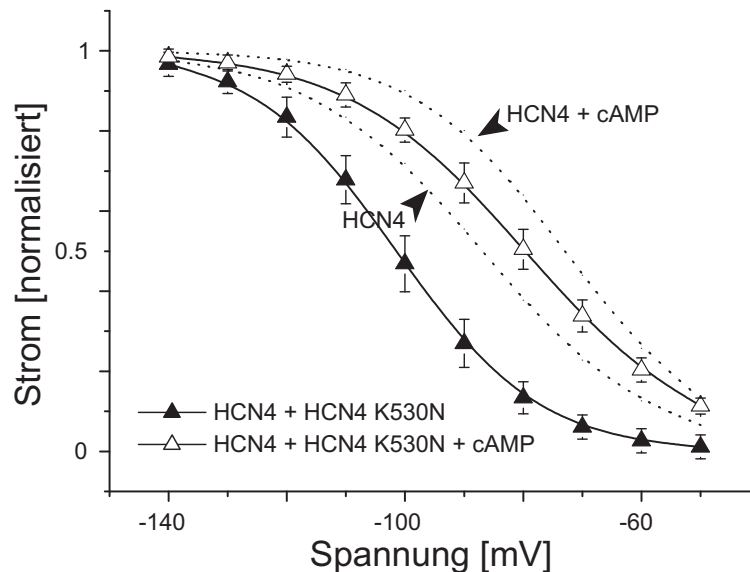


Abbildung 3.9: Spannungsabhängige Aktivierungskurven des heteromeren HCN4/HCN4 K530N Kanals. Unter basalen Bedingungen lag die halbmaximale Aktivierung des heteromeren Kanals, bestehend aus HCN4 und HCN4 K530N Untereinheiten, bei negativeren Potentiale als die des homomeren Wildtyp Kanals. Während sich die Aktivierungskurve des homomeren Wildtyp-Kanals in Anwesenheit von cAMP um 14.3 mV verschob, verschob sich die Aktivierungskurve des heteromeren Kanals sogar um 17.4 mV. Zum Vergleich sind auch die Aktivierungskurven des homomeren HCN4 Kanals (gestrichelte Kurven) angezeigt.

Die Aktivierungszeitkonstanten des heteromeren Kanals waren in Abwesenheit von cAMP vergleichbar mit denen des Wildtyps und der Mutante. In Anwesenheit von cAMP unterschieden sich die Zeitkonstanten für den Spannungsbereich von -120 bis -100 mV (z.B. 120 mV = $3.94 \pm 0.13 \text{ s}$ gegen 1.7 s; $p<0.05$ oder 1.8 s; $p<0.05$ des Wildtyps bzw. der K530N Mutante).

	basal				cAMP-moduliert			
	$V_{\frac{1}{2}}$ [mV]	V_c [mV]	g_{\max} [μ S]	τ_{-120} [s]	$V_{\frac{1}{2}}$ [mV]	V_c [mV]	g_{\max} [μ S]	τ_{-120} [s]
<i>H</i> HCN4	-87.5 ± 3.3 ($n = 15$)	-14.0 ± 1.3 ($n = 15$)	0.21 ± 0.06 ($n = 8$)	1.66 ± 0.10 ($n = 13$)	-73.2 ± 1.8 ($n = 16$)	-12.3 ± 0.7 ($n = 16$)	0.28 ± 0.06 ($n = 10$)	0.88 ± 0.07 ($n = 12$)
<i>H</i> HCN4 – 695X	-80.1 ± 2.7 ($n = 14$)	-10.5 ± 0.9 ($n = 14$)	0.11 ± 0.02 ($n = 13$)	1.19 ± 0.16 ($n = 14$)	-83.1 ± 2.4 ($n = 15$)	-11.3 ± 1.1 ($n = 15$)	0.14 ± 0.02 ($n = 14$)	1.37 ± 0.10 ($n = 15$)
<i>H</i> HCN4/ <i>H</i> HCN4 – 695X	-89.6 ± 3.3 ($n = 12$)	-12.2 ± 1.3 ($n = 12$)	0.26 ± 0.03 ($n = 11$)	1.47 ± 0.13 ($n = 10$)	-85.7 ± 3.7 ($n = 14$)	-12.7 ± 1.2 ($n = 14$)	0.26 ± 0.07 ($n = 13$)	1.14 ± 0.11 ($n = 12$)
<i>H</i> HCN4 K530N	-88.8 ± 1.9 ($n = 19$)	-10.5 ± 0.9 ($n = 14$)	0.17 ± 0.03 ($n = 13$)	1.81 ± 0.21 ($n = 18$)	-71.4 ± 1.9 ($n = 14$)	-11.3 ± 1.1 ($n = 15$)	0.17 ± 0.05 ($n = 14$)	1.02 ± 0.06 ($n = 14$)
<i>H</i> HCN4/ <i>H</i> HCN4 K530N	-101.7 ± 2.6 ($n = 13$)	-11.5 ± 0.9 ($n = 13$)	0.15 ± 0.04 ($n = 7$)	3.94 ± 0.68 ($n = 8$)	-80.0 ± 2.6 ($n = 13$)	-14.5 ± 1.4 ($n = 13$)	0.14 ± 0.03 ($n = 13$)	1.05 ± 0.08 ($n = 13$)

Tabelle 3.1 zeigt eine Zusammenfassung der grundlegenden elektrophysiologischen Eigenschaften der HCN4, HCN4-695X bzw. HCN4 K530N Kanäle sowie die der heteromeren Kanäle. $V_{\frac{1}{2}}$, Potential der halbmaximalen Aktivierung; V_c , Steigung in Punkt $V_{\frac{1}{2}}$; g_{\max} , maximale Leitfähigkeit; τ_{-120} , Aktivierungszeitkonstante bei -120 mV.

3.5 Feldpotentiale

Man geht davon aus, dass *sharp wave-ripple* Komplexe synchrones Feuern verschiedener CA3 Pyramidenzellpopulationen widerspiegelt (Buzsáki, 1986). Diese spontan auftretenden Ereignisse (SPW-Rs) entstehen im rekurrent verschalteten CA3-Netzwerk und werden über die Schaffer Kollaterale zur CA1 Region weitergeleitet. Die Relevanz der HCN Kanäle bei der synaptischen Integration von Signalen ist schon seit geraumer Zeit bekannt. Noch unklar ist hingegen, welche Rolle HCN Kanäle bei der Generierung und der Weiterleitung von SPW-Rs haben. Zu diesem Zweck wurde der potente I_h Blocker ZD 7288 eingesetzt. Spontan auftretende Netzwerkereignisse wurden als Feldpotentiale im Stratum pyramidale (pyr), sowie im Stratum radiatum (rad) horizontaler Maushippocampusanschnitte gemessen. Sowohl in CA1 als auch in CA3 war die schnell Ripple-Oszillation von vergleichbarer Frequenz, wie die in vivo gemessene Ripple-Oszillation (Buzsáki et al., 1992, Nakashiba et al., 2009) (in CA1: 170 Hz, in CA3 180 Hz). Die in dieser Arbeit in vitro gemessenen *sharp waves* treten in dendritischen Schichten als nach unten gerichteter Ausschlag (*sink*), in der Pyramidalzellschicht als nach oben gerichteter Ausschlag (*source*) auf (Abbildung 3.10).

3.5.1 Die kontinuierliche Applikation des I_h Blockers reduzierte die SPW-R Frequenz sowie die Amplitude der evozierten Feldpotentiale

Maccaferri und Kollegen konnten 1996 zeigen, dass eine ZD-vermittelte Blockade von I_h in spontan aktiven Interneuronen zu einer verminderten Feuerfrequenz führt. Welche Folgen eine ZD-vermittelte Blockade des I_h auf die Inzidenz spontaner Netzwerkereignisse hat, soll hier untersucht werden.

Die kontinuierliche Applikation von 10 μM ZD 7288 reduzierte die Frequenz der auftretenden SPW-Rs (Abbildung 3.10). Zur Quantifizierung wurden die detektierten SPW-R in aufeinander folgende 5-Minutenintervalle aufgeteilt und ihre Frequenz gemittelt (Abbildung 3.11). In der CA1 Pyramidenzellschicht nahm die Frequenz nach 40 minütiger I_h Blocker Applikation von anfänglichen 3.75 ± 0.56 Hz auf 1.80 ± 0.29 Hz signifikant ab ($n=6$; $p<0.01$). Dieser Effekt war auch im Stratum radiatum zu beobachten. Die Frequenz der auftretenden SPW-Rs verringerte sich von 2.76 ± 0.79 Hz auf 1.60 ± 0.49 Hz ($n=4$). In den entsprechenden Strata der CA3 Region war dies ebenso zu beobachten; hier verringerte sich die SPW-R Frequenz im Pyramidenzellband von 2.99 ± 0.59 Hz auf 1.56 ± 0.34 Hz ($n=5$). Im Stratum radiatum wurde die Frequenz nach ZD 7288 Applikation von 3.08 ± 0.80 Hz signifikant auf 1.76 ± 0.56 Hz ($n=6$; $p<0.01$) vermindert. Beim Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Frequenzminderung waren weder Unterschiede zwischen den Strata (pyramidale gegen radiatum) noch zwischen den Regionen (CA1 gegen CA3) feststellbar (Abbildung 3.11).

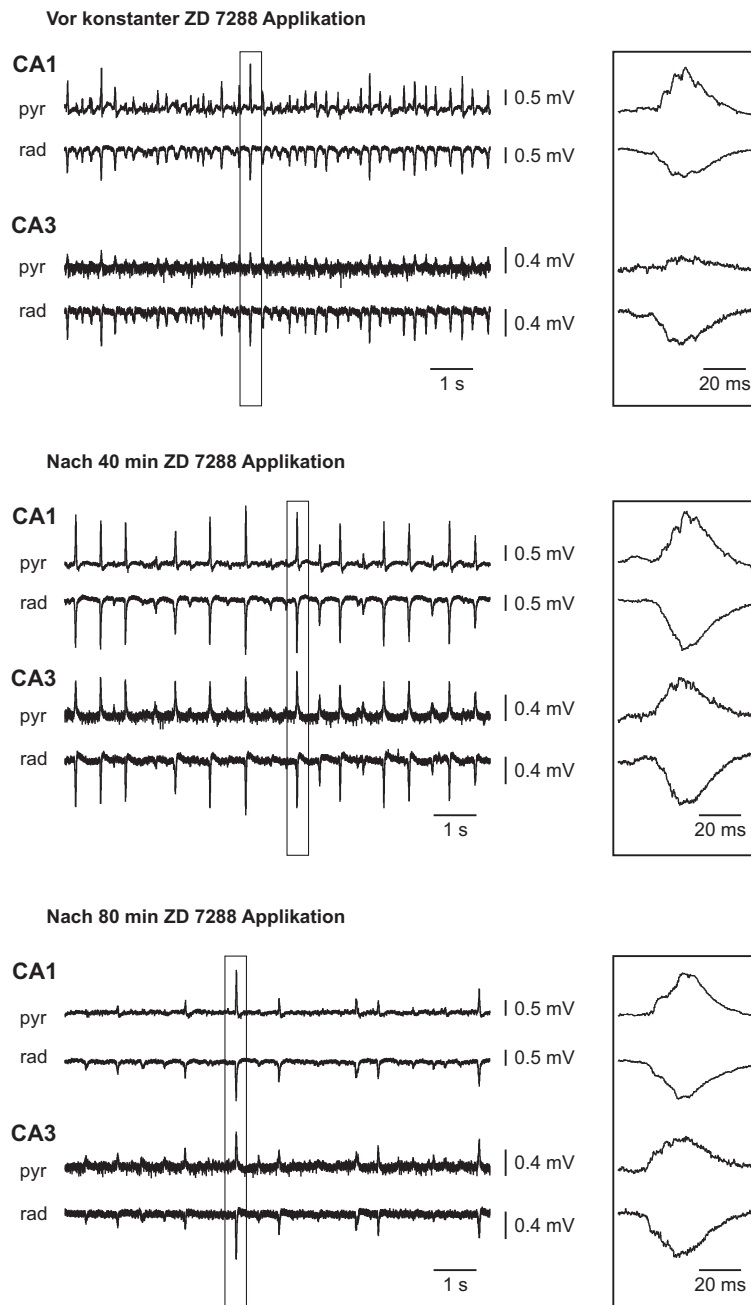


Abbildung 3.10: Beispiel einer Rohdatenspur vor und nach konstanter Applikation von ZD 7288 (Oben) Spontan auftretende *sharp wave-ripple* Komplexe (SPW-Rs) in den verschiedenen Strata (von oben nach unten: CA1 Stratum pyramidale, CA1 Stratum radiatum, CA3 Stratum pyramidale und CA3 Stratum radiatum). Die umrandeten SPW-Rs sind rechts im Detail dargestellt. **(Mitte)** Nach 40 minütiger Applikation von $10 \mu\text{M}$ ZD 7288 nahm die Frequenz der spontan auftretenden SPW-Rs ab, während die Amplituden anstiegen. Die umrandeten SPW-Rs sind rechts im Detail dargestellt. **(Unten)** Nach 80 minütiger Applikation von $10 \mu\text{M}$ ZD 7288 nahm die Frequenz der spontan auftretenden SPW-Rs weiterhin ab, wohingegen die Amplituden zunahm. Die umrandeten SPW-Rs sind rechts im Detail dargestellt. (Zur Veranschaulichung ist die Skalierung zu allen drei Zeitpunkten gleich).

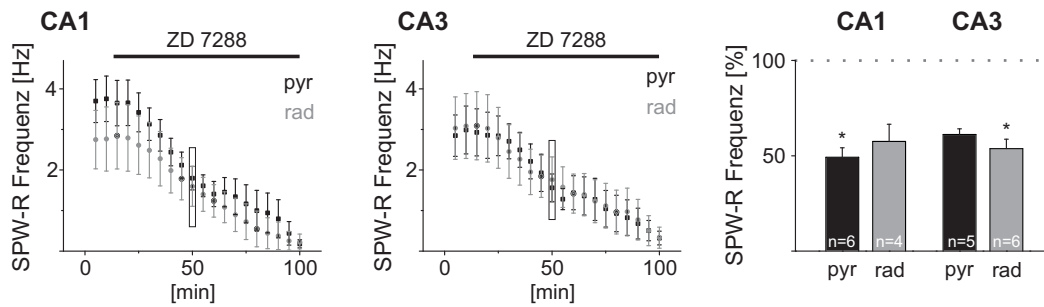


Abbildung 3.11: SPW-R Frequenzminderung nach konstanter ZD 7288 Applikation. Konstante Applikation von $10 \mu\text{M}$ ZD 7288 reduzierte die gemittelte SPW-R Frequenz (5 min Intervalle) in CA1 Stratum pyramidale und Stratum radiatum (**links**) sowie in CA3 Stratum pyramidale und Stratum radiatum (**Mitte**). Die umrahmten Werte sind im Balkendiagramm (**rechts**) dargestellt und entsprechen den normalisierten Werten nach 40 minütiger ZD 7288 Einwirkung. Signifikante Änderungen ($p < 0.05$) sind mit Sternchen versehen. (n = Anzahl der Experimente)

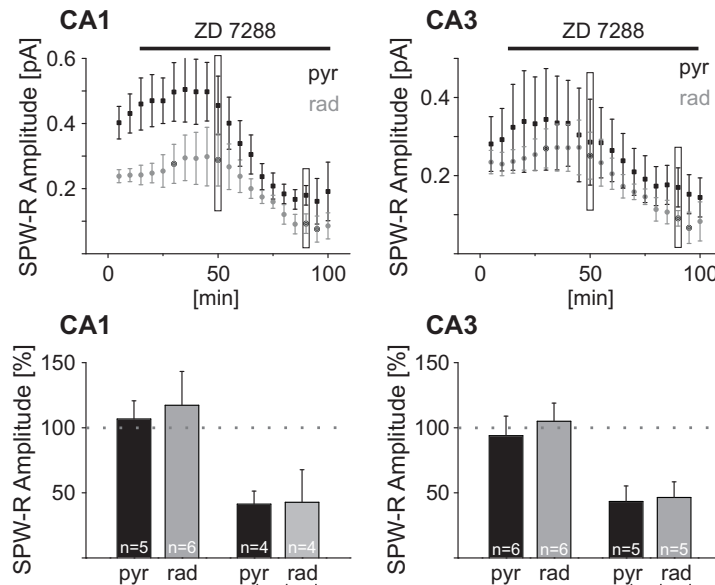


Abbildung 3.12: Effekt der konstanten ZD 7288 Applikation auf die SPW-R Amplitude. (**Oben**) Nach konstanter Applikation von $10 \mu\text{M}$ ZD 7288 stieg die gemittelte SPW-R Amplitude (5 min Intervalle) im Stratum pyramidale der CA1 und CA3 Region initial an und nahm im weiteren Verlauf ab (schwarze Quadrate). Im Stratum radiatum der CA1 und CA3 Region setzte der Verlauf verzögert ein (in grau). Die umrahmten Werte sind im Balkendiagramm (**unten**) dargestellt und entsprechen den normalisierten Werten nach 40 minütiger, bzw. nach 80 minütiger ZD 7288 Einwirkung. (n = Anzahl der Experimente)

Die Amplitude der *sharp waves* ist stark von der Anzahl der postsynaptisch aktivierten Synapsen und deren Umkehrpotential abhängig. Je mehr Zellen depolarisiert werden, bzw. je größer die postsynaptische Depolarisation oder Hyperpolarisation ist, umso größer ist das messbare Feld. Durch Applikation von $10 \mu\text{M}$ ZD 7288 kam es, sowohl in CA1 als auch in CA3, innerhalb von 30 min zu einem Anstieg der SPW Amplituden. In CA1 stieg die Amplitude initial von $0.43 \pm 0.13 \text{ mV}$ auf $0.46 \pm 0.19 \text{ mV}$ ($n=5$), in CA3

war ein ähnlicher Trend sichtbar (Abbildung 3.12). Anschließend nahm die Amplitude stetig ab. In CA1 lag die SPW Amplitude nach 90 min unterhalb der Detektionsgrenze (< 0.2 mV). Vergleicht man den zeitlichen Verlauf zwischen Stratum radiatum und Stratum pyramidale so setzte die Wirkung des Blockers zuerst im Pyramidale ein. Dies war sowohl in CA1 als auch in CA3 zu beobachten (Abbildung 3.12).

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass der Blocker ZD 7288 die Frequenz und die Amplitude spontaner SPW-Rs vermindert. Es könnte sein, dass der Blocker die Reizeiterleitung der Neuronen beeinträchtigt. Um mögliche Veränderungen der Reizweiterleitung festzustellen, wurden im Folgenden die Schaffer Kollateralen durch definierte und konstante elektrische Stimulation gereizt.

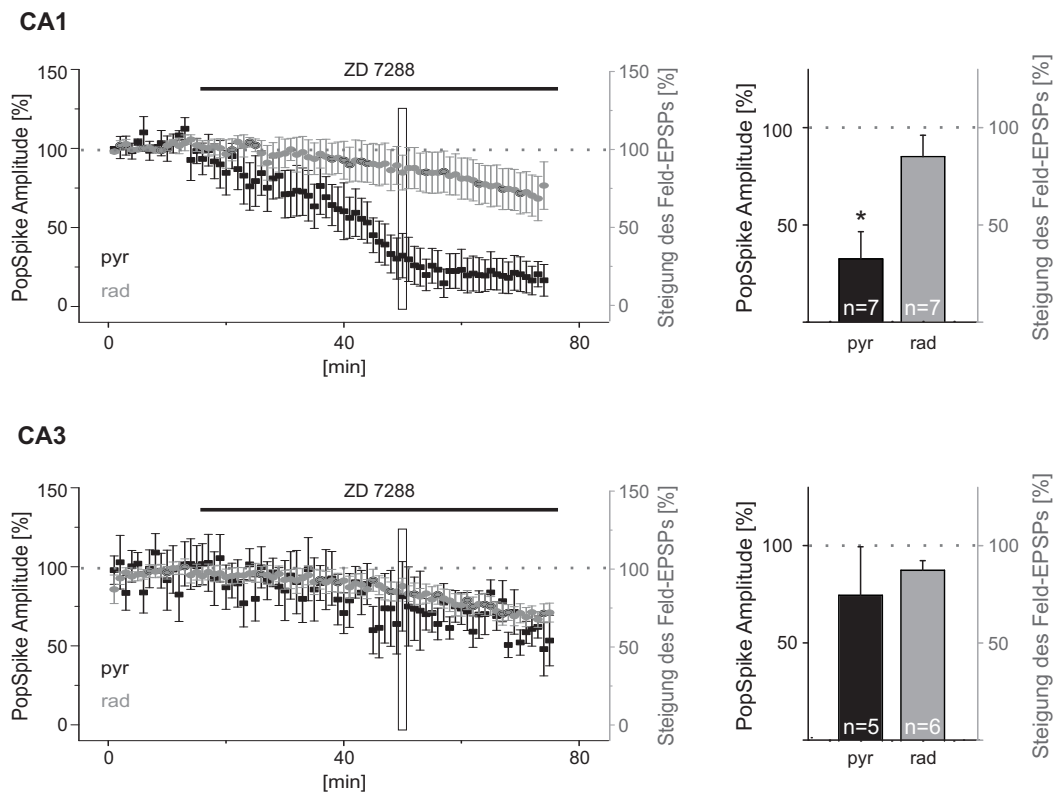


Abbildung 3.13: Effekt der konstanten ZD 7288 Applikation auf evozierte Potentiale. Nach konstanter Applikation von $10 \mu\text{M}$ ZD 7288 verringerte sich die gemittelte PopSpike Amplitude in CA1 Stratum pyramidale signifikant (**links**, schwarze Quadrate). Weniger ausgeprägt war die Reduktion der PopSpike Amplitude in der CA3 Region. Die Steigung der Feld-EPSPs im Stratum radiatum blieb in CA1 und CA3 nahezu unverändert. Die umrahmten Werte sind im Balkendiagramm (**rechts**) dargestellt und entsprechen den normalisierten Werten nach 40 minütiger ZD 7288 Einwirkung. Signifikante Änderungen ($p < 0.05$) sind mit Sternchen versehen. (n = Anzahl der Experimente)

Durch elektrische Stimulation der Schaffer Kollateralen konnten Signale evoziert werden (Abbildung 2.8). In der CA1 Region verringerte sich die PopSpike Amplitude nach konstanter Applikation von $10 \mu\text{M}$ ZD 7288 signifikant auf $32 \pm 14\%$ (n=7; $p < 0.05$)

(Abbildung 3.13). Weniger ausgeprägt war die Reduktion der evozierten Potentiale im Stratum radiatum ($85 \pm 11 \%$; $n=7$; $p>0.05$) sowie in den Strata der CA3 Region (Pyramidale: $75 \pm 25 \%$; $n=5$ bzw. Radiatum: $88 \pm 5 \%$; $n=6$; $p>0.05$).

Hier konnte gezeigt werden, dass ZD 7288 einen Einfluss auf die PopSpike Amplitude in CA1 hat und somit bei der Reizweiterleitung eine Rolle spielt.

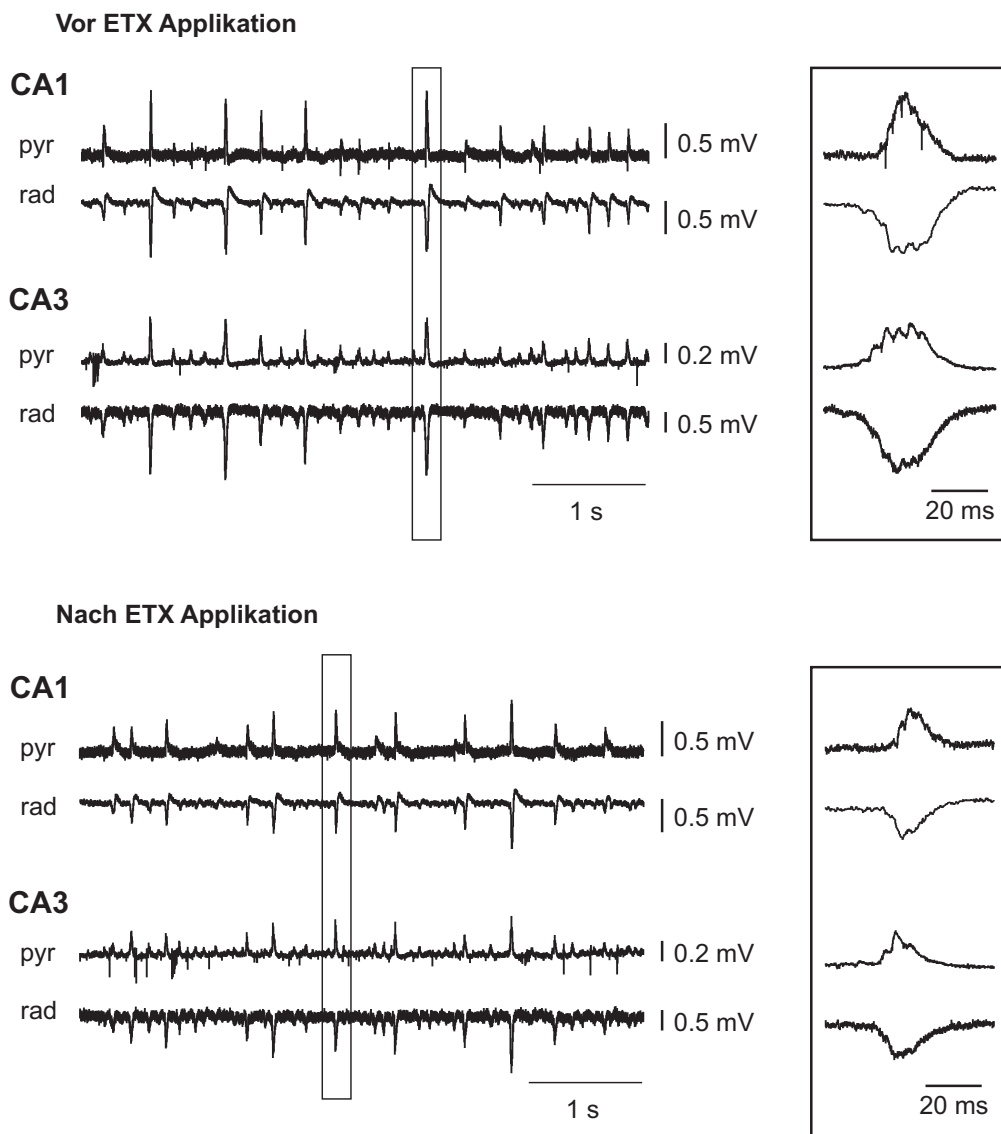


Abbildung 3.14: Beispiel einer Rohdatenspur vor und nach Applikation von Ethosuximid (ETX). (Oben) Spontan auftretende *sharp wave-ripple* Komplexe (SPW-Rs) in den verschiedenen Strata (von oben nach unten: CA1 Stratum pyramidale, CA1 Stratum radiatum, CA3 Stratum pyramidale und CA3 Stratum radiatum). Die umrandeten SPW-Rs sind rechts im Detail dargestellt. (Unten) Spontan auftretende SPW-Rs nach ETX 7288 Applikation mit derselben Skalierung. Die umrandeten SPW-Rs sind rechts im Detail dargestellt.

3.5.2 Blockade der transient aktivierbaren Calcium Kanäle erhöht die SPW-R Frequenz in CA1 Stratum pyramidale, reduziert die Amplituden der SPW-R und mindert die Amplitude der evozierten Feldpotentiale in CA1 Pyramidale und CA3 Radiatum

Obwohl ZD 7288 als spezifischer HCN-Kanalblocker bekannt ist, wiesen einige Arbeitsgruppen auf mögliche Nebeneffekte hin. Sanchez-Alonso und Kollegen (Sánchez-Alonso et al., 2010) zeigten an Pyramidenzellen der Ratte, dass extrazellulär appliziertes ZD 7288 neben HCN Kanälen auch noch transient aktivierbare Calcium (T-Typ) Kanäle blockiert. Um herauszufinden welchen Anteil die T-Typ Calciumkanäle bei den gezeigten Effekten haben, wurde Ethosuximid eingesetzt (Abbildung 3.14). Ethosuximid (ETX) ist ein Blocker der transienten Calciumströme, der auch zur Behandlung generalisierter Absenceepilepsien eingesetzt wird. ETX (0.75 mM) hatte keine signifikante Auswirkung auf die Frequenz der SPWs in CA1 und CA3. Ein Trend zu höheren Frequenzen ließ sich in CA1 Stratum pyramidale dennoch feststellen; von 2.54 ± 0.33 Hz stieg die Frequenz auf 3.32 ± 0.67 Hz ($n=6$; $p>0.05$) an (Abbildung 3.15).

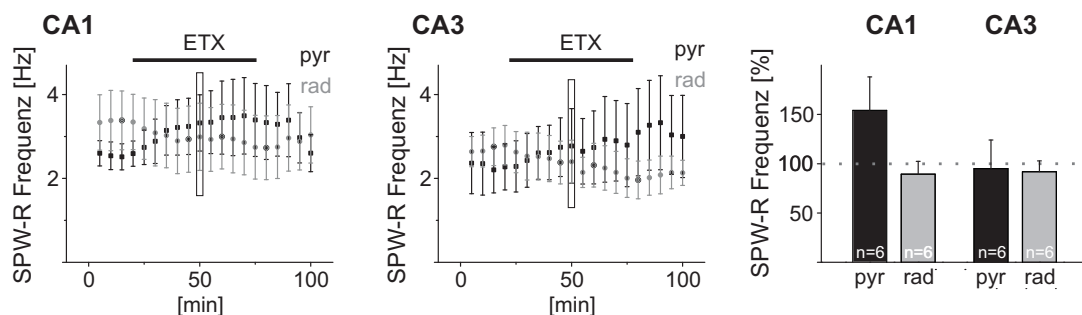


Abbildung 3.15: Wirkung von Ethosuximid (ETX) auf die SPW-R Frequenz. Applikation von 0.75 mM ETX hatte keine signifikante Auswirkung auf die Frequenz der SPW-Rs in CA1 und CA3. Ein Trend zu höheren Frequenzen ließ sich in CA1 Stratum pyramidale dennoch feststellen. Die umrahmten Werte sind im Balkendiagramm (**rechts**) dargestellt und entsprechen den normalisierten Werten nach 40 minütiger ETX Applikation. (n = Anzahl der Experimente)

Die SPW Amplituden wurden durch ETX tendenziell verringert. In der Pyramidenzellschicht der CA1 Region nahm die mittlere SPW Amplitude von 0.26 ± 0.06 mV auf 0.21 ± 0.05 mV ($n=6$; $p>0.05$) ab, in der CA3 Region von 0.14 ± 0.01 mV auf 0.11 ± 0.01 mV ($n=6$; $p>0.05$). Folglich ist es möglich, dass die stetige Abnahme der Amplituden unter ZD 7288 Einwirkung teilweise auch durch die Blockade transienter Calciumströme zu erklären ist (Abbildung 3.16). ETX verringerte tendenziell die Amplitude der SPW-Rs (nicht signifikant), hatte aber keinen Effekt auf die Frequenz.

Die Untersuchung der evozierten Potentiale zeigte, dass nach dem Einwaschen von 0.75 mM ETX die Amplituden der PopSpikes in CA1 auf 46 ± 15 % ($n=6$; $p>0.05$) des

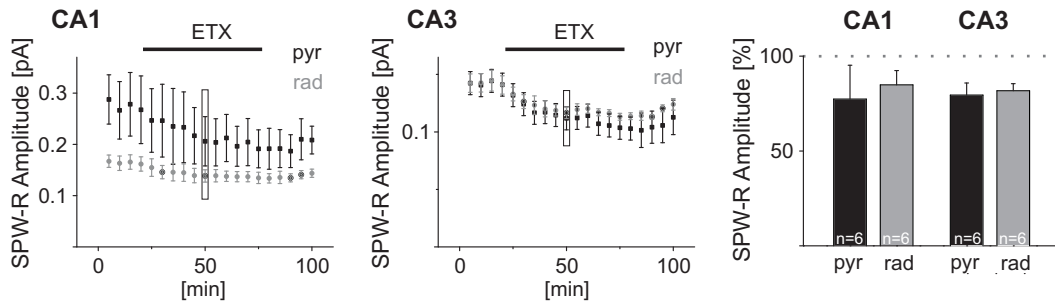


Abbildung 3.16: ETX Applikation reduzierte die SPW-R Amplitude. Nach Applikation von 0.75 mM ETX nahm die gemittelte SPW-R Amplitude im Stratum pyramidale und Stratum radiatum der CA1 und der CA3 Region ab (nicht signifikant). Die umrahmten Werte sind im Balkendiagramm (**rechts**) dargestellt und entsprechen den normalisierten Werten nach 40 minütiger ETX Einwirkung. (n = Anzahl der Experimente)

Ausgangswertes zurück gingen. Weniger deutlich war dieser Effekt in der CA3 Region ausgeprägt ($68 \pm 30\%$; $n=6$; $p>0.05$). Die Steigung der evozierten Potentiale im Stratum radiatum blieb in der CA1 Region unverändert ($97 \pm 13\%$; $n=6$; $p>0.05$), in CA3 hingegen zeichnete sich eine Tendenz zu weniger schnell ansteigenden Potentialen ab ($76 \pm 16\%$; $n=5$; Abbildung 3.17).

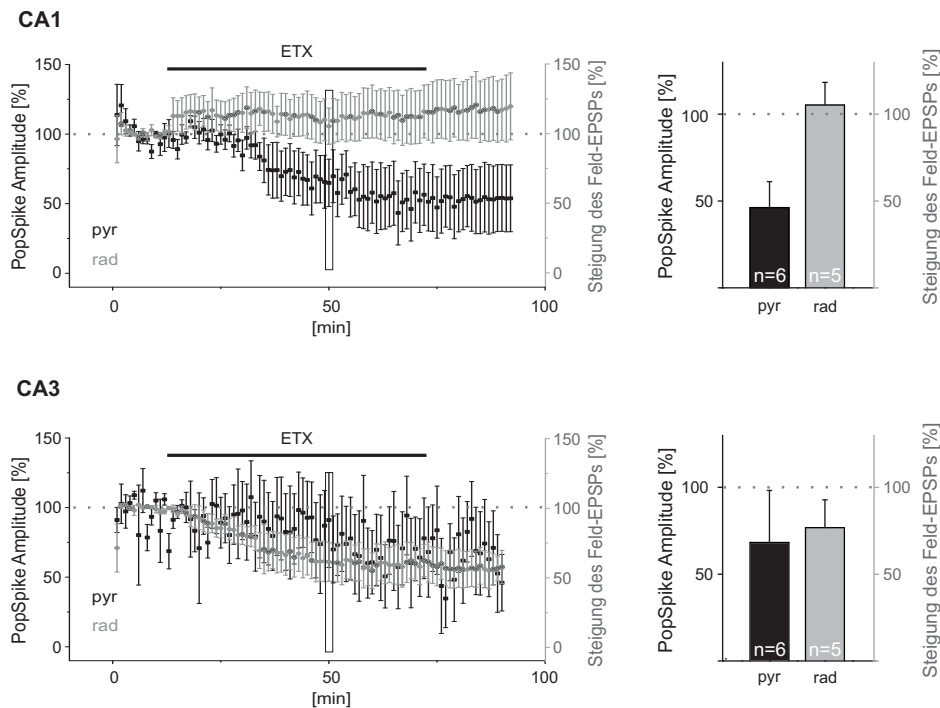


Abbildung 3.17: ETX reduzierte evozierte Potentiale in CA1 Stratum pyramidale. Applikation von 0.75 mM ETX reduzierte die gemittelte PopSpike Amplitude in CA1 Stratum pyramidale (**links**, schwarze Quadrate) sowie Steigung der Feld-EPSPs in CA3 Stratum radiatum (**Mitte**, graue Kreise). Die umrahmten Werte sind im Balkendiagramm (**rechts**) dargestellt und entsprechen den normalisierten Werten nach 40 minütiger ZD 7288 Einwirkung. (n = Anzahl der Experimente)

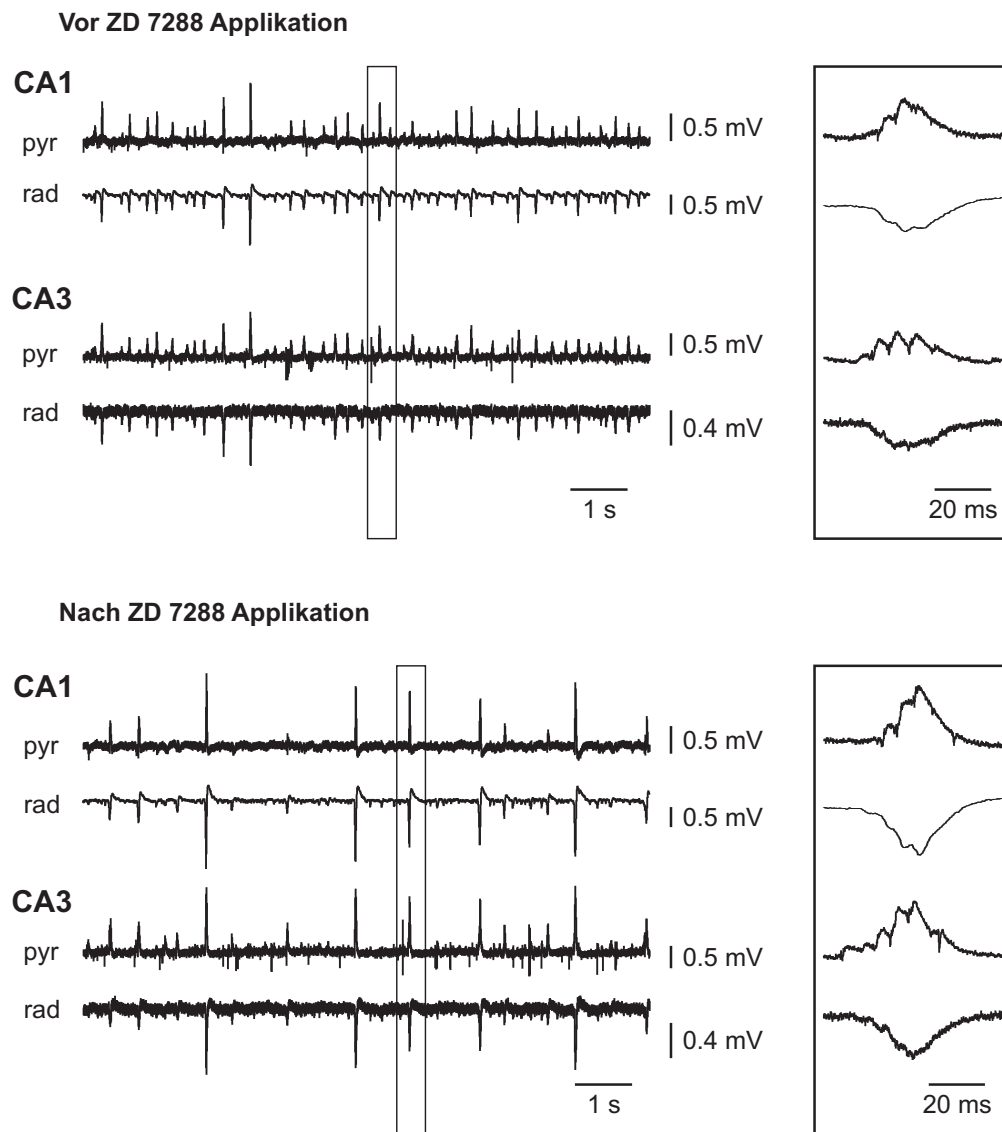


Abbildung 3.18: Beispiel einer Rohdatenspur vor und nach 15 minütiger Applikation von ZD 7288. (Oben) Spontan auftretende *sharp wave-ripple* Komplexe (SPW-Rs) in der verschiedenen Strata (von oben nach unten: CA1 Stratum pyramidale, CA1 Stratum radiatum, CA3 Stratum pyramidale und CA3 Stratum radiatum). Die umrandeten SPW-Rs sind rechts im Detail dargestellt. (Unten) Nach Applikation von $10 \mu\text{M}$ ZD 7288 nahm die Frequenz der spontan auftretende SPW-Rs ab. Die Amplituden hingegen stiegen an. Die umrandeten SPW-Rs sind rechts im Detail dargestellt. (Zur Veranschaulichung ist die Skalierung zu beiden Zeitpunkten gleich.)

3.5.3 Kurzzeitige Applikation des I_h Blockers mindert die SPW-R Frequenz, erhöht die SPW-R Amplitude und verringert die Amplitude der evozierten Feldpotentiale

Um mögliche Nebeneffekte des I_h -Blockers zu minimieren, wurde der Blocker für ein kürzeres Zeitintervall (15 min) eingewaschen (Abbildung 3.18). Die Frequenz der SPWs in der CA1 Pyramidenzellschicht verringert sich nach dem Einwaschen der Substanz ZD 7288 von 1.80 ± 0.33 Hz auf 1.07 ± 0.11 Hz ($n=6$; $p<0.05$). Im Stratum radiatum ging die Frequenz von 2.88 ± 0.63 Hz auf 1.84 ± 0.31 Hz zurück ($n=8$; $p<0.05$). Die 15 minütige ZD 7288 Applikation hatte keinen signifikanten Effekt auf SPW-R Frequenz in CA3 pyramidale (von 1.03 ± 0.27 Hz auf 1.03 ± 0.21 Hz; $n=7$; $p>0.05$). Im Radium kam es zu einer Frequenzminderung, von 1.96 ± 0.47 Hz auf 1.84 ± 0.31 ($n=9$; $p<0.05$; Abbildung 3.19).

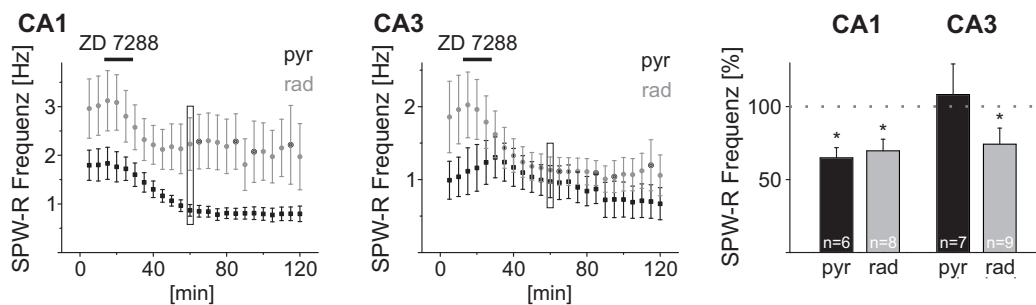


Abbildung 3.19: SPW-R Frequenzminderung nach 15 minütiger ZD 7288 Applikation. Applikation (15 min) von $10 \mu\text{M}$ ZD 7288 reduzierte die gemittelte SPW-R Frequenz in CA1 Stratum pyramidale und Stratum radiatum (**links**) sowie in CA3 und Stratum radiatum (**Mitte**, graue Kreise) signifikant. In CA3 Stratum pyramidale blieb dieser Effekt aus (**Mitte**, schwarze Quadrate). Die umrahmten Werte sind im Balkendiagramm (**rechts**) dargestellt und entsprechen den normalisierten Werten nach 40 minütiger ZD 7288 Einwirkung. Signifikante Änderungen ($p<0.05$) sind mit Sternchen versehen. (n = Anzahl der Experimente)

Die 15 minütige ZD 7288 Applikation bewirkte sowohl in CA1 als auch in CA3 einen signifikanten Amplitudenanstieg (Abbildung 3.20). Im Pyramidalband der CA1 Region stiegen die Amplituden signifikant von 0.25 ± 0.04 mV auf 0.48 ± 0.08 mV ($n=7$; $p<0.01$), im Radium von 0.20 ± 0.02 mV auf $0.26 \pm 0.26 \pm 0.05$ ($n=9$; $p>0.05$). In der CA3 Region erhöhte sich die Amplitude der SPW-R im Stratum pyramidale von 0.31 ± 0.04 mV auf 0.41 mV ($n=7$; $p<0.01$). Im Stratum radiatum erhöhte sich die Amplitude signifikant von 0.16 ± 0.02 mV auf 0.26 ± 0.05 mV ($n=9$; $p<0.01$).

Die PopSpikes wurden nach ZD 7288 Applikation in CA1 auf 20 ± 7 % ($n=8$; $p<0.5$) signifikant reduziert (Abbildung 3.21). In der CA3 Region war dieser Effekt kaum ausgeprägt, hier ging die Amplitude auf 85 ± 14 % ($n=7$; $p>0.5$) zurück. Die Steigung

der evozierten Potentiale aus dem Stratum pyramidale nahm ebenfalls ab, in CA1 auf $74 \pm 11\%$ ($n=7$; $p>0.05$) und in CA3 auf $75 \pm 15\%$ ($n=7$; $p>0.05$).

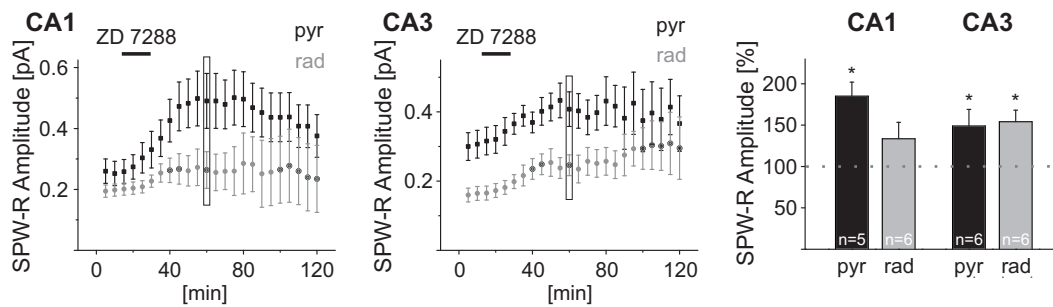


Abbildung 3.20: 15 minütige ZD 7288 Applikation erhöhte die SPW-R Amplitude. Nach 15 minütiger Applikation von $10 \mu\text{M}$ ZD 7288 stieg die gemittelte SPW-R Amplitude im Stratum pyramidale und Stratum radiatum der CA1 und CA3 Region an. Die umrahmten Werte sind im Balkendiagramm (**rechts**) dargestellt und entsprechen den normalisierten Werten nach 40 minütiger ZD 7288 Einwirkung. Signifikante Änderungen ($p<0.05$) sind mit Sternchen versehen. (n = Anzahl der Experimente)

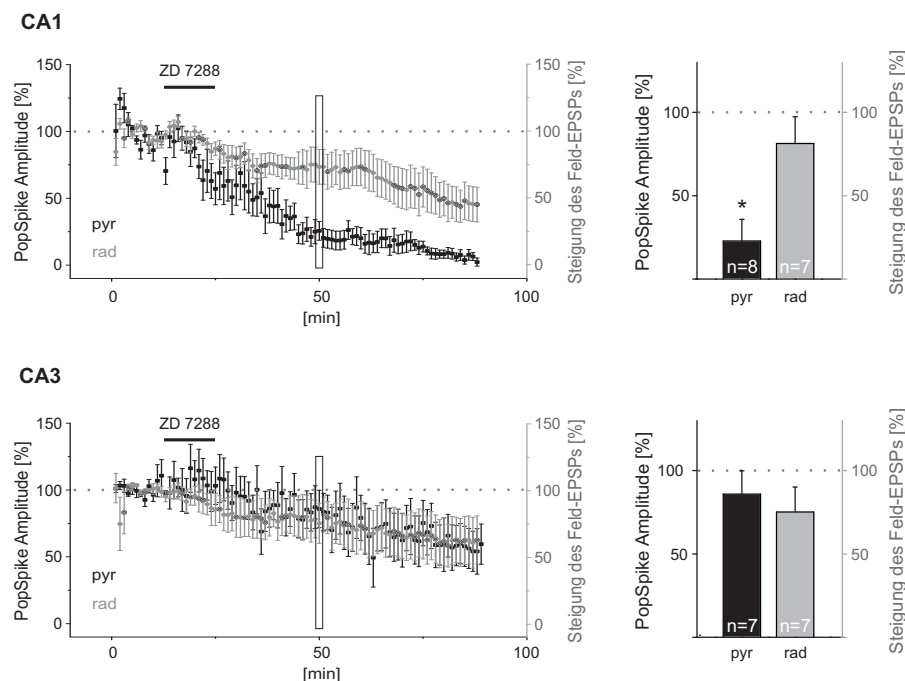


Abbildung 3.21: Reduktion der PopSpike Amplitude in CA1 nach 15 minütiger ZD 7288 Applikation. Nach 15 minütiger Applikation von $10 \mu\text{M}$ ZD 7288 verringerte sich die gemittelte PopSpike Amplitude in CA1 Stratum pyramidale signifikant (links, schwarze Quadrate). Die Steigung der Feld-EPEPs im Stratum radiatum blieb in CA1 und CA3 nahezu unverändert. Die umrahmten Werte sind im Balkendiagramm (**rechts**) dargestellt und entsprechen den normalisierten Werten nach 40 minütiger ZD 7288 Einwirkung. Signifikante Änderungen ($p<0.05$) sind mit Sternchen versehen. (n = Anzahl der Experimente)

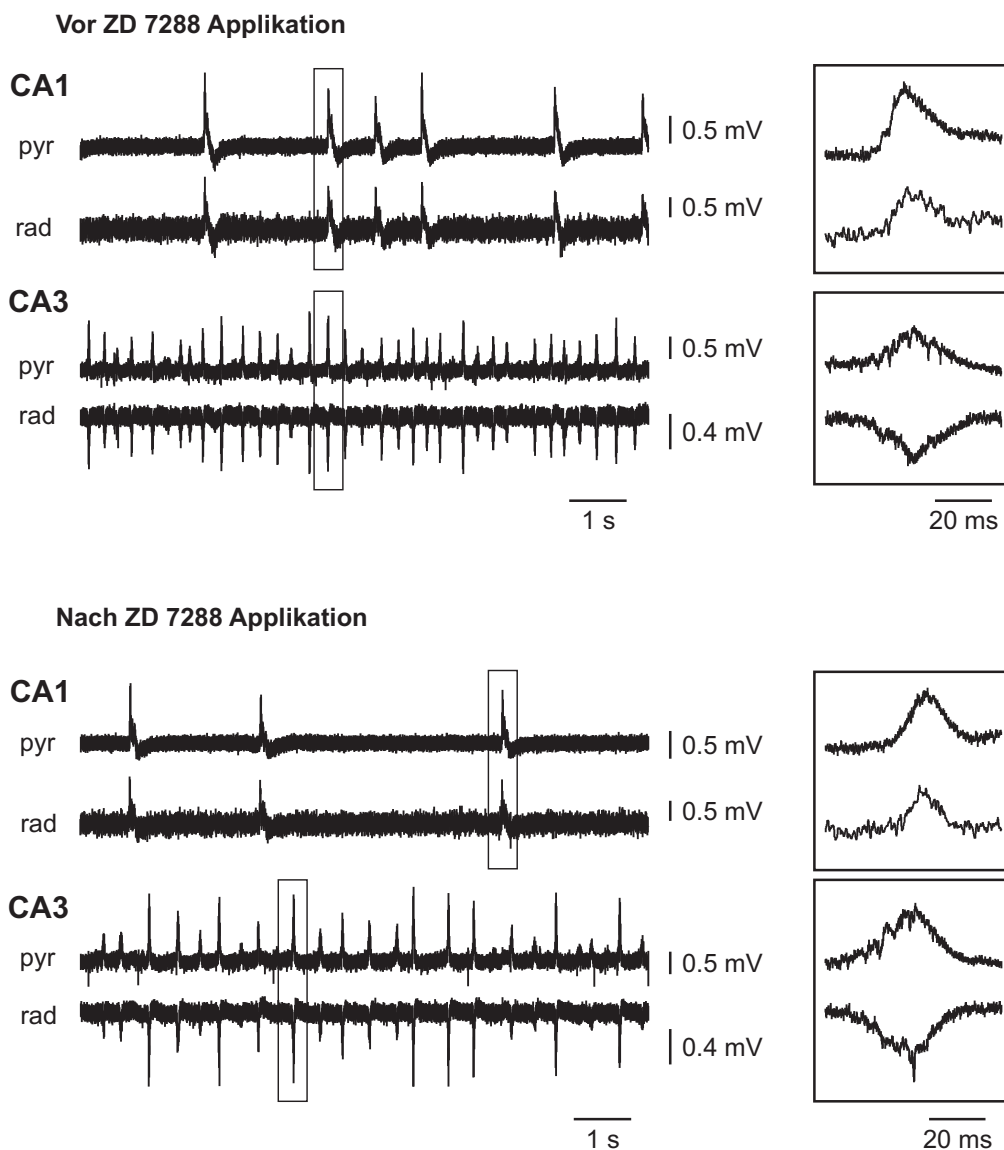


Abbildung 3.22: Beispiel einer Rohdatenspur eines Schnittes, bei dem die Schaffer Kollateralen durchtrennt wurden. (Oben) Spontan auftretende *sharp wave-ripple* Komplexe (SPW-Rs) in den verschiedenen Strata (von oben nach unten: CA1 Stratum pyramidale, CA1 Stratum radiatum, CA3 Stratum pyramidale und CA3 Stratum radiatum). Die umrandeten SPW-Rs sind rechts im Detail dargestellt. **(Unten)** Nach Applikation von $10 \mu\text{M}$ ZD 7288 nahm die Frequenz der spontan auftretende SPW-Rs ab. Die Amplituden hingegen stiegen an. Die umrandeten SPW-Rs sind rechts im Detail dargestellt. (Zur Veranschaulichung ist die Skalierung zu beiden Zeitpunkten gleich.)

3.5.4 Nach Durchtrennung der Schaffer Kollateralen verringert die Blockade des I_h ebenfalls die SPW-R Amplitude

In einer weiteren Serie von Experimenten wurde die Verbindung zwischen CA1 und CA3 durchtrennt (Abbildung 3.22). Unter basalen Bedingungen konnten sowohl in CA3 als auch in CA1 spontane Netzwerkereignisse detektiert werden. Die Frequenz der in CA3 aufgenommenen SPW-Rs entsprach der eines intakten Schnittes. Die 15 minütige Applikation von 10 μ M ZD 7288 ließ die Frequenz von 2.09 ± 0.34 Hz auf 1.51 ± 0.19 Hz (n=5) zurückgehen. In der CA1 Region traten ebenfalls spontane Netzwerkereignisse auf. Ohne den Beitrag der CA3 Region traten diese Ereignisse seltener auf. Die gemittelte Frequenz betrug nun 0.57 ± 0.11 Hz (n=5), im Vergleich zu 2.39 ± 0.29 Hz (n=6) aus Kontrollmessungen. Nach Applikation von ZD 7288 verringerte sich die Frequenz auf 0.21 ± 0.06 , bis sie schließlich gänzlich zum Erliegen kam (Abbildung 3.23).

Die in CA1 und CA3 gemessenen spontanen Netzwerkereignisse hatten vergleichbare Amplituden wie Schnittpräparationen ohne durchtrennte Schaffer Kollateralen (Abbildung 3.22). Im Gegensatz zu den vorherigen Beobachtungen bewirkte die ZD 7288 Applikation tendentiell einen Rückgang der Amplituden im Stratum pyramidale der CA1 Region, von 0.32 ± 0.05 mV auf 0.26 ± 0.06 mV (n=6; $p > 0.05$). Die Mittlere SPW-R Amplitude blieb in CA3 konstant (0.20 ± 0.03 mV zu 0.22 ± 0.03 mV; n=6; $p > 0.05$; Abbildung 3.24).

Die PopSpikes wurden nach ZD 7288 Applikation in CA1 auf 38 ± 14 % (n=3) reduziert (Abbildung 3.25). Im Stratum radiatum war der Effekt ähnlich ausgeprägt, hier ging die Steigung der evozierten Potentiale auf 42 ± 12 % (n=3) zurück.

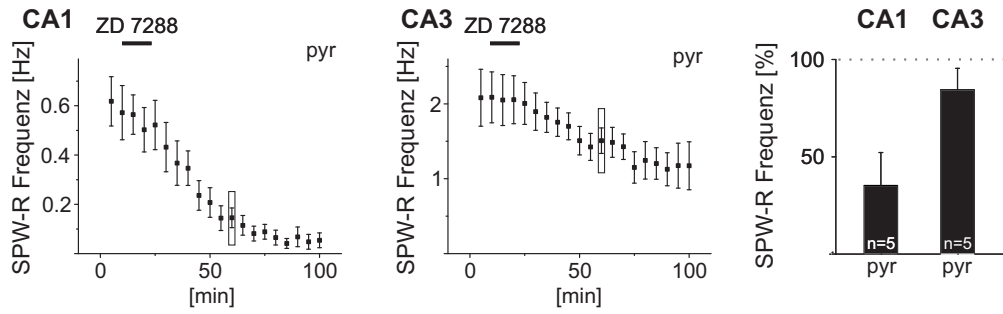


Abbildung 3.23: SPW-R Frequenzminderung nach 15 minütiger ZD 7288 Applikation. Nach Durchtrennung der Schaffer Kollateralen reduzierte die 15 minütige Applikation von $10 \mu\text{M}$ ZD 7288 die SPW-R Frequenz in CA1 und CA3 Stratum pyramidale (links, Mitte). Die umrahmten Werte sind im Balkendiagramm (rechts) dargestellt und entsprechen den normalisierten Werten nach 40 minütiger ZD 7288 Einwirkung. (n = Anzahl der Experimente)

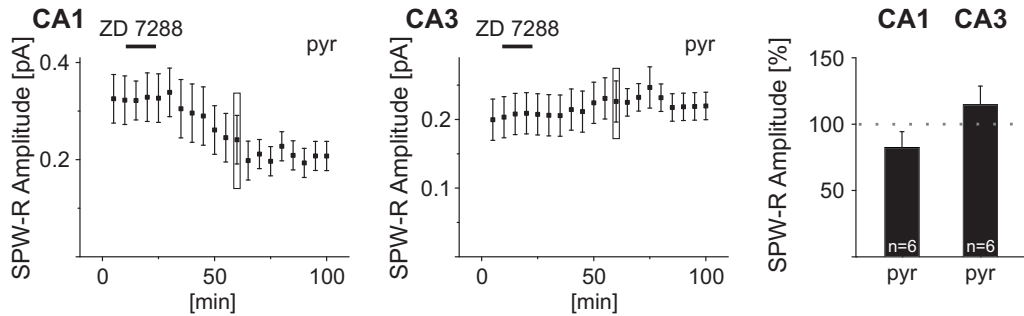


Abbildung 3.24: Effekt der konstanten ZD 7288 Applikation auf die SPW-R Amplitude. Die 15 minütige Applikation von $10 \mu\text{M}$ ZD 7288 zeigte keine signifikante Änderung der gemittelte SPW-R Amplitude in Schnitten mit durchtrennten Schaffer Kollateralen im Stratum pyramidale der CA1 sowie der CA3 Region. Die umrahmten Werte sind im Balkendiagramm (rechts) dargestellt und entsprechen den normalisierten Werten nach 40 minütiger ZD 7288 Einwirkung. (n = Anzahl der Experimente)

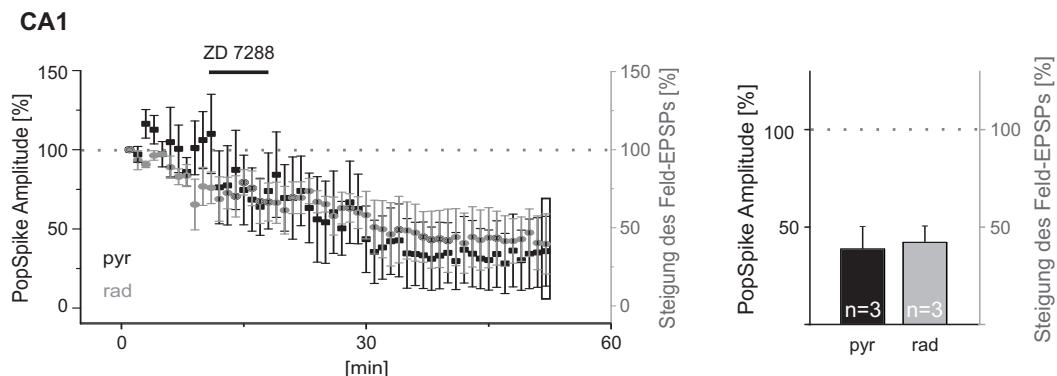


Abbildung 3.25: Effekt der konstanten ZD 7288 Applikation auf evozierte Potentiale. Nach 15 minütiger Applikation von $10 \mu\text{M}$ ZD 7288 verringerte sich die gemittelte PopSpike Amplitude in Schnitten mit durchtrennten Schaffer Kollateralen in CA1 Stratum pyramidale (links, schwarze Quadrate). Auch die Steigung des Feld-EPSP nahm ab (graue Kreise). (n = Anzahl der Experimente)

3.5.5 In Kontrolleexperimenten blieben die untersuchten Parameter über die Zeit konstant

Aufgrund der langen Messzeit wurden Kontrollmessungen ohne Applikation von ZD 7288 oder ETX durchgeführt. Dies war notwendig, da sich die Parameter im Präparat unter den verschiedensten Umständen verändern können. Zu diesen Umständen gehören unter anderem das Sterben des Schnittes, das Herausrutschen der Elektrode sowie eine Veränderung der Temperatur. Diese Kontrollmessungen wurden unter den gleichen Bedingungen wie die ZD 7288 und ETX Experimente durchgeführt. Die folgenden Abbildungen sind ähnlich aufgebaut wie die Abbildungen zuvor, das heißt die entsprechenden Zeitpunkte wurden dargestellt. Da sich die untersuchten Parameter in den Kontrollmessungen nicht veränderten werden nur die jeweiligen Abbildungen gezeigt.

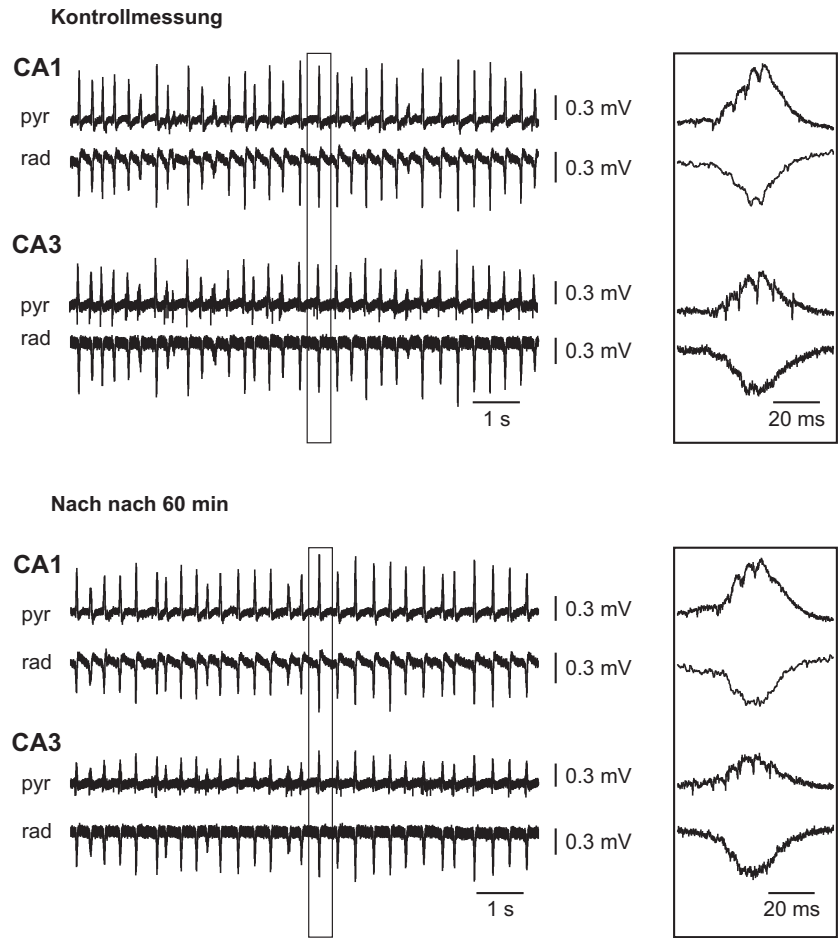


Abbildung 3.26: Beispiel einer Rohdatenspur aus Kontrolleexperimenten. Spontan auftretende *sharp wave-ripple* Komplexe bleiben über die Zeit stabil. (**Oben**) Spontan auftretende *sharp wave-ripple* Komplexe (SPW-Rs) in den verschiedenen Strata (von oben nach unten: CA1 Stratum pyramidale, CA1 Stratum radiatum, CA3 Stratum pyramidale und CA3 Stratum radiatum). Die umrandeten SPW-Rs sind rechts im Detail dargestellt. (**Unten**) Spontan auftretende SPW-Rs nach 60 min. Die umrandeten SPW-Rs sind rechts im Detail dargestellt. (Zur Veranschaulichung ist die Skalierung zu beiden Zeitpunkten gleich.)

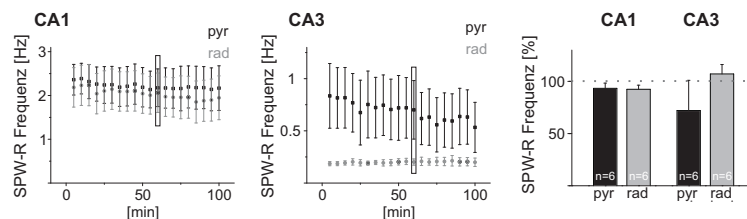


Abbildung 3.27: In Kontrolleexperimenten blieb die SPW-R Frequenz konstant. Ohne Applikation eines Pharmakons blieb die gemittelte SPW-R Frequenz in CA1 (**links**) sowie in CA3 (**Mitte**) konstant. Die umrahmten Werte sind im Balkendiagramm (**rechts**) dargestellt und entsprechen den normalisierten Werten. (n = Anzahl der Experimente)

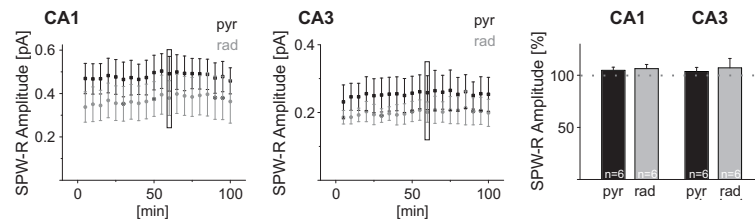


Abbildung 3.28: In Kontrollexperimenten blieb die SPW-R Amplitude konstant. Ohne Applikation eines Pharmakons blieb die gemittelte SPW-R Amplitude in CA1 (**links**) sowie in CA3 (**Mitte**) konstant. Die umrahmten Werte sind im Balkendiagramm (**rechts**) dargestellt und entsprechen den normalisierten Werten. (n = Anzahl der Experimente)

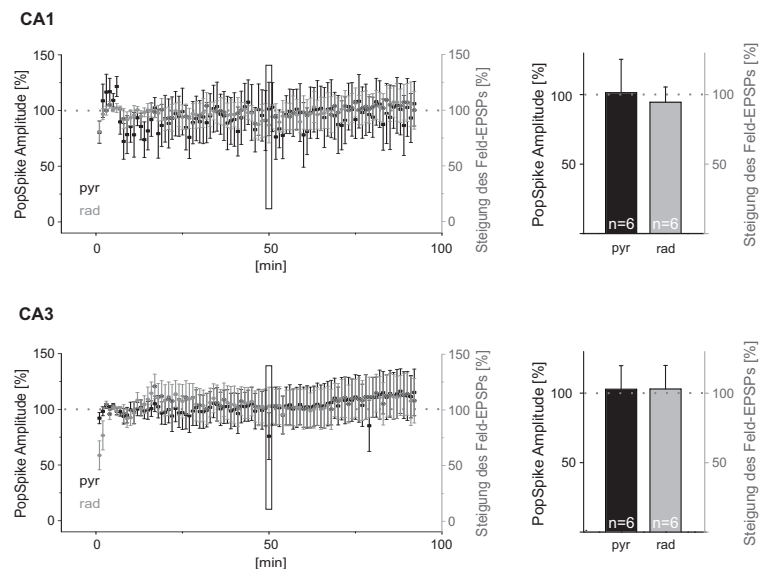


Abbildung 3.29: In Kontrollexperimenten blieb die Amplitude bzw. Steigung der evozierten Potentiale konstant. Ohne Applikation eines Pharmakons blieb die gemittelte SPW-R Frequenz in CA1 (**links**) sowie in CA3 (**Mitte**) konstant. Die umrahmten Werte sind im Balkendiagramm (**rechts**) dargestellt und entsprechen den normalisierten Werten. (n = Anzahl der Experimente)

4 Diskussion

Die kardiale Schrittmacheraktivität wird in Säugetieren durch spezialisierte Sinusknotenzellen reguliert. Diese Zellen exprimieren den Hyperpolarisations-aktivierten und durch zyklische Nukleotide modulierten Kanal HCN4. Im Einklang damit führen Mutationen im humanen HCN4 Gen zu erblichen Sinusbradykardien (Schulze-Bahr et al., 2003, Ueda et al., 2004, Milanesi et al., 2006, Nof et al., 2007). Eine Studie berichtete über einen Patienten, der Träger einer cAMP insensitiven HCN4 Untereinheit ist. Hier konnte gezeigt werden, dass I_f essentiell für die chronotrope Regulation der Herzfrequenz ist (BoSmith et al., 1993, Schulze-Bahr et al., 2003). Ein komplexes Modell für die spontane Erregung und Modulation der Herzfrequenz, welches die Interaktion von Transportern und intrazellulärer Calciumausschüttung berücksichtigt, stellt die klassische Schlüsselrolle des I_f bei der Generierung, Erhaltung und Regulation des Herzrhythmus in Frage (Lakatta et al., 2010). Die in dieser Arbeit vorgestellten mutierten Kanäle sollen weiteren Aufschluss darüber geben, welches der beiden vorgeschlagenen Modelle valider ist.

Vorgeschlagener Mechanismus, der in HCN4-695X Trägern zur Sinusbradykardie führt

Der homomere HCN4-695X Kanal spricht nicht auf cAMP an. Dieser Defekt war auch in der heteromeren Konformation, welche am ehesten der heterozygoten Ausprägung der von der Mutation betroffenen Patienten entspricht, zugegen. Dies spricht für eine dominant-negative Suppression ausgehend von der mutierten Untereinheit. In Abwesenheit von cAMP zeigte der heteromere Kanal Aktivierungskurven, die denen des Wildtyps entsprachen. Dies entspricht allerdings einem unphysiologischen Zustand. DiFrancesco und Mangoni (DiFrancesco und Mangoni, 1994) berichteten von einer basalen cytoplasmatischen cAMP Konzentration von $\sim 0.2 \mu\text{M}$ in unstimulierten Sinusknotenzellen. Also sind *in vivo* unter basalen Bedingungen die Aktivierungskurven des I_f um 7 - 8 mV ins Positive verschoben. Unter saturiertem cAMP Spiegel ($100 \mu\text{M}$) betrug diese Verschiebung 14.6 mV. Ähnliches zeigten auch die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente, $10 \mu\text{M}$ cAMP verursachte eine Verschiebung um 14.3 mV in Wildtypkanälen. Diese Beobachtung impliziert, dass die stimulierende Wirkung der basalen cAMP Konzentration die negative Verschiebung der Aktivierungskurven *in vivo* aufgrund des dominant-negativen Effekts der HCN4-695X nicht kompensiert werden kann. Dies reduziert den Beitrag des I_f zur Depolarisation und könnte zu einer gerin-

geren basalen Herzfrequenz führen. Auch die Deaktivierung ist bei dem heteromeren Kanal unter cAMP-Einfluss weniger effektiv. Verbleiben HCN4 Kanäle länger in der geöffneten Konformation, könnte dies eine schnellere Re-Depolarisationen und somit eine gesteigerte Herzfrequenz begünstigen. Die Deaktivierung des heteromeren Kanals ist durch cAMP unbeeinflusst. Die daher rührende schnellere Deaktivierung des mutierten HCN4-695X Kanals (unter cAMP) könnte eine Bradykardie begünstigen. Eine Kombination aus beidem, verminderte Aktivierung und schnellere Deaktivierung in Gegenwart von cAMP, könnte für die um 30 % reduzierte Herzfrequenz der Mutationsträger verantwortlich sein (Schweizer et al., 2010). Interessanterweise ist die Aktivierungskurve des homomeren HCN4-695X Kanals im Vergleich zum homomeren Wildtyp zu positiveren Potentialen verschoben. Diese Verschiebung ist möglicherweise wie folgt zu erklären. Die unbesetzte cAMP Bindedomäne im Wildtyp-Kanal ist autoinhibierend (Wainger et al., 2001). Bindet cAMP, erfährt die CNBD eine Konformationsänderung, die die inhibierende Wirkung aufhebt. Beim homomeren HCN4-695X fehlt die CNBD nicht gänzlich. Ein Rest der trunkeierten CNBG könnte immernoch inhibierend wirken.

Verlust der HCN4 Aktivität wird weniger von anderen HCN Isoformen, als vom „voltage/calcium-clock“ System kompensiert

Da das herzfrequenzerniedrigende Agens Ivabradin in HCN4-573X Mäusen keinen Effekt zeigte, ist anzunehmen, dass andere HCN Isoformen die HCN4 Aktivität nicht kompensieren (Schulze-Bahr et al., 2003). In einer weiteren Studie konnte in erwachsenen Mäusen gezeigt werden, dass die Cre-vermittelte Ablation von HCN4 keine Beeinträchtigung auf die beta-adrenerge Frequenzbeschleunigung hatte, auch nicht in Anwesenheit von I_f Blockern. Dies zeigt, dass weder HCN1 noch HCN2 den HCN4 ersetzen. Auch HCN2 knockout Mäuse zeigten weder in Ruhe noch unter beta-adrenerger Stimulation eine signifikante Änderung der Herzfrequenz (Ludwig et al., 2003). Daher ist es unwahrscheinlich, dass andere HCN Isoformen in Patienten, die die HCN4-695X Mutation tragen, für eine Frequenzmodulation verantwortlich sind. Dies deutet darauf hin, dass der kardiale I_f im Menschen nicht notwendig für die autonome Regulation der Herzfrequenz ist. Diese These wird dadurch unterstützt, dass andere Ströme eine sog. „voltage-clock“ bilden, welche mit den rhythmischen, Ryanodinrezeptor-vermittelten intrazellulären Calcium Freisetzungen interagieren („calcium-clock“). Die Ströme werden von L- und T-Typ Ca^{2+} Kanälen (I_{CaL} , I_{CaT}), dem „delayed rectifier“ (I_K) und dem Na^+/Ca^{2+} Austauscher (I_{NCX}) generiert. Diese Proteine werden von der Proteinkinase A oder von der Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMK II) phosphoryliert, sie werden also in Abhängigkeit von cAMP und Ca^{2+} moduliert. Daher wurde postuliert, dass beide „clocks“ konzertiert den größten Teil der autonomen Frequenzregulation ausmachen.

Vorgeschlagener Mechanismus, der in HCN4 K530N Trägern zu einer leichten Sinusbradykardie, sowie zu Vorhofflimmern und Tachykardie-Bradykardie Syndrom führt

Die biophysikalischen Eigenschaften des homomeren HCN4 K530N Kanals gleichen dem des Wildtyps in den Aktivierungs- und Deaktivierungseigenschaften. Erst im heteromeren Zustand werden gravierende Unterschiede zum Wildtyp-Kanal deutlich. Die Aktivierungskurve liegt ohne cAMP Modulation beim heteromeren Kanal bei deutlich negativeren Potentialen als beim Wildtyp ($\Delta V = 13.2$ mV). Folglich sind wesentlich höhere Potentiale notwendig um die Kanäle zu aktivieren. Wie oben beschrieben, ist in Sinusknotenzellen eine basale cAMP Konzentration vorhanden, die die Aktivierungskurve um ~ 7 mV zu positiveren Potentialen verschiebt. Aufgrund des großen Unterschieds zwischen heteromeren und Wildtyp-Kanal könnte die Aktivierung unter basalen Bedingungen dennoch beeinträchtigt sein und somit zur leicht bradykarden Herzfrequenz der Patienten beitragen. In einer aktuellen Studie (Herrmann et al., 2007) wurde von transgenen adulten Mäusen berichtet denen das HCN4 Gen fehlt. Es konnte gezeigt werden, dass es beim Übergang zwischen beta-adrenerg stimuliertem und Ruhezustand immer wieder zu Pausen im Sinusrhythmus kam. Es wurde diskutiert, dass HCN4 eine Art Depolarisationsreserve darstellt, welche den Übergang zwischen stimuliertem und basalem Zustand stabilisiert. Bei Trägern der HCN4 K530N Mutation könnte dies sowohl die kreisende Erregung, wie es bei chronischem Vorhofflimmern der Fall ist, als auch die Tachykardie-Bradykardie Symptomatik begünstigen. Erstaunlicherweise verschob sich die Aktivierungskurve des heteromeren Kanals in Anwesenheit von cAMP stärker ($\Delta V = 17.4$ mV) als die des Wildtyps ($\Delta V = 14.3$ mV), sodass sich beide Kurven nicht mehr signifikant voneinander unterscheiden. Wie die Punktmutation im C-Linker zu einer Verschiebung der Aktivierungskurve führt ist damit unklar. Bei der HCN4 K530N Mutation wurde das positiv geladene Lysin durch das neutrale Asparagin ersetzt. Dies könnte zu einer Konformationsänderung im C-Linker führen. Im Homomer könnte sich dies als „stumme Konformationsänderung“ äußern. In der heteromeren Konformation dagegen könnten sich die unterschiedlichen Untereinheiten sterisch behindern. Erst durch Bindung von cAMP (Konformationsänderung) könnte sich die sterische Behinderung lösen.

I_h besitzt viele einzigartige, wenig intuitive Eigenschaften. Nahe des Ruhemembranpotentials sind I_h Kanäle teilweise geöffnet. Hyperpolarisation aktiviert I_h , während Depolarisation I_h deaktiviert. Als unspezifischer Kationenkanal liegt das Umkehrpotential bei etwa -30 bis -20 mV (Wollmuth und Hille, 1992, Biel et al., 2009), sodass der

durch Hyperpolarisation aktivierte Strom die Membran depolarisiert, während durch Depolarisation die Membran hyperpolarisiert wird (Schließen von HCN Kanälen). In CA1 Pyramidenneuronen nimmt die I_h Kanaldichte im Dendriten mit zunehmender Entfernung vom Soma zu (Lorincz et al., 2002, Magee, 1998). Interneurone, die perisomatisch auf Pyramidenneurone projizieren, exprimieren I_h Kanäle am Soma (Ellender et al., 2010).

Blockade der I_h Kanäle erhöht die SPW-R Amplitude

Die konstante Applikation des I_h Blockers ZD 7288 ließ die Amplitude der SPW-R initial ansteigen, bevor sie dann abnahm. Sánchez-Alonso berichtete (Sánchez-Alonso et al., 2010), dass ZD 7288 nach extrazellulärer Applikation neben I_h auch I_{CaT} in Rattenpyramidenzellen blockiert. Um herauszufinden ob der initiale Amplitudenanstieg oder der Abfall auf eine mögliche Blockade des I_{CaT} zurückzuführen ist, wurde in einem weiteren Experiment I_{CaT} durch Ethosuximid geblockt. Dies führte zu einer Amplitudenverminderung, dementsprechend könnte die unter konstanter ZD 7288 Applikation beobachtete Amplitudenverminderung ebenfalls auf eine Blockade von I_{CaT} zurückzuführen sein. Zur weiteren Überprüfung wurde ZD 7288 für nur 15 min eingewaschen um Nebeneffekte zu minimieren. Dies führte zu einem Amplitudenanstieg. Folglich wird die SPW-R Amplitude durch I_h Blockade erhöht. Nach Wu (Wu et al., 2006) trägt der synaptische Input von Interneuronen maßgeblich zur Amplitude der SPW-R bei. Bei Interneuronen sind I_h Kanäle somatisch exprimiert. Eine Blockade dieser machen Interneurone erregbarer, sodass diese ihre Aktivität erhöhen und einen größeren Beitrag zur Generierung der SPW-R Amplitude leisten können. Arbeiten anderer Gruppen zeigten, das I_h , der beim Ruhemembranpotential schon teilweise aktiv ist, den Eingangswiderstand, die Membranzeitkonstante sowie die zeitliche Integration herabsetzt was auch die Depolarisation während eines EPSPs mindert (Magee, 1998, Stuart und Spruston, 1998, Hausser et al., 2000, Poolos et al., 2002). Da das Umkehrpotential des I_h positiver ist als die Aktionspotentialschwelle (-50 bis -40 mV) generiert I_h bei unterschwelligen Potentialen einen exzitatorischen Strom. Demzufolge hyperpolarisiert die Blockade des I_h das Ruhemembranpotential um 5 bis 10 mV (Tsay et al., 2007), was unterschwelligen EPSPs entgegenwirkt. Demnach ist es möglich, dass im *in vitro* SPW-R Modell die Blockade des I_h das Ruhemembranpotential ins Negative verschiebt, eingehende EPSPs würden somit einen größeren Einstrom von Ionen bewirken und die Amplitude der SPW-R würde steigen. Die Blockade des dendritischen I_h -Stroms reduziert die Leckströme entlang des Dendriten, sodass entlang der somatodendritischen Achse der elektrische Dipol größer wird (siehe Abbildung 2.6). Entsprechend werden auch die Felder an den Polen stärker und die gemessenen Signale größer. Dies erklärt auch den stärkeren Amplitudenanstieg in CA1 Stratum pyramidale gegenüber dem im

Stratum radiatum. Der Pluspol des Dipols liegt im Stratum pyramidale während das andere Ende des Dipols nicht im Stratum radiatum sondern im Stratum lacunosum moleculare, das Signal ist somit im Stratum radiatum nicht maximal.

Blockade der I_h Kanäle reduziert die SPW-R Frequenz

Sowohl die konstante als auch die 15 minütige Applikation des Blockers ZD 7288 verringerte die Frequenz der auftretenden SPW-R. Die Blockade des I_{CaT} zeigte keine Frequenzreduktion der spontan auftretenden SPW-Rs. Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei der nach ZD 7288 Applikation beobachteten Frequenzreduktion um ein I_h -vermittelten Prozess handelt. Maccaferri und McBain (Maccaferri und McBain, 1996) beschrieben eine frequenzreduzierende Wirkung des ZD 7288 in hippocampalen Interneuronen. Genlain und Kollegen (Genlain et al., 2007) konnten in kultivierten Hippocampusneuronen zeigen, dass Forskolin und IBMX (Erhöhung des intrazellulären cAMP Spiegels) die Frequenz der spontanen mEPSPs (miniatur-exzitatorisches postsynaptisches Potential) erhöhten. Dieser Effekt konnte durch ZD 7288 blockiert werden. Die in dieser Arbeit gezeigte ZD-vermittelte SPW-R Frequenzreduktion unterstützt diesen Befund. Die SPW-R entstehen in der CA3 Region und propagieren über die Schaffer Kollateralen zur CA1 Region. CA3 ist somit die Schrittmacherregion für CA1. Die I_h Blockade könnte in den CA3 Pyramidenneuronen das Membranpotential innerhalb der Dendriten senken (Ausbleiben des depolarisierenden Kationeneinstroms). Folglich sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass die Zellen feuern, da nach EPSP Summation die Aktionspotentialschwelle seltener erreicht wird. Daher ist es möglich dass die I_h Blockade eine Frequenzreduktion nach sich zieht.

Blockade der I_h Kanäle reduziert die PopSpike Amplitude in CA1

In der CA1 Region hatte die I_h Blockade großen Einfluss auf die evozierten PopSpikes. Im Stratum pyramidale ging die PopSpike Amplitude auf etwa 30 % signifikant zurück. Demzufolge scheint der Output der Pyramidenneurone stärker von der I_h Blockade betroffen zu sein als der Input. Konstante Stimulation bei 60 % der Maximalamplitude der Schaffer Kollateralen löst im Stratum radiatum reliabel ePSPs aus. Geht man davon aus, dass die Blockade von I_h zu einem Absenken des Membranpotentials führt, so bleibt die Summation der eingehende EPSPs mit zunehmender I_h Blockade unterschwellig. Die Pyramidenneurone generieren weniger Aktionspotentiale und die PopSpike Amplituden nehmen ab.

I_h Kanäle werden stark in Dendriten von Pyramidenzelle sowie in präsynaptischen Endigungen exprimiert, sodass I_h präsynaptisch die Neurotransmitterausschüttung erleichtert und die synaptische Integration und Transmission reguliert (Magee, 1998, Beaumont

und Zucker, 2000, Lupica et al., 2001, Mellor et al., 2002). Mellor und Kollegen (Mellor et al., 2002) konnten in Hippocampuschnitten der Ratte in *whole-cell* Messungen von Körnerzellen zeigen, dass repetitive Stimulation eine Calcium- und I_h -abhängige langanhaltende Depolarisation verursacht, die die Transmitterausschüttung und Erregbarkeit in Körnerzellen erhöht. Zusätzlich konnte Lupica (Lupica et al., 2001) zeigen, dass I_h maßgeblich zu dem depolarisierten Membranpotential in GABAergen Interneuronen in CA1 beiträgt und somit die GABA Ausschüttung auf Pyramidenzellen begünstigt. Daher beruht die inhibierende Wirkung des I_h Blockers ZD 7288 auf die synaptische Übertragung in Schaffer Kollateralfasern sowohl auf präsynaptischen als auch auf postsynaptischen Mechanismen. Die I_h Blockade könnte die Erregbarkeit der CA3 zu CA1 Synapsen reduzieren, sodass sowohl inhibitorische als auch exzitatorischen postsynaptische Potentiale reduziert und letztlich die PopSpike Amplituden reduziert werden. I_h Kanäle sind für Natrium- und Kaliumionen permeabel. Yu (Yu et al., 2004) zeigte, dass I_h Kanäle auch eine Calciumleitfähigkeit besitzen und signifikant die cytosolische Calciumkonzentration in Dorsalwurzel-Ganglien erhöhen. Der I_h -vermittelte Calciumanstieg begünstigt die Vesikelausschüttung. Der Calciumeinstrom durch I_h Kanäle stellt einen I_h -vermittelten Mechanismus synaptischer Plastizität dar. Die Blockade der I_h Kanäle führt demnach zu einer geringeren Wahrscheinlichkeit der Vesikelausschüttung sowie zu weniger stark phosphorylierten und damit weniger aktiven Ionenkanälen. Diese verminderte Aktivität könnte die PopSpike Amplitude reduzieren.

Literaturverzeichnis

- [Noma und Irisawa, 1976] Noma, A. und Irisawa, H. (1976). A time- and voltage-dependent potassium current in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflugers Arch.*, 366(2-3):251–258.
- [Brown et al., 1979] Brown, H., Difrancesco, D.; und Noble, S. (1979). Cardiac pacemaker oscillation and its modulation by autonomic transmitters. *J.Exp.Biol.*, 81:175–204.
- [Andersen et al., 1979] Andersen, P., Bland, H., Myhrer, T.; und Schwartzkroin, P. (1979). Septo-hippocampal pathway necessary for dentate theta production. *Brain Res.*, 165(1):13–22.
- [Hamill et al., 1981] Hamill, O., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B.; und Sigworth, F. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.*, 391(2):85–100.
- [Doller und Weight, 1982] Doller, H. J. und Weight, F. F. (1982). Perforant pathway activation of hippocampal ca1 stratum pyramidale neurons: electrophysiological evidence for a direct pathway. *Brain Res.*, 237(1):1–13.
- [Buzsáki, 1986] Buzsáki, G. (1986). Hippocampal sharp waves: their origin and significance. *Brain Res.*, 398(2):242–252.
- [Difrancesco et al., 1986] Difrancesco, D., Ferroni, A., Mazzanti, M.; und Tromba, C. (1986). Properties of the hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J.Physiol.*, 377:61–88.
- [Chen und Okayama, 1987] Chen, C. und Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid dna. *Mol.Cell Biol.*, 7(8):2745–2752.
- [Difrancesco und Tromba, 1988] Difrancesco, D. und Tromba, C. (1988). Muscarinic control of the hyperpolarization-activated current (if) in rabbit sino-atrial node myocytes. *J.Physiol.*, 405:493–510.
- [Buzsaki, 1989] Buzsaki, G. (1989). Two-stage model of memory trace formation: a role for "noisy" brain states. *Neuroscience*, 31(3):551–570.
- [Yeckel und Berger, 1990] Yeckel, M. F. und Berger, T. W. (1990). Feedforward excitation of the hippocampus by afferents from the entorhinal cortex: redefinition of the role of the trisynaptic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(15):5832–5836.

- [Difrancesco und Tortora, 1991] Difrancesco, D. und Tortora, P. (1991). Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic amp. *Nature*, 351(6322):145–147.
- [Buzsáki et al., 1992] Buzsáki, G., Horváth, Z., Urioste, R., Hetke, J.; und Wise, K. (1992). High-frequency network oscillation in the hippocampus. *Science*, 256(5059):1025–1027.
- [Wollmuth und Hille, 1992] Wollmuth, L. und Hille, B. (1992). Ionic selectivity of ih channels of rod photoreceptors in tiger salamanders. *J.Gen.Physiol*, 100(5):749–765.
- [Amaral, 1993] Amaral, D. (1993). Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. *Curr.Opin.Neurobiol.*, 3(2):225–229.
- [BoSmith et al., 1993] BoSmith, R., Briggs, I.; und Sturgess, N. (1993). Inhibitory actions of zeneca zd7288 on whole-cell hyperpolarization activated inward current (if) in guinea-pig dissociated sinoatrial node cells. *Br.J.Pharmacol.*, 110(1):343–349.
- [Difrancesco, 1993] Difrancesco, D. (1993). Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu.Rev.Physiol*, 55:455–472.
- [Difrancesco und Mangoni, 1994] Difrancesco, D. und Mangoni, M. (1994). Modulation of single hyperpolarization-activated channels (i(f)) by camp in the rabbit sino-atrial node. *J.Physiol*, 474(3):473–482.
- [Wilson und McNaughton, 1994] Wilson, M. und McNaughton, B. (1994). Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science*, 265(5172):676–679.
- [Chrobak und Buzsaki, 1994] Chrobak, J. und Buzsaki, G. (1994). Selective activation of deep layer (v-vi) retrohippocampal cortical neurons during hippocampal sharp waves in the behaving rat. *J.Neurosci.*, 14(10):6160–6170.
- [Maccaferri und McBain, 1996] Maccaferri, G. und McBain, C. (1996). The hyperpolarization-activated current (ih) and its contribution to pacemaker activity in rat ca1 hippocampal stratum oriens-alveus interneurons. *J.Physiol*, 497 (Pt 1):119–130.
- [Numberger und Draguhn, 1996] Numberger, M. und Draguhn, A. (1996). *Patch-Clamp-Technik*. Spektrum Akademischer Verlag Gmbh, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- [Siapas und Wilson, 1998] Siapas, A. und Wilson, M. (1998). Coordinated interactions between hippocampal ripples and cortical spindles during slow-wave sleep. *Neuron*, 21(5):1123–1128.
- [Magee, 1998] Magee, J. (1998). Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal ca1 pyramidal neurons. *J.Neurosci.*, 18(19):7613–7624.

- [Stuart und Spruston, 1998] Stuart, G. und Spruston, N. (1998). Determinants of voltage attenuation in neocortical pyramidal neuron dendrites. *J.Neurosci.*, 18(10):3501–3510.
- [Ludwig et al., 1998] Ludwig, A., Zong, X., Jeglitsch, M., Hofmann, F.; und Biel, M. (1998). A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature*, 393(6685):587–591.
- [Santoro et al., 1998] Santoro, B., Liu, D., Yao, H., Bartsch, D., Kandel, E., Siegelbaum, S.; und Tibbs, G. (1998). Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell*, 93(5):717–729.
- [Gauss et al., 1998] Gauss, R., Seifert, R.; und Kaupp, U. (1998). Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature*, 393(6685):583–587.
- [Moosmang et al., 1999] Moosmang, S., Biel, M., Hofmann, F.; und Ludwig, A. (1999). Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol.Chem.*, 380(7-8):975–980.
- [Shi et al., 1999] Shi, W., Wymore, R., Yu, H., Wu, J., Wymore, R., Pan, Z., Robinson, R., Dixon, J., McKinnon, D.; und Cohen, I. (1999). Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (hcn) mrna expression in cardiac tissues. *Circ.Res.*, 85(1):e1–e6.
- [Difrancesco, 1999] Difrancesco, D. (1999). Dual allosteric modulation of pacemaker (f) channels by camp and voltage in rabbit sa node. *J.Physiol*, 515 (Pt 2):367–376.
- [Santoro und Tibbs, 1999] Santoro, B. und Tibbs, G. (1999). The hcn gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 868:741–764.
- [Munsch und Pape, 1999] Munsch, T. und Pape, H. (1999). Modulation of the hyperpolarization-activated cation current of rat thalamic relay neurones by intracellular ph. *J.Physiol*, 519 Pt 2:493–504.
- [Hasselmo, 1999] Hasselmo, M. (1999). Neuromodulation and the hippocampus: memory function and dysfunction in a network simulation. *Prog.Brain Res.*, 121:3–18.
- [Nadasdy et al., 1999] Nadasdy, Z., Hirase, H., Czurko, A., Csicsvari, J.; und Buzsaki, G. (1999). Replay and time compression of recurring spike sequences in the hippocampus. *J.Neurosci.*, 19(21):9497–9507.
- [Pfeifer et al., 1999] Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P.; und Hofmann, F. (1999). Structure and function of cgmp-dependent protein kinases. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.*, 135:105–149.

- [Biel et al., 1999] Biel, M., Zong, X., Ludwig, A., Sautter, A.; und Hofmann, F. (1999). Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.*, 135:151–171.
- [Ludwig et al., 1999] Ludwig, A., Zong, X., Stieber, J., Hullin, R., Hofmann, F.; und Biel, M. (1999). Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J.*, 18(9):2323–2329.
- [Hausser et al., 2000] Hausser, M., Spruston, N.; und Stuart, G. (2000). Diversity and dynamics of dendritic signaling. *Science*, 290(5492):739–744.
- [Beaumont und Zucker, 2000] Beaumont, V. und Zucker, R. (2000). Enhancement of synaptic transmission by cyclic amp modulation of presynaptic ih channels. *Nat.Neurosci.*, 3(2):133–141.
- [Csicsvari et al., 2000] Csicsvari, J., Hirase, H., Mamiya, A.; und Buzsáki, G. (2000). Ensemble patterns of hippocampal ca3-ca1 neurons during sharp wave-associated population events. *Neuron*, 28(2):585–594.
- [Traub und Bibbig, 2000] Traub, R. und Bibbig, A. (2000). A model of high-frequency ripples in the hippocampus based on synaptic coupling plus axon-axon gap junctions between pyramidal neurons. *J.Neurosci.*, 20(6):2086–2093.
- [Santoro et al., 2000] Santoro, B., Chen, S., Luthi, A., Pavlidis, P., Shumyatsky, G., Tibbs, G.; und Siegelbaum, S. (2000). Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse cns. *J.Neurosci.*, 20(14):5264–5275.
- [Hutcheon und Yarom, 2000] Hutcheon, B. und Yarom, Y. (2000). Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons. *Trends Neurosci.*, 23(5):216–222.
- [Draguhn et al., 2000] Draguhn, A., Traub, R., Bibbig, A.; und Schmitz, D. (2000). Ripple (approximately 200-hz) oscillations in temporal structures. *J.Clin.Neurophysiol.*, 17(4):361–376.
- [Lupica et al., 2001] Lupica, C., Bell, J., Hoffman, A.; und Watson, P. (2001). Contribution of the hyperpolarization-activated current (i(h)) to membrane potential and gaba release in hippocampal interneurons. *J.Neurophysiol.*, 86(1):261–268.
- [Ulens und Tytgat, 2001] Ulens, C. und Tytgat, J. (2001). Functional heteromerization of hcn1 and hcn2 pacemaker channels. *J.Biol.Chem.*, 276(9):6069–6072.
- [Stevens et al., 2001] Stevens, D., Seifert, R., Bufe, B., Muller, F., Kremmer, E., Gaus, R., Meyerhof, W., Kaupp, U.; und Lindemann, B. (2001). Hyperpolarization-activated channels hcn1 and hcn4 mediate responses to sour stimuli. *Nature*, 413(6856):631–635.
- [Moroni et al., 2001] Moroni, A., Gorza, L., Beltrame, M., Gravante, B., Vaccari, T.,

- Bianchi, M., Altomare, C., Longhi, R., Heurteaux, C., Vitadello, M., Malgaroli, A.; und Difrancesco, D. (2001). Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current $i(f)$. *J.Biol.Chem.*, 276(31):29233–29241.
- [Yu et al., 2001] Yu, H., Wu, J., Potapova, I., Wymore, R., Holmes, B., Zuckerman, J., Pan, Z., Wang, H., Shi, W., Robinson, R., El-Maghrabi, M., Benjamin, W., Dixon, J., McKinnon, D., Cohen, I.; und Wymore, R. (2001). Mink-related peptide 1: A beta subunit for the hcn ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ.Res.*, 88(12):E84–E87.
- [Wainger et al., 2001] Wainger, B., DeGennaro, M., Santoro, B., Siegelbaum, S.; und Tibbs, G. (2001). Molecular mechanism of camp modulation of hcn pacemaker channels. *Nature*, 411(6839):805–810.
- [Chen et al., 2001] Chen, S., Wang, J.; und Siegelbaum, S. (2001). Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of hcn1 and hcn2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J.Gen.Physiol*, 117(5):491–504.
- [Biel et al., 2002] Biel, M., Schneider, A.; und Wahl, C. (2002). Cardiac hcn channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc.Med.*, 12(5):206–212.
- [Mellor et al., 2002] Mellor, J., Nicoll, R.; und Schmitz, D. (2002). Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by presynaptic ih channels. *Science*, 295(5552):143–147.
- [Lee und Wilson, 2002] Lee, A. und Wilson, M. (2002). Memory of sequential experience in the hippocampus during slow wave sleep. *Neuron*, 36(6):1183–1194.
- [Poolos et al., 2002] Poolos, N. P., Migliore, M.; und Johnston, D. (2002). Pharmacological upregulation of h-channels reduces the excitability of pyramidal neuron dendrites. *Nat Neurosci*, 5(8):767–774.
- [Lorincz et al., 2002] Lorincz, A., Notomi, T., Tamas, G., Shigemoto, R.; und Nusser, Z. (2002). Polarized and compartment-dependent distribution of hcn1 in pyramidal cell dendrites. *Nat.Neurosci.*, 5(11):1185–1193.
- [Macri et al., 2002] Macri, V., Proenza, C., Agranovich, E., Angoli, D.; und Accilli, E. (2002). Separable gating mechanisms in a mammalian pacemaker channel. *J.Biol.Chem.*, 277(39):35939–35946.
- [Buzsaki, 2002] Buzsaki, G. (2002). Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, 33(3):325–340.
- [Mannikko et al., 2002] Mannikko, R., Elinder, F.; und Larsson, H. (2002). Voltage-

- sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages. *Nature*, 419(6909):837–841.
- [Ludwig et al., 2003] Ludwig, A., Budde, T., Stieber, J., Moosmang, S., Wahl, C., Holt-hoff, K., Langebartels, A., Wotjak, C., Munsch, T., Zong, X., Feil, S., Feil, R., Lancel, M., Chien, K., Konnerth, A., Pape, H., Biel, M.; und Hofmann, F. (2003). Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel *hcn2*. *EMBO J.*, 22(2):216–224.
- [Schulze-Bahr et al., 2003] Schulze-Bahr, E., Neu, A., Friederich, P., Kaupp, U., Breithardt, G., Pongs, O.; und Isbrandt, D. (2003). Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J.Clin.Invest*, 111(10):1537–1545.
- [Much, 2003] Much, B. (2003). *Untersuchungen zur Heteromerisierung, Funktion und genetischen Struktur von HCN Schrittmacherkanälen*. PhD thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- [Yu et al., 2004] Yu, X., Duan, K., Shang, C., Yu, H.; und Zhou, Z. (2004). Calcium influx through hyperpolarization-activated cation channels (i(h) channels) contributes to activity-evoked neuronal secretion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 101(4):1051–1056.
- [Ueda et al., 2004] 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.; und Kimura, A. (2004). Functional characterization of a trafficking-defective *hcn4* mutation, d553n, associated with cardiac arrhythmia. *J.Biol.Chem.*, 279(26):27194–27198.
- [Notomi und Shigemoto, 2004] Notomi, T. und Shigemoto, R. (2004). Immunohistochemical localization of ih channel subunits, *hcn1-4*, in the rat brain. *J.Comp Neurol.*, 471(3):241–276.
- [Gravante et al., 2004] Gravante, B., Barbuti, A., Milanesi, R., Zappi, I., Viscomi, C.; und Difrancesco, D. (2004). Interaction of the pacemaker channel *hcn1* with filamin a. *J.Biol.Chem.*, 279(42):43847–43853.
- [Qu et al., 2004] Qu, J., Kryukova, Y., Potapova, I., Doronin, S., Larsen, M., Krishnamurthy, G., Cohen, I.; und Robinson, R. (2004). *Mirp1* modulates *hcn2* channel expression and gating in cardiac myocytes. *J.Biol.Chem.*, 279(42):43497–43502.
- [Buzsaki und Draguhn, 2004] Buzsaki, G. und Draguhn, A. (2004). Neuronal oscillations in cortical networks. *Science*, 304(5679):1926–1929.
- [Stieber et al., 2005] Stieber, J., Stockl, G., Herrmann, S., Hassfurth, B.; und Hofmann, F. (2005). Functional expression of the human *hcn3* channel. *J.Biol.Chem.*, 280(41):34635–34643.
- [Zong et al., 2005] Zong, X., Eckert, C., Yuan, H., Wahl-Schott, C., Abicht, H., Fang,

- L., Li, R., Mistrik, P., Gerstner, A., Much, B., Baumann, L., Michalakis, S., Zeng, R., Chen, Z.; und Biel, M. (2005). A novel mechanism of modulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels by src kinase. *J.Biol.Chem.*, 280(40):34224–34232.
- [Maier, 2006] Maier, N. (2006). *Elektrophysiologische Untersuchungen zu sharp wave-ripple Komplexen im Hippocampus der Maus in vitro*. PhD thesis, Universitätsmedizin Berlin.
- [Milanesi et al., 2006] Milanesi, R., Baruscotti, M., Gneccchi-Ruscione, T.; und Difrancesco, D. (2006). Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. *N.Engl.J.Med.*, 354(2):151–157.
- [Poolos et al., 2006] Poolos, N., Bullis, J.; und Roth, M. (2006). Modulation of h-channels in hippocampal pyramidal neurons by p38 mitogen-activated protein kinase. *J.Neurosci.*, 26(30):7995–8003.
- [Wu et al., 2006] Wu, C. P., Huang, H. L., Asl, M. N., He, J. W., Gillis, J., Skinner, F. K.; und Zhang, L. (2006). Spontaneous rhythmic field potentials of isolated mouse hippocampal-subicular-entorhinal cortices in vitro. *J Physiol*, 576(Pt 2):457–476.
- [Tsay et al., 2007] Tsay, D., Dudman, J.; und Siegelbaum, S. (2007). Hcn1 channels constrain synaptically evoked ca²⁺ spikes in distal dendrites of ca1 pyramidal neurons. *Neuron*, 56(6):1076–1089.
- [Herrmann et al., 2007] Herrmann, S., Stieber, J., Stockl, G., Hofmann, F.; und Ludwig, A. (2007). Hcn4 provides a 'depolarization reserve' and is not required for heart rate acceleration in mice. *EMBO J.*, 26(21):4423–4432.
- [Genlain et al., 2007] Genlain, M., Godaux, E.; und Ris, L. (2007). Involvement of hyperpolarization-activated cation channels in synaptic modulation. *Neuroreport*, 18(12):1231–1235.
- [Nof et al., 2007] Nof, E., Luria, D., Brass, D., Marek, D., Lahat, H., Reznik-Wolf, H., Pras, E., Dascal, N., Eldar, M.; und Glikson, M. (2007). Point mutation in the hcn4 cardiac ion channel pore affecting synthesis, trafficking, and functional expression is associated with familial asymptomatic sinus bradycardia. *Circulation*, 116(5):463–470.
- [Narayanan und Johnston, 2008] Narayanan, R. und Johnston, D. (2008). The h channel mediates location dependence and plasticity of intrinsic phase response in rat hippocampal neurons. *J.Neurosci.*, 28(22):5846–5860.
- [Both et al., 2008] Both, M., Bahner, F., von Bohlen und, H. O.; und Draguhn, A. (2008). Propagation of specific network patterns through the mouse hippocampus. *Hippocampus*, 18(9):899–908.
- [Nakashiba et al., 2009] Nakashiba, T., Buhl, D. L., McHugh, T. J.; und Tonegawa, S.

- (2009). Hippocampal ca_3 output is crucial for ripple-associated reactivation and consolidation of memory. *Neuron*, 62(6):781–787.
- [Biel et al., 2009] Biel, M., Wahl-Schott, C., Michalakis, S.; und Zong, X. (2009). Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev.*, 89(3):847–885.
- [Schweizer et al., 2010] Schweizer, P., Duhme, N., Thomas, D., Becker, R., Zehelein, J., Draguhn, A., Bruhl, C., Katus, H.; und Koenen, M. (2010). ca_1 sensitivity of hcn pacemaker channels determines basal heart rate but is not critical for autonomic rate control. *Circ.Arrhythm.Electrophysiol.*, 3(5):542–552.
- [Lakatta et al., 2010] Lakatta, E., Maltsev, V.; und Vinogradova, T. (2010). A coupled system of intracellular ca_2+ clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart’s pacemaker. *Circ.Res.*, 106(4):659–673.
- [Einevoll et al., 2010] Einevoll, G. T., Wójcik, D. K.; und Destexhe, A. (2010). Modeling extracellular potentials. *J Comput Neurosci*, 29(3):367–369.
- [Ellender et al., 2010] Ellender, T. J., Nissen, W., Colgin, L. L., Mann, E. O.; und Paulsen, O. (2010). Priming of hippocampal population bursts by individual perisomatic-targeting interneurons. *J Neurosci*, 30(17):5979–5991.
- [Sánchez-Alonso et al., 2010] Sánchez-Alonso, J. L., Muñoz-Cuevas, J., Vicente-Torres, M. A.; und Colino, A. (2010). Role of low-voltage-activated calcium current on the firing pattern alterations induced by hypothyroidism in the rat hippocampus. *Neuroscience*, 171(4):993–1005.
- [Maltsev et al., 2011] Maltsev, A., Maltsev, V., Mikheev, M., Maltseva, L., Sirenko, S., Lakatta, E.; und Stern, M. (2011). Synchronization of stochastic $ca(2+)$ release units creates a rhythmic $ca(2+)$ clock in cardiac pacemaker cells. *Biophys.J.*, 100(2):271–283.